



**FACULTAD DE QUÍMICA  
Y DE FARMACIA**  
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA**

**CONJUGADOS FOTSENSIBILIZADOR-QUITOSANO: SÍNTESIS,  
CARACTERIZACIÓN FOTOFÍSICA Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD  
FUNGICIDA. DESARROLLO DE FORMULACIÓN CON VISTAS A SU  
APLICACIÓN EN POSTCOSECHA.**

**LUCIANO FRANCESCO DIBONA VILLANUEVA**

**Tesis para optar al Grado**

**Académico de Doctor en Química**

**Director de Tesis:** Dr. Denis Alberto Fuentealba Patiño

**Santiago, julio de 2021**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE  
FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA  
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

**“CONJUGADOS FOTOSENSIBILIZADOR-QUITOSANO: SÍNTESIS,  
CARACTERIZACIÓN FOTOFÍSICA Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD  
FUNGICIDA. DESARROLLO DE FORMULACIÓN CON VISTAS A SU  
APLICACIÓN EN POSTCOSECHA”**

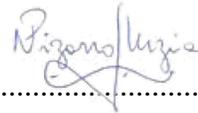
Tesis presentada por:

**LUCIANO DIBONA VILLANUEVA**

Para optar al Grado Académico de Doctor en  
Química.

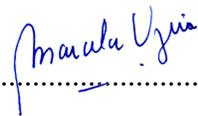
APROBADA POR:

Dra. Nancy Pizarro  
Prof. Examinador



.....

Dra. Marcela Urzúa  
Prof. Examinador



.....

Dra. Lorena Barrientos  
Prof. Examinador



.....

Dr. Mario Faúndez  
Prof. Examinador

Dr. Mario Faúndez

.....

Dr. Denis Fuentealba  
Prof. Director de Tesis



.....

**AGOSTO - 2021**

## **Agradecimientos**

*Agradezco a toda mi familia, por el apoyo y amor incondicional durante todos estos años a la distancia. Por ser un pilar fundamental para seguir adelante y no darme por vencido en los malos momentos.*

*Agradezco a mis amigos, por darme tan buenos momentos cuando mas lo necesitaba, por confiar en mi y por apoyarme en las buenas y en las malas pese a la distancia.*

*Agradezco a todas las buenas personas que conocí en Santiago durante mi doctorado, por las grandes amistades, lazos y buenos momentos.*

*Agradezco a la Facultad de Química y de Farmacia UC y a todos sus destacados funcionarios, docentes, profesores e investigadores por recibirme y por todo el apoyo en mi formación.*

*Agradezco a mi profesor guía, Dr. Denis Fuentealba por su invaluable apoyo, comprensión, motivación durante toda mi formación como Doctor. Su calidad como persona y científico son pasos que seguir de aquí en adelante.*

*Agradezco al Dr. Héctor Valdés por su apoyo y conocimientos que complementaron mi trabajo de tesis.*

*Agradezco a todos mis compañeros en el Laboratorio de Química Biosupramolecular, por los buenos momentos, las risas, las enriquecedoras discusiones y por apoyarme siempre.*

*Agradezco a ANID y a el programa de formación de capital humano avanzado y la beca 21170457 por el financiamiento de este doctorado.*

## Índice de Abreviaciones

<b>ABMA</b>	<b>ácido 9,10-antracendiil-bis(metileno)dimalónico</b>
<b>aPDT</b>	Terapia fotodinámica antimicrobiana (antimicrobial Photodynamic Therapy)
<b>CH</b>	Quitosano
<b>CH-PPIX</b>	Conjugado Quitosano-protoporfirina IX
<b>CH-RF</b>	Conjugado Quitosano-Riboflavina
<b>CH-SH</b>	Quitosano Tiolado
<b>DBTDL</b>	dilaurato de dibutilestaño
<b>DD</b>	Grado de desacetilación (Desacetylation degree)
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoxido
<b>DTNB</b>	ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
<b>FTIR</b>	Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier
<b>GlcN</b>	Glucosamina (Unidad repetitiva)
<b>GlcNAc</b>	N-acetil glucosamina
<b>GlcN-RF</b>	Glucosamina conjugada con Riboflavina
<b>GlcN-SH</b>	Glucosamina tiolada
<b>IC</b>	Conversión Interna (Internal Conversion)
<b>ISC</b>	Cruce entre sistemas (Inter system Crossing)
<b>NHS</b>	N-hidroxisuccinimida
<b>PDT</b>	Terapia Fotodinámica (Photodynamic Therapy)
<b>PMPI</b>	lisocianato de 4-maleimidofenilo
<b>PPIX</b>	Protoporfirina IX
<b>RF</b>	Riboflavina
<b>RF-PMPI</b>	Derivado riboflavina-pmpi
<b>RMN</b>	Resonancia Magnetica Nuclear
<b>S4%</b>	Medio de cultivo agar Saboroud
<b>TGA</b>	Ácido tioglicólico
<b>TLC</b>	Cromatografía de placa fina
<b>TNB</b>	ácido tionitrobenzoico
<b>UV</b>	Ultravioleta

## Índice General

1. Resumen.....	6
1.1 Abstract.....	7
2. Introducción .....	9
2.1 Antecedentes y Contexto .....	9
2.2 Terapia Fotodinámica .....	12
2.3 Hongos Patógenos .....	14
2.4 Terapia fotodinámica antimicrobiana aplicada a hongos patógenos en plantas y frutas.....	17
2.5 Quitosano como fungicida.....	23
2.6 Uso de Polímeros y Fotosensibilizadores en conjunto en Terapia Fotodinámica .....	24
3. Hipótesis .....	26
4. Objetivos .....	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos específicos .....	26
5. Material y Métodos.....	28
5.1 Formación de quitosano de bajo peso molecular:.....	28
5.2 Caracterización del quitosano:.....	28
5.3 Síntesis y purificación del conjugado Riboflavina-quitosano:.....	28
5.3.1 Síntesis de RF-PMPI: .....	28
5.3.2 Síntesis Quitosano tiolado: .....	29
5.3.3 Síntesis conjugado CH-RF:.....	30
5.4 Síntesis Conjugado PPIX-CH: .....	31
5.5 Caracterización química de los conjugados:.....	31
5.6 Caracterización Fotofísica:.....	32
5.7 Determinación de Oxígeno singlete: .....	33
5.9 Aislamiento e identificación de <i>Penicillium digitatum</i> : .....	34
5.10 Determinación de la concentración de esporas: .....	34
5.11 Optimización de concentraciones para tratamiento aPDT y concentraciones mínimas inhibitorias: .....	34

5.12 Evaluación del efecto fungicida fotodinámico en el crecimiento y morfología de los hongos patógenos*:	35
6. Resultados y Discusión:	40
6.1 Hidrólisis del Quitosano y Caracterización.	40
6.2 Conjugado CH-RF	44
6.2.1 Síntesis del quitosano tiolado	44
6.2.2 Síntesis del Derivado Riboflavina-PMPI.	46
6.2.3 Síntesis del Conjugado CH-RF	49
6.3 Caracterización Fotofísica del conjugado CH-RF	53
6.4 Evaluación de Actividad Fungicida de Sistemas basados en Riboflavina.	58
6.5 Síntesis del Conjugado CH-PPIX.	66
6.6 Caracterización Fotofísica del conjugado CH-PPIX.	69
6.7 Evaluación de efecto fungicida de sistemas basados en PPIX.	73
7. Comparación entre conjugados y azul de metileno.	76
9. Resumen de resultados y proyección de los conjugados:	82
10. Conclusiones	85
11. Referencias:	87
10. Anexos	94

## Índice de Tablas

Tabla 1. Años de uso de familias de fungicidas tradicionales hasta la aparición de cepas resistentes.	10
Tabla 2. Datos de viscosimetría y Pesos moleculares viscosimétricos del quitosano	41
Tabla 3. Valores de coeficientes de reparto de los distintos componentes de la mezcla de reacción de la derivatización de RF-PMPI.	47
Tabla 4. Tiempos de Vida de Fluorescencia y Anisotropía de los sistemas basados en Riboflavina en agua. Excitación a 357 nm y Medición de emisión a 524 nm	55

## Índice de Figuras

Figura 1. Número de publicaciones sobre aPDT desde 1992 hasta 2015. Datos obtenidos buscando por “antimicrobial photodynamic therapy” en base de datos SciFinder. ....	12
Figura 2. Mecanismo del proceso de fotosensibilización. Reproducido desde [20]. ....	14
Figura 3. Diagrama de las estructuras presentes en una hifa. Reproducido desde <sup>23</sup> . ....	15
Figura 4. Desarrollo de un conidio a partir de una fiálide (Conidiogénesis). Reproducido desde <sup>23</sup> . ....	16
Figura 5. Diagrama de los componentes de la pared celular de una célula fúngica. (A) Estructura externa de las manoproteínas, destacando el grupo fosfato que otorga carga negativa a la pared celular. (B) Vista general de los componentes de la pared celular. Adaptado desde <sup>25</sup> . ....	17
Figura 6. Productos de oxidación del ergosterol presente en la membrana plasmática de las células fúngicas por oxígeno singlete. Reproducido desde <sup>38</sup> . ....	19
Figura 7. Estructuras químicas de a) Riboflavina y b) Protoporfirina IX. ....	22
Figura 8. Mecanismo de acción fungicida del quitosano y sus pasos. Reproducido de <sup>58</sup> . ....	24
Figura 9. Reacción del reactivo de Ellman para determinación de grupos tioles libres. ....	30
Figura 10. Representación de las distintas condiciones de crecimiento para los experimentos de crecimiento radial de <i>Penicillium digitatum</i> con sistemas RF. ....	36
Figura 11. Representación de las distintas condiciones de crecimiento para los experimentos de crecimiento radial de <i>Penicillium digitatum</i> con sistemas PPIX. ....	37
Figura 12. Espectro H1 RMN del quitosano hidrolizado, valores de integraciones de señales correspondientes a las utilizadas por la ecuación en el punto 5.2 y grado de desacetilación calculado. ....	41
Figura 13. Diagrama representativo de los distintos monómeros que posee el quitosano tiolado. ....	45
Figura 14. Espectro FTIR del quitosano (CH) y del quitosano Tiolado (CH-SH) Las bandas importantes para la caracterización del quitosano tiolado están destacadas con el número de onda y al grupo que corresponden. ....	46

Figura 15. Separación por cromatografía preparativa de placa fina del extracto orgánico de reacción RF-PMPI. Fase móvil Acetato de Etilo:Metanol 9:1.....	48
Figura 16. Espectro H1-RMN en DMSO-d <sub>6</sub> de RF-PMPI luego de separación por cromatografía preparativa en placa. ....	49
Figura 17. Espectro FTIR del quitosano tiolado (CH-SH) y del conjugado con riboflavina (CH-RF) .....	50
Figura 18. Espectro de masas de la fracción. Destacada la masa del monómero del conjugado CH-RF fragmentado. ....	51
Figura 19. Curva de calibración de Emisión de fluorescencia a 524 nm de RF-PMPI en agua para determinación de RF en CH-RF.....	52
Figura 20. Espectros de absorción de RF (21 µM), RF-PMPI (21 µM) y CH-RF (1% m/v). RF y RF-PMPI preparados en DMSO y diluidos en solución acuosa. ....	53
Figura 21. Espectros de emisión de fluorescencia de RF (21 µM), RF-PMPI (21 µM) y CH-RF (1% m/v). RF y RF-PMPI preparados en DMSO y diluidos en solución acuosa. λ Exc a 450 nm, λ Em a 524 nm.....	53
Figura 22. Fotodegradación de sistemas RF, datos linealizados. Filtro de irradiación de 450 nm, Intensidad de luz 22,08 W/m <sup>2</sup> .....	54
Figura 23. Perfiles de generación de oxígeno singlete de RF y CH-RF. Seguimiento de la disminución de la fluorescencia de ABMA a 412 nm.....	54
Figura 24. Optimización de concentraciones para aPDT de conjugado CH-RF. ....	60
Figura 25. a) Fotos representativas de las placas Petri y el crecimiento radial. b) Porcentajes de crecimiento de <i>Penicillium digitatum</i> bajo tratamiento aPDT y oscuro con sistemas de RF. * Las placas con el sistema CH-RF 0,5% no presentaron crecimiento alguno.....	61
Figura 26. Fotos en campo claro y con Filtro de fluorescencia a 510 nm. Excitación a 450nm.....	64
Figura 27. Espectro FTIR de PPIX y el conjugado CH-PPIX. ....	67
Figura 28. Espectro de masas de la fracción. Destacada la masa del monómero del conjugado CH-PPIX fragmentado .....	68
Figura 29. Curva de calibración de Emisión de fluorescencia a 635 nm de PPIX en Ácido acético 2%/Tween 20 1% para la determinación de PPIX en CH-PPIX. ....	69

Figura 30. Espectro de absorción de PPIX y CH-PPIX en Ácido acético 2%/Tween 1%.....	69
Figura 31. Espectro de emisión de fluorescencia de PPIX y CH-PPIX en Ácido acético 2%/Tween 1%.....	70
Figura 32. Perfiles de Fotodegradación de los sistemas basados en PPIX. Filtro de irradiación de 590 nm, Intensidad de luz 36,7 W/m <sup>2</sup> . ....	71
Figura 33. Perfiles de generación de oxígeno singlete de PPIX y CH-PPIX. Seguimiento de la disminución de la fluorescencia de ABMA a 412nm.....	72
Figura 34. Optimización de concentraciones para aPDT de conjugado CH-PPIX. * No se detectó crecimiento con el conjugado a concentración 5x10 <sup>-3</sup> % en presencia de luz.....	73
Figura 35. a) Fotos representativas de las placas Petri y el crecimiento radial. b) Porcentajes de crecimiento de Penicillium digitatum bajo tratamiento aPDT y oscuro con sistemas de PPIX. * Las placas con el sistema CH-PPIX Irradiado no presentaron crecimiento alguno.....	75
Figura 36. a) Fotos representativas del efecto fungicida fotodinámico del azul de metileno. b) Grafico de inhibición del azul de metileno en oscuro y con tratamiento aPDT.....	77

### Índice de Esquemas

Esquema 1. Diagrama de síntesis general del conjugado CH-RF. ....	44
Esquema 2. Diagrama de síntesis total del conjugado CH-PPIX .....	66

### Índice de Ecuaciones

Ecuación 1 .....	28
Ecuación 2 .....	33

## 1. Resumen

Bajo el contexto del problema que significa la aparición de hongos patógenos en post-cosecha y los problemas que trae el uso de fungicidas tradicionales, se hace imperativo desarrollar nuevas alternativas para el control de estos microorganismos.

En este trabajo de Tesis se sintetizaron 2 conjugados químicos basados en la unión de un fotosensibilizador y quitosano de bajo peso molecular. El primer conjugado está basado en la unión química entre riboflavina a través del agente acoplante isocianato de 4-maleimidofenilo a quitosano tiolado de bajo peso molecular. El segundo conjugado se trata de la unión de protoporfirina IX con quitosano de bajo peso molecular a través del agente acoplante 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Ambos conjugados fueron diseñados con el fin de tener un efecto fungicida potenciado a través de la terapia fotodinámica antimicrobiana. Los conjugados fueron caracterizados a través de distintas técnicas como RMN, FTIR, Absorción UV-visible, Emisión de fluorescencia entre otras. Finalmente, su efecto fungicida fue evaluado *in vitro* en *Penicillium digitatum* y comparado con sus componentes por separado en distintas condiciones.

Los resultados indican que, para la conjugación de riboflavina y quitosano, esta no modifica sus propiedades de absorción, pero si las de fluorescencia debido principalmente a interacciones con el agente acoplante, luego, en un examen indirecto se determinó que el conjugado tiene mayor capacidad de generar oxígeno singlete. El conjugado posee mayor actividad fungicida que sus componentes por separado, alcanzando un 100% de inhibición al 0,5% (m/v). En el caso del conjugado de protoporfirina IX y quitosano, esta no modifica las propiedades fotofísicas del fotosensibilizador, pero aumenta en la generación de oxígeno singlete. El conjugado posee mayor actividad fungicida que sus componentes por separado y logra una inhibición del 100% del patógeno al 0,005% (m/v).

## 1.1 Abstract

The proliferation of pathogenic fungi during post-harvest is a serious problem that needs research focus. The use of traditional fungicides is a partial solution to this problem, but it also has numerous disadvantages. Because of this, it is imperative to develop new fungicide formulations to control the apparition and spread of pathogenic fungi.

In this Thesis, 2 chemical conjugates were synthesized based on chemical binding of a photosensitizer and low molecular weight chitosan. The first conjugate is based on the chemical bond between riboflavin through 4-maleimidophenyl isocyanate crosslinker to low molecular weight thiolated chitosan. The second conjugate is based on the chemical binding of protoporphyrin IX with low molecular weight chitosan through 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide as a crosslinker. Both conjugates were designed to have a fungicide effect enhanced through antimicrobial photodynamic therapy. The conjugates were characterized through different techniques such as MRI, FTIR, UV-visible absorption, fluorescence emission among others. Finally, fungicide effect was evaluated in *Penicillium digitatum* and compared to its components separately under different conditions on both conjugates.

The results indicate that the conjugation of riboflavin and chitosan does not modify its absorption properties, but it does affect fluorescence properties mainly due to interactions with the crosslinker. In an indirect experiment, the conjugate has greater capacity to generate singlet oxygen. The conjugate has a higher fungicide activity than its components, reaching 100% inhibition at 0,5% (w/v). In the case of protoporphyrin IX and chitosan conjugate, it doesn't modify the photophysical properties of the photosensitizer. Indirect experiment indicates the conjugate has higher generation of singlet oxygen. The conjugate has higher fungicide activity than its components and achieves 100% inhibition of the pathogen at  $5 \times 10^{-3}\%$  (w/v).

# **CAPÍTULO I.**

# **INTRODUCCIÓN**

## **2. Introducción**

### **2.1 Antecedentes y Contexto**

El control de la aparición y proliferación de hongos patógenos en plantas y frutas de interés agrícola ha sido por muchos años un campo de atractivo tanto en el ámbito académico como en el industrial. Este especial énfasis en los hongos patógenos es debido a que, según estimaciones, la aparición de estos microorganismos involucra una pérdida de producción de cultivos cercana al 65%[1]. La solución actual a este problema es la aplicación de fungicidas tradicionales tales como los pertenecientes a las familias de benzimidazoles, dicarboximidias e hidroxianilidas entre otros. El uso de estos fungicidas tradicionales trae consigo una serie de problemas tales como la aparición de cepas resistentes a los fungicidas, la cual ha llamado la atención tanto del sector académico como de la comunidad mundial.

La tendencia a la aparición de cepas resistentes de hongos patógenos debido al uso de fungicidas tradicionales ha sido bien documentada a través de varias revisiones en la literatura[2-4]. De manera general, se ha encontrado que el uso de fungicidas específicos (fungicidas inhibidores de sitios específicos en la célula fúngica) si bien presentan un control efectivo en primera instancia, no demoran en generar cepas resistentes. En algunos casos demorando desde 2 a 7 años en desarrollarse esta resistencia[2, 5]. Por otra parte, los fungicidas que presentan más de un sitio de acción, como por ejemplo las morfolinas que actúan inhibiendo la actividad de la  $\Delta^{14}$  reductasa y la biosíntesis de esteroides [6], presentan mayores tiempos de aplicación antes de la aparición de cepas resistentes (Tabla 1).

Tabla 1. Años de uso de familias de fungicidas tradicionales hasta la aparición de cepas resistentes.

Familia de Fungicida	Número de sitios de acción	Años de uso hasta aparición de resistencia	Patógeno
Organomercuriales <sup>a</sup>	Varios	40	<i>Pyrenophora Avenae</i>
Benzimidazoles <sup>a</sup>	1	2	<i>Venturia inaequalis</i> <i>Botrytis cinerea</i>
Fenilamidas <sup>a</sup>	1	2	<i>Phytophthora infestans</i> <i>Plasmopara viticola</i>
Dicarboximidias <sup>a</sup>	1	5	<i>Botrytis cinerea</i>
DIMs <sup>a</sup>	1	4	<i>Blumeria graminis</i>
Carboxanilidas <sup>a</sup>	1	14	<i>Ustilago nuda</i>
Morfolinas <sup>a</sup>	2	34	<i>Blumeria graminis</i>
Estrobilurinas <sup>a</sup>	1	2	<i>Blumeria graminis</i>
Guazatina <sup>b</sup>	1	3	<i>Penicillium digitatum</i>
Imazalil <sup>b</sup>	1	7	<i>Penicillium digitatum</i>

<sup>a</sup> Desde Referencia [2]

<sup>b</sup> Desde Referencia [5]

La mutación hacia cepas resistentes de hongos provoca el aumento de las dosis necesarias para el control de los distintos patógenos. Lo anterior tiene dos consecuencias directas, la primera consiste en el aumento de los residuos de pesticidas en los cultivos para consumo humano. El aumento del uso de fungicidas en los cultivos, en primera instancia, puede ser nocivo para el personal de aplicación ya que se expone a concentraciones que pueden producir irritación a la piel, tracto respiratorio y reacciones alérgicas[7]. En segunda instancia, puede provocar el aumento de residuos en los frutos y cultivos destinados para consumo humano, que en altas concentraciones pueden ser tóxicos e imposibles de comercializar según normativas internacionales cada día más rigurosas con la cantidad máxima de residuos de fungicidas en las frutas y plantas de exportación[8, 9].

La tercera consecuencia de la aplicación indiscriminada de pesticidas convencionales debido a la creciente resistencia de las plagas es la contaminación tanto del ambiente como de la fauna. La contaminación

ambiental producida por el uso de fungicidas se extiende a nivel mundial. Una investigación en 2012 indicó que un tercio de las aguas analizadas en sitios hortícolas en Australia contenían residuos de uno o más fungicidas[10]. Un estudio en 2018 indicó que en la Unión Europea, el 83% de los suelos analizados contenían al menos un residuo de pesticida[11]. Si bien en ambas investigaciones los autores comentan que en pocos casos estos residuos superan los niveles máximos permitidos para cada país, dan énfasis a tomar medidas de regularización para evitar que la contaminación aumente en el futuro.

La fauna también se ve afectada con este problema. La mayor preocupación tanto por los investigadores y la comunidad mundial recae en el efecto de los pesticidas y fungicidas en las abejas (Hymenoptera:Apidae). Se ha reportado que dependiendo del tipo de fungicida al cual sean expuestas las abejas, el comportamiento y tasas de recolección de polen pueden verse afectados[12]. Otras Investigaciones más alarmantes indican que pequeñas cantidades de fungicidas pueden afectar al desarrollo larvario de las abejas aumentando la tasa de mortalidad en esa etapa[13].

A la fecha, existe una tendencia mundial a mostrar mayor preocupación respecto a este problema y a generar respuestas en pos de controlar o definitivamente eliminar el uso de fungicidas tradicionales en la agricultura. En 2019 en Estados Unidos se comenzó a debatir la prohibición del uso de clorpirifos[14], En Francia se prohibió el uso de 76 productos que contienen epoxiconazol[15] y en la Unión Europea se ha prohibido el uso de productos que contengan clorotalonil[16].

Considerando estos antecedentes, se hace imperativo concentrar los esfuerzos en la investigación de nuevas alternativas para los fungicidas tradicionales las cuales no presenten los problemas anteriormente

mencionados, en otras palabras, tratamientos que no signifiquen la utilización de componentes tóxicos y que no presenten tendencia a generar resistencia por parte de los hongos patógenos. La terapia fotodinámica antimicrobiana (aPDT por sus siglas en inglés) ha emergido como una plataforma para el desarrollo de nuevos sistemas fungicidas y ha tenido bastante atención por parte de los investigadores durante los últimos años (Figura 1).

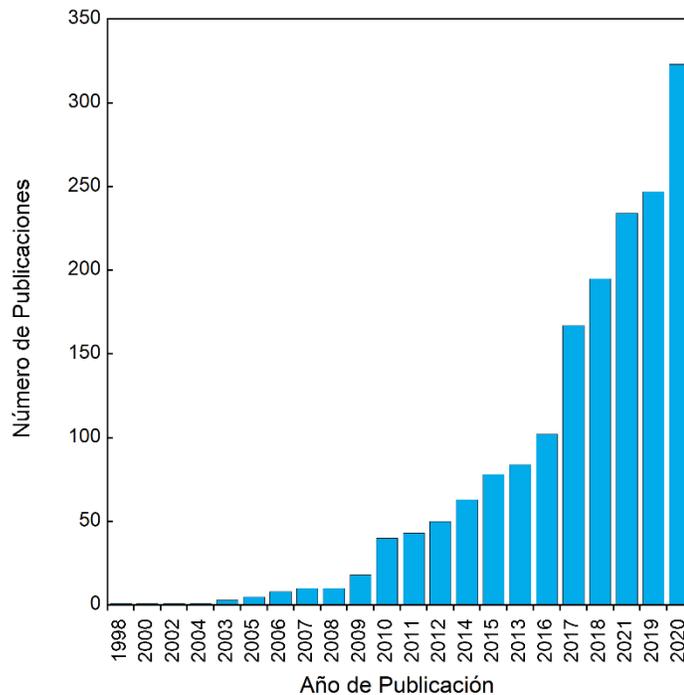


Figura 1. Número de publicaciones sobre aPDT desde 1992 hasta 2015. Datos obtenidos buscando por “antimicrobial photodynamic therapy” en base de datos SciFinder.

Para entender a cabalidad esta técnica, hay que ahondar en la terapia fotodinámica como tal, y además entender el comportamiento de los hongos patógenos.

## 2.2 Terapia Fotodinámica

La terapia fotodinámica (PDT por sus siglas en inglés) es un proceso el cual requiere de la presencia de un cromóforo, denominado fotosensibilizador, la irradiación con una fuente de luz cuya longitud de onda coincida con la

absorción de este fotosensibilizador y la presencia de oxígeno, todo esto en un sistema celular objetivo de la terapia. Se trata de un proceso fotofísico, en la cual el fotosensibilizador absorbe la luz de la fuente de irradiación y se excita pasando de su estado basal  $S_0$  a un estado excitado singlete  $S_1$ , posteriormente, si el fotosensibilizador no vuelve a su estado basal  $S_0$  mediante fluorescencia o conversión interna (IC por sus siglas en ingles), ocurre un cruce entre sistemas (ISC por sus siglas en ingles), provocando que el estado  $S_1$  pase a un estado triplete excitado  $T_1$  el cual interactúa con el oxígeno en estado basal triplete  $^3O_2$ , que mediante un proceso de transferencia de energía pasa a un estado excitado de alta reactividad química conocido como oxígeno singlete  $^1O_2$  en un proceso denominado fotosensibilización de tipo II[17].

Si bien es aceptado que el oxígeno singlete es la especie que contribuye más a la citotoxicidad de la terapia fotodinámica[18], existe otro tipo de fotosensibilización conocida como de tipo I, la cual involucra reacciones de transferencia de electrones desde el fotosensibilizador en estado triplete a otra especie, generalmente biomoléculas, produciendo finalmente radicales basados en oxígeno, como por ejemplo aniones superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno, siendo este una especie reactiva de oxígeno no radicalaria. Todas estas moléculas actúan como especies citotóxicas[19]. Finalmente, estas especies reactivas de oxígeno reaccionan con biomoléculas oxidándolas, produciendo estrés oxidativo y finalmente la muerte celular[17].

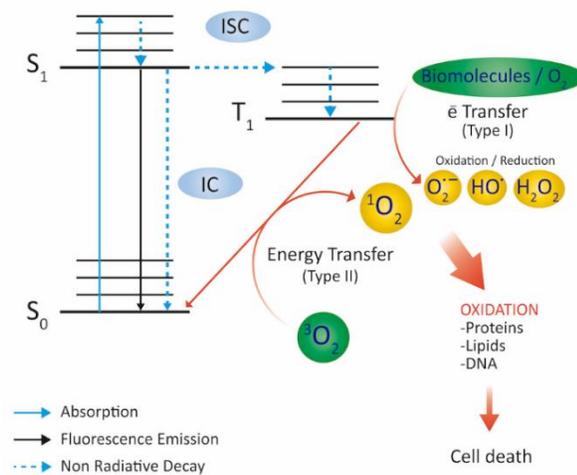


Figura 2. Mecanismo del proceso de fotosensibilización. Reproducido desde [20].

Considerando lo anterior, para poder tener un proceso de fotosensibilización efectivo en una terapia fotodinámica, se necesita un fotosensibilizador con: a) una alta eficiencia del proceso de ISC por fotón absorbido o dicho de otra manera, un alto rendimiento cuántico de ISC, b) un largo tiempo de vida de estado triplete, c) un máximo de absorción adecuado para el tipo de aplicación de la terapia y d) fácil acceso al oxígeno[17].

Los usos de la terapia fotodinámica van desde el tratamiento del cáncer[21] hasta la inhibición y muerte de microorganismos como bacterias y hongos, esta última aplicación corresponde a la terapia fotodinámica antimicrobiana[22].

### 2.3 Hongos Patógenos

Los hongos patógenos corresponden a microorganismos eucariontes multicelulares en su mayoría que pueden llegar a causar enfermedades en organismos tanto humanos como en otros organismos incluyendo las plantas, frutas y cultivos en general. La mayoría de los hongos patógenos de plantas corresponden a hongos filamentosos, los cuales corresponden a hongos cuyas hifas, componente estructural y vegetativo, crecen en ramificaciones. Las

células de hifas o simplemente hifas se encuentran unidas formando una estructura superior conocida como micelio. Las hifas se encuentran unidas por estructuras llamadas septum, que son las paredes celulares que se encuentran entre cada célula de hifa. En ocasiones, estos septum pueden presentar porosidades por las cuales comparten material citoplasmático entre células, formando un estado supracelular en todo el micelio[23].

Las hifas (Figura 3) presentan la misma gama de organelos propios de una célula eucarionte, vale decir pared celular, núcleo, mitocondria, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, vacuolas, varios tipos de vesículas y peroxisomas. Además, las hifas cumplen roles muy versátiles en las colonias de hongos como por ejemplo exploración e invasión de sus alrededores (incluido el organismo al que este infectando), captación y movilización de nutrientes y agua a través de la colonia, señalización de larga distancia y reproducción a través de la formación de esporas[23].

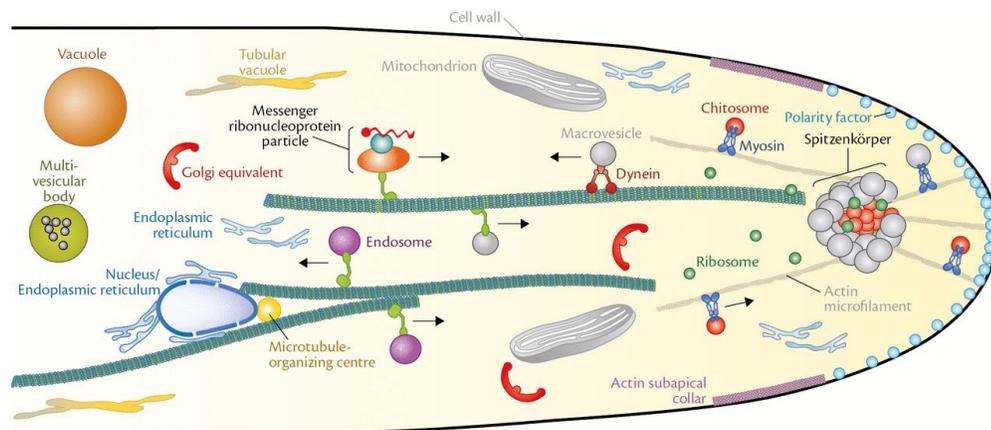


Figura 3. Diagrama de las estructuras presentes en una hifa. Reproducido desde <sup>23</sup>.

Las esporas o conidios son estructuras celulares producidas por los hongos patógenos las cuales pueden producirse sexual o asexualmente. Las esporas fúngicas cumplen funciones reproductivas, de dispersión y de supervivencia. No poseen estructuras de movilidad (flagelos) y se producen generalmente en grandes cantidades y son liberadas al ambiente y alrededores del huésped.

Son generadas por estructuras especializadas en la reproducción asexual provenientes de las hifas conocidas como conidióforos, los cuales según su forma pueden ayudar a identificar el patógeno en cuestión[23].

Las esporas son producidas por los conidióforos en un proceso de segmentación llamado conidiogénesis (Figura 4). Un tipo especial de conidiogénesis es la conidiogénesis blástica, en la cual en el tallo del conidióforo se forma una estructura conocida como fiálide. El primer paso es la elongación de la fiálide (A), luego de la ruptura del apéndice extremo de la fiálide y la aparición de la pared celular del conidio, en este paso también ocurre la migración del núcleo formado por mitosis hacia la nueva estructura (B). La formación de un septum finaliza la formación del conidio o espora(C). El proceso se repite para formar cadenas de conidios en las cuales la más antigua se encuentra siempre al final de la cadena (D)[23, 24].

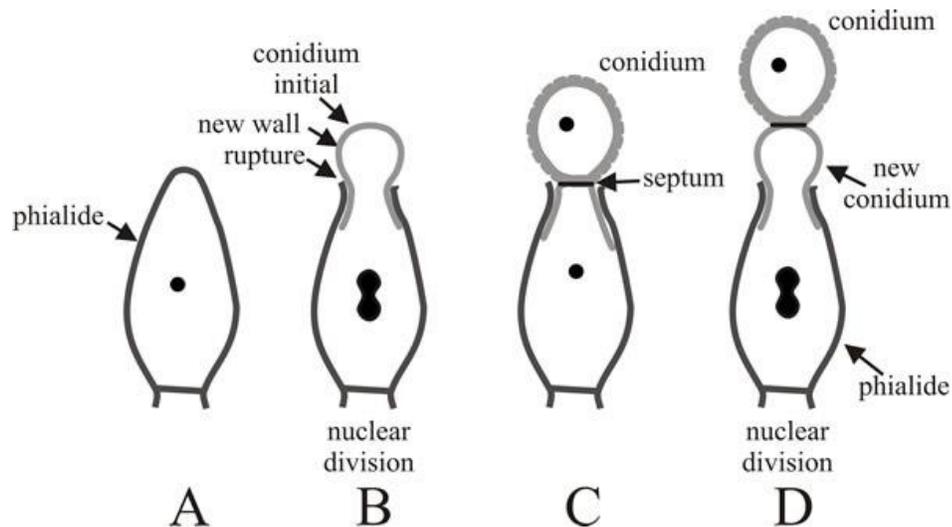


Figura 4. Desarrollo de un conidio a partir de una fiálide (Conidiogénesis). Reproducido desde <sup>23</sup>.

La pared celular de la célula fúngica se compone principalmente de quitina, glucanos, polisacáridos varios y glicoproteínas, en las que destacan las manoproteínas. La composición exacta de la pared celular va a variar según la especie de hongo. La pared celular cumple la función de delimitar y mantener la forma de las células fúngicas, proteger a la célula de cambios de

condiciones externas como por ejemplo la presión osmótica y servir de interfase entre el medio extracelular y el intracelular. Una característica interesante de la pared celular de las células fúngicas es que las cadenas de polisacáridos de las manoproteínas poseen grupos fosfatos uniendo las unidades de manosa externas, las cuales otorgan a la pared celular fúngica una carga aniónica (Figura 5)[23, 25, 26].

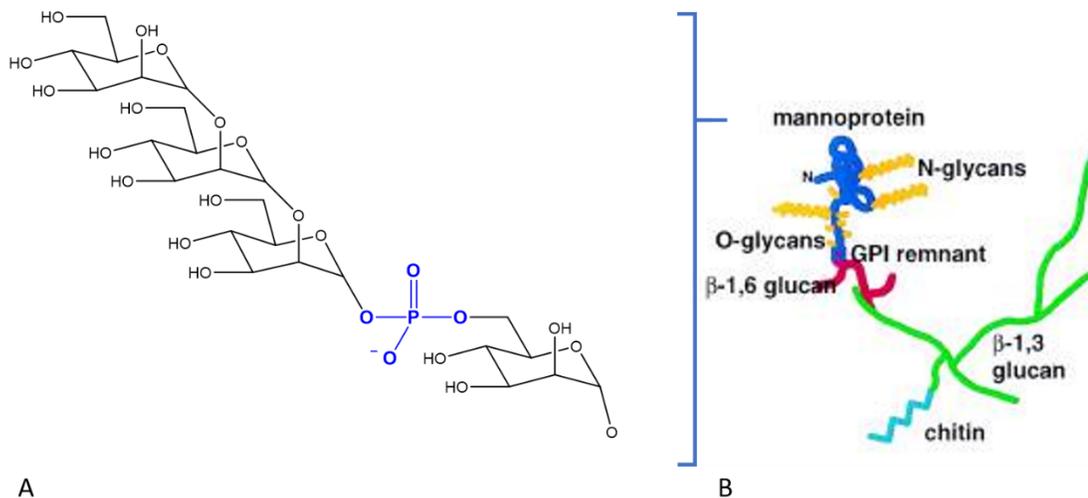


Figura 5. Diagrama de los componentes de la pared celular de una célula fúngica. (A) Estructura externa de las manoproteínas, destacando el grupo fosfato que otorga carga negativa a la pared celular. (B) Vista general de los componentes de la pared celular. Adaptado desde <sup>25</sup>.

## 2.4 Terapia fotodinámica antimicrobiana aplicada a hongos patógenos en plantas y frutas

La aPDT, particularmente utilizada para tratar sistemas fúngicos patógenos, intenta depositar y acumular el fotosensibilizador en la célula fúngica para luego ser irradiada con luz y provocar la muerte celular a través de la generación de especies reactivas de oxígeno. Actualmente la mayor parte de la investigación de aPDT en hongos apunta a hongos patógenos que afectan al humano, representada por varias investigaciones y revisiones de la literatura [27-31]. Considerando esto, la aPDT como tratamiento fungicida para los

hongos patógenos en las plantas se presenta como una alternativa prometedora e innovadora hacia la solución de este problema.

Con respecto a las investigaciones de esta área, se han reportado previamente estudios del efecto de la aPDT con diferentes fotosensibilizadores en una variedad de hongos patógenos de plantas tanto *in vitro* como *in vivo* incluyendo *Colletotrichum spp* con azul de metileno y azul de toluidina [32], *Colletotrichum abscissum* con azul de metileno bajo luz solar [33], *Fusarium oxysporum* con derivados de fitoalexinas [34], *Penicillium digitatum* y *Fusarium graminearum* con eritrosina[35]. Los fungicidas tradicionales utilizados actualmente sólo logran matar o inhibir el crecimiento de células fúngicas metabólicamente activas, en cambio, existe evidencia de que los fotosensibilizadores utilizados en la aPDT podrían lograr eliminar tanto las células metabólicamente activas como las células de conidios[32, 36, 37].

Dependiendo de las condiciones del tratamiento (principalmente de la concentración), los fotosensibilizadores pueden presentar un efecto fungicida en oscuro. Este efecto fungicida se ve potenciado en gran medida cuando se utiliza luz para activar el efecto fototóxico del fotosensibilizador, por tanto un factor importante en la aPDT es el régimen de luz con el que se activa el fotosensibilizador, siendo el tipo de luz, tiempo de irradiación y potencia de la lámpara los parámetros más importantes[32].[34].

Uno de los mecanismos posibles por el cual el fotosensibilizador en la aPDT actúa es a través de la oxidación por parte del oxígeno singlete del ergosterol presente en las membranas celulares de las células fúngicas (Figura 6). Debido a lo anterior, las proteínas transportadoras de la membrana celular del hongo son inhibidas y rápidamente procesos vitales para la célula como el transporte de azúcares y aminoácidos se ven cancelados, aportando así a la muerte de la célula fúngica[38].

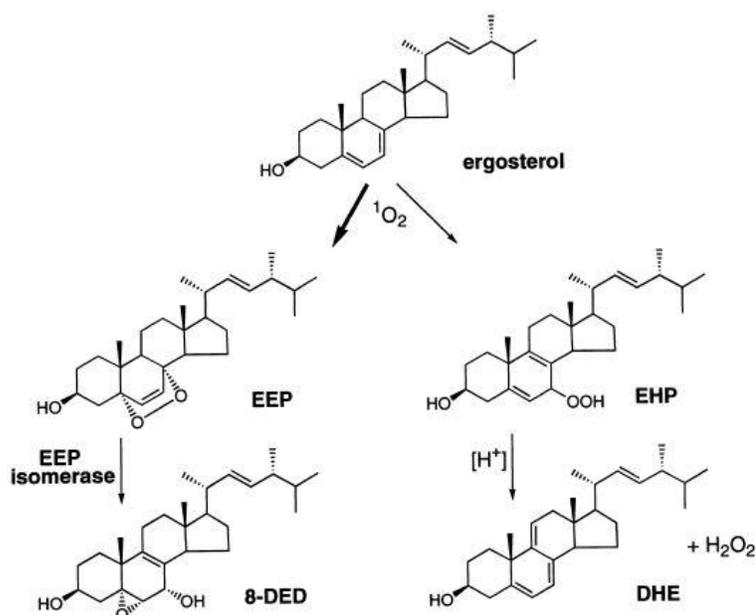


Figura 6. Productos de oxidación del ergosterol presente en la membrana plasmática de las células fúngicas por oxígeno singlete. Reproducido desde 38.

Un ejemplo reciente del estudio del efecto de la aPDT frente a *Penicillium digitatum* y *Botrytis Cinerea* fue realizado por Rapisarda *et al.*[39] en el cual a través de microscopía electrónica demuestran que en presencia del fotosensibilizador harmol y radiación UV, las conidias de los hongos patógenos presentan una pérdida de integridad de la membrana celular y desorganización del citoplasma entre otros efectos que finalmente provocan la inviabilidad de las conidias. Esta investigación en particular da a conocer que, si bien este compuesto presenta actividad fungicida en oscuro[40], la irradiación de este aumenta la eficacia del tratamiento, requiriéndose la mitad de la dosis del compuesto fotoactivado para provocar la misma inhibición que el compuesto en oscuro.

Debido a la naturaleza de la aPDT, la muerte celular se provoca por la degradación de diversas biomoléculas vitales para el hongo a causa de distintas especies reactivas de oxígeno como oxígeno singlete y peróxidos. Este mecanismo multifactorial y no específico tiene la ventaja de minimizar el

riesgo de producir cepas mutantes resistentes a este tipo de tratamiento[19, 41]. Otra ventaja que presenta la aPDT como tratamiento para hongos patógenos es que se puede optar por moléculas de origen natural como agentes fotoactivos, teniendo efecto inhibitorio hasta en concentraciones muy bajas, llegando a ser efectivos a concentraciones mínimas inhibitorias del orden micromolar[32, 33].

Uno de los fotosensibilizadores prometedores para su uso en la aPDT, es la riboflavina (RF), conocida más comúnmente como vitamina B<sub>2</sub>, la cual es un fotosensibilizador de origen natural perteneciente al grupo de las flavinas. El cromóforo común y que está presente en la RF corresponde a la isoaloxazina, la cual tiene un  $\lambda_{\max}$  de absorción de 445 nm; esta absorción provoca que la riboflavina se excite a un estado excitado S1 de alrededor de 5 ns de tiempo de vida en agua. La riboflavina posee un elevado rendimiento cuántico de cruce entre sistemas, con un valor de  $\Phi_{ISC}=0,67$ , generando un estado triplete con un tiempo de vida elevado de 15  $\mu$ s, y un rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete de  $\Phi_{\Delta}=0,68$  a 25 °C; características fotofísicas de esta molécula que la hacen una buena opción a la hora de utilizarla como fotosensibilizador[42, 43]. Cabe destacar que la RF en estado triplete es altamente oxidante, por lo que en presencia de biomoléculas da origen a reacciones de transferencia electrónica o de tipo I[43]. A pesar de esto, el estudio de la RF como fotosensibilizador en aPDT es escaso[44].

Otro fotosensibilizador con características prometedoras para ser utilizado en aPDT es la protoporfirina IX (PPIX). Se trata de un fotosensibilizador insoluble en agua, precursora de moléculas de importancia biológica como la hemoglobina, clorofila y citocromos, y biosintetizada por organismos a partir del ácido aminolevulínico[45]. Este fotosensibilizador posee un máximo de absorción en 405 nm y varias bandas de menor intensidad en el rango de 500 nm a 720 nm, presentando un pico de emisión de fluorescencia a 635 nm en DMSO[46]. Además se ha reportado que posee un rendimiento cuántico de

generación de oxígeno singlete de  $\Phi_{\Delta}=0,80$  en solución de agua/TX100[47], siendo su mecanismo de fotosensibilización principal el de tipo II. La PPIX ha sido estudiada y utilizada como agente fotosensibilizador endógeno en aPDT, a través de la inserción de ácido aminolevulínico en las células microbianas objetivo, molécula que actúa como profármaco provoca la acumulación de la PPIX, la cual puede fotosensibilizar la célula para producir su muerte[48]. Existen algunas desventajas en este método de aPDT, como por ejemplo que la célula objetivo pueda transportar el ácido aminolevulínico a su interior y además que deba poseer las enzimas necesarias para poder metabolizar el ácido aminolevulínico en PPIX, ya que el precursor no es fotodinámicamente activo[48]. Las estructuras de ambos fotosensibilizadores se pueden apreciar en la Figura 7.

El efecto de este fotosensibilizador en hongos ha sido estudiado y reportado por Blume-Petyavi *et al.* presentando un resultado de una inhibición máxima del 50% del crecimiento de *T. Rubrum*, sugiriendo que este resultado se debe a la poca acumulación del precursor en la célula fúngica, por tanto ocurriendo una menor acumulación de PPIX en ella[49]. Otro antecedente de Santoianni *et al.* del efecto de PPIX en células fúngicas de *Candida Albicans* sometidas a aPDT indica que a una dosis de precursor de 600 mg/mL, una incubación de 3 horas y la irradiación con luz, provoca un efecto inhibitorio total en las células fúngicas (sin desarrollo de colonias)[50]. A pesar del efecto antifúngico que presenta la PPIX, no se tiene evidencia de su acción inhibitoria en células fúngicas patológicas en plantas a través de aPDT.

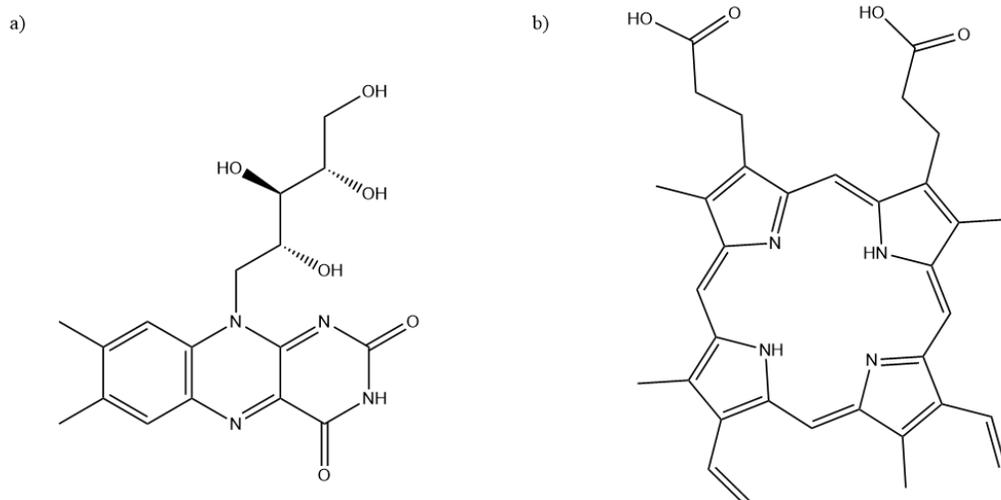


Figura 7. Estructuras químicas de a) Riboflavina y b) Protoporfirina IX.

A pesar de que no existe mucha investigación acerca del uso de fotosensibilizadores como sistemas fungicidas aplicados a hongos patógenos de importancia agrícola, estos se presentan como alternativas prometedoras a los fungicidas de uso actual. Actualmente no existen sistemas fungicidas basados en fotosensibilizadores disponibles en el mercado y su uso se limita solo a la investigación académica. Lo anterior puede deberse a que, de manera similar a la aPDT aplicada a bacterias, los fotosensibilizadores que no sean catiónicos presenten poca o nula interacción con las estructuras superficiales de las células de los hongos patógenos, las cuales como se describió anteriormente presentan grupos con carga negativa expuestos. Esto provoca que en algunos casos se necesite de concentraciones altas de fotosensibilizador para obtener resultados eficientes o tener que utilizar plataformas complementarias en la terapia como polímeros o nanopartículas.

Por tanto, los desafíos futuros en esta área radican en la exploración e investigación de sistemas eficientes basados en la terapia fotodinámica antimicrobiana aplicada en conjunto sistemas complementarios que suplan las desventajas de esta técnica, como por ejemplo la poca interacción de algunos fotosensibilizadores con las células fúngicas y por tanto su poca acumulación

en estas. Teniendo en vista el fin de volver esta técnica más atractiva en términos de eficiencia y costos para su uso real en las actividades de agricultura.

## **2.5 Quitosano como fungicida**

El quitosano es un polímero de origen natural correspondiente a los polisacáridos lineales, polímero basado en unidades repetitivas de glucosamina. El quitosano ha sido ampliamente utilizado como fungicida para la agricultura por sus propiedades antimicrobianas. Este polímero posee actividad fungicida reportada para una variedad de cepas de hongos, entre ellos *Fusarium Oxysporum*[51], *Botrytis cinerea*[52], *Monilinia laxa*[53], *Alternaria alterlata*[54] y *Penicillium digitatum*[55] entre otros[56]. Si bien no se conoce exactamente el mecanismo por el cual el quitosano ejerce su acción antifúngica, se han realizado una variedad de estudios intentando dilucidar distintos aspectos de este mecanismo fungicida. El primer efecto del quitosano al ser aplicado al fruto o planta, es un efecto de barrera física, la cual impide al patógeno entrar en contacto con zonas críticas de la planta. Dentro de este mismo efecto físico se ha reportado que el quitosano tiene un efecto acelerador de la curación de heridas superficiales en las plantas y frutos, ayudando así a la prevención de una infección por un hongo patógeno en la herida[57]. Por otra parte, también ha sido estudiado el efecto quelante del quitosano, formando complejos con nutrientes y minerales esenciales para el desarrollo de las colonias fúngicas como por ejemplo hierro y cobre[58]. Se debe considerar además que la capacidad fungicida de este polímero va a depender de varios factores como el peso molecular y el grado de acetilación[56].

Otro mecanismo de la actividad fungicida del quitosano se presenta esquematizado en la Figura 8. En primera instancia, el quitosano interactúa con la pared celular de la célula fúngica a través de la interacción electroestática de los grupos aminos protonados del quitosano con la

superficie negativa de la célula. Esta interacción desplaza los iones potasio de la superficie, lo que provoca un desequilibrio del potencial de membrana causando el ingreso de iones calcio y la expulsión de fosfatos y nucleótidos, provocando alteraciones en vías metabólicas del hongo y provocando finalmente su inviabilidad[59].

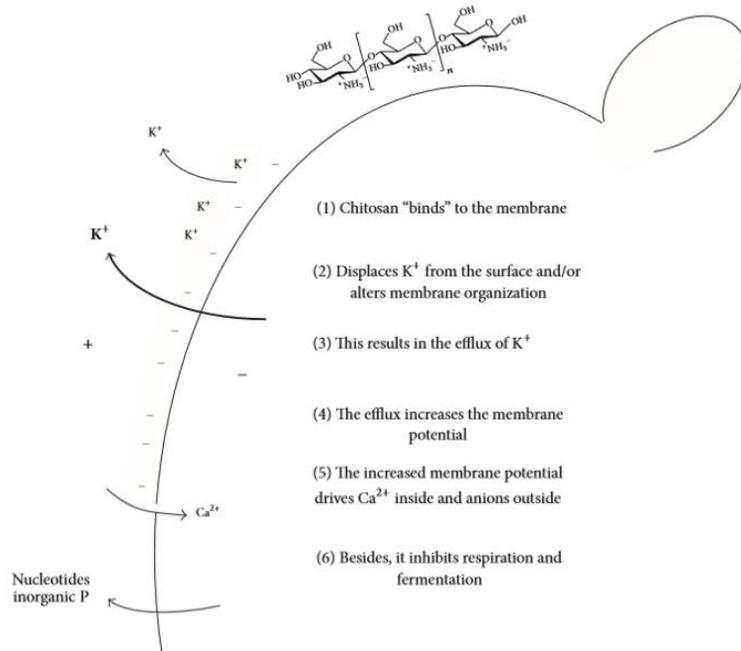


Figura 8. Mecanismo de acción fungicida del quitosano y sus pasos. Reproducido de <sup>58</sup>.

## 2.6 Uso de Polímeros y Fotosensibilizadores en conjunto en Terapia Fotodinámica

Existen antecedentes acerca del uso de conjugados químicos y mezclas físicas entre polímeros y fotosensibilizadores para su aplicación en PDT.

Utilizando el fotosensibilizador clorina e6 en conjunto con un derivado hidrofóbico de quitosano, en forma de mezcla física como nanopartículas y en forma de conjugado químico también con características de nanopartículas, se estableció que en el caso del conjugado químico se logró un mayor tiempo de circulación del fotosensibilizador y un mayor grado de acumulación en células

de cáncer epidermoide, aumentando así la eficacia terapéutica de la formulación[60].

Otro caso es la conjugación química de una porfirina de zinc con un copolímero fluorinado, la cual produce un aumento de la generación de oxígeno singlete casi al doble según el ensayo de seguimiento de la absorbancia de ABMA (9,10-anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid), una sonda para oxígeno singlete[61].

Solo un par de investigaciones se han dedicado a evaluar la aplicación de polímeros y fotosensibilizadores a la aPDT. Un ejemplo es la unión covalente del fotosensibilizador rosa de bengala con un derivado policatiónico del quitosano, aplicado en aPDT para los organismos bacterianos *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, obteniendo una mejor incorporación y una generación de oxígeno singlete más eficiente y localizada para el caso del conjugado polímero-fotosensibilizador[62]. Otros ejemplos más recientes describen el uso de quitosano cuaternizado y quitosano carboximetilado en conjunto con ftalocianinas de zinc (II) unidas covalentemente a los polímeros para el control de *Candida Albicans*, logrando un control efectivo de este hongo patógeno[63, 64] El último ejemplo trata de una mezcla física entre el quitosano y la clorofilina, logrando un efecto antimicrobiano en *L. monocytogenes in vitro* y en frutillas [65, 66]. Ninguno de los casos anteriores ha probado el efecto de la unión química de fotosensibilizador y polímero en la eficacia de la aPDT contra hongos patógenos en plantas y/o frutas; considerando esto, se hace imperativo ahondar más en esta área para desarrollar nuevas formulaciones conjugadas de fotosensibilizador-polímero que puedan servir como una alternativa más sustentable a los actuales fungicidas. Cabe destacar que en la mayoría de estos estudios no existe un enfoque a la explicación fotofísica de por qué la generación de oxígeno singlete aumenta en presencia de polímeros, si no que los autores dirigen su atención a la efectividad fungicida como tal.

### **3. Hipótesis**

Los conjugados Fotosensibilizador-Quitosano presentarán mayor fotoactividad comparados con el fotosensibilizador correspondiente en solución, provocando una mayor actividad fungicida *in vitro* que sus partes por separado.

### **4. Objetivos**

#### **4.1 Objetivo general**

Desarrollar formulaciones fungicidas basadas en conjugados entre fotosensibilizadores y quitosano y evaluar su efecto fotodinámico frente a *Penicillium Digitatum*.

#### **4.2 Objetivos específicos**

1. Sintetizar el conjugado químico quitosano-riboflavina.
2. Sintetizar el conjugado químico quitosano-protoporfirina IX.
3. Caracterizar estructural y fotofísicamente los conjugados.
4. Determinar la generación de oxígeno singlete y compararla con los fotosensibilizadores en solución.
5. Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias y porcentajes de inhibición *in vitro* de los conjugados químicos frente a cepas de *Penicillium digitatum* y compararlas con el quitosano y el fotosensibilizador por separado.
6. Comparar la efectividad de los conjugados químicos fotosensibilizador-polímero con un tratamiento convencional.

# **CAPÍTULO II. MATERIAL Y MÉTODOS**

## **5. Material y Métodos**

### **5.1 Formación de quitosano de bajo peso molecular:**

Se utilizó el protocolo de hidrólisis de quitosano reportado por Li et. al[67]. Se agregó suficiente KCl para obtener una concentración de 0,15 mol/L de Cl<sup>-</sup> en 100 mL de solución de quitosano al 2% en Ácido acético 2%. Esta solución se llevó al interior de un horno microondas convencional y se calentó a 100°C durante 25 minutos. Posteriormente la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se liofilizó para su almacenamiento.

### **5.2 Caracterización del quitosano:**

El quitosano fue caracterizado a través de la determinación de su peso molecular por viscosimetría. El grado de desacetilación (DD) fue determinado por RMN[68] utilizando la siguiente fórmula.

$$DD (\%) = [1 \times (6 \times A_2/3 \times A_1)] \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde A<sub>1</sub> es la integración de las señales correspondientes a los protones de los carbonos C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> del quitosano y A<sub>2</sub> es la integración de la señal correspondiente a los protones del metilo presente en el monómero acetilado del quitosano.

### **5.3 Síntesis y purificación del conjugado Riboflavina-quitosano:**

La síntesis total de este conjugado se divide en la derivatización de la riboflavina con PMPI, la síntesis del quitosano tiolado y finalmente la unión covalente de estos para obtener el conjugado final.

#### **5.3.1 Síntesis de RF-PMPI:**

La síntesis del derivado de RF se realizó a través de una versión modificada del método descrito por Schoichet y Lévesque[69]. Se masan 10 mg de RF y se disuelven en 5 mL de DMSO anhidro a 45°C en un balón de reacción, se

aplica agitación hasta disolver totalmente la RF y el balón se purga desplazando el aire en su interior con N<sub>2</sub>. Se masa un equivalente molar de PMPI (5,7 mg) y se disuelven en 1 mL de DMSO anhidro, luego este se agrega mediante jeringa al balón de reacción. Se agregan finalmente 10 µL de catalizador dilaurato de dibutilestano (DBTDL por sus siglas en inglés) mediante jeringa al balón de reacción. La reacción se lleva a cabo durante 24 horas bajo atmósfera inerte y protegiendo al balón de la luz. El producto de reacción del balón se diluye por lo menos 10 veces con agua destilada, se mezcla hasta obtener una solución homogénea y se trasvasija a un embudo de separación. Se realizan extracciones por solvente utilizando acetato de etilo recuperando la fracción superior y concentrándola mediante un evaporador rotatorio. La fracción concentrada es separada mediante TLC preparativa utilizado como fase móvil Acetato de etilo:Metanol 9:1. El producto se caracterizó por RMN.

### **5.3.2 Síntesis Quitosano tiolado:**

La síntesis del quitosano tiolado (CH-SH) se realizó según el método reportado por Zhiran Xu et al[70]. Se agregan a un vial 1 mL de ácido tioglicólico (TGA), 3,5 mg de EDC y 2 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS), disueltos en 2 mL de DMF. Se mantiene esta mezcla en agitación durante toda la noche, produciendo el NHS-éster requerido para la tiolación del quitosano. Se masan 500 mg de CH y se mezclan con 4 mL de HCl 1 M en un vaso precipitado. Se agregaron 20 mL de agua destilada y se agita la solución por varios días hasta obtener una solución homogénea de CH 2,5% en masa. Se lleva esta solución a pH 5 agregando cuidadosamente NaOH 10 M. Finalmente se agrega el reactivo NHS-éster a la solución y esta se deja agitando durante 24 horas. La separación del quitosano tiolado de los precursores de tiolación se realiza a través de diálisis. El producto de reacción es trasvasiado a una bolsa de diálisis y se dializa con 600 mL de HCl 5 mM, HCl 5 mM con 1 % de NaCl y 3 veces con HCl 1 mM, procurando que cada diálisis se realice durante una hora

y la última dejándola dializar toda la noche. El contenido de la bolsa se extrae a un contenedor adecuado para su almacenamiento.

El cálculo de la concentración de grupos tioles libres en el quitosano se realizó mediante el método de Ellman modificado[71]. Se utiliza el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico DTNB por sus siglas en inglés) el cual reacciona con grupos tioles libres, dando un producto coloreado (ácido tionitrobenzoico TNB). Utilizando en este caso un buffer pirofosfato de pH 9 y considerando un  $\epsilon$  de  $14.150 \text{ M}^{-1}$  a 412 nm para el producto coloreado de la reacción de Ellman, la concentración de grupos tioles libres en la muestra de quitosano tiolado se puede determinar a través de la ley de Lambert-Beer. La reacción que se lleva a cabo en este ensayo se presenta en la Figura 9. Cabe destacar que este ensayo determina la concentración de grupos tioles libres de manera aproximada debido a la parcial precipitación del quitosano al pH en el que se realiza el ensayo.

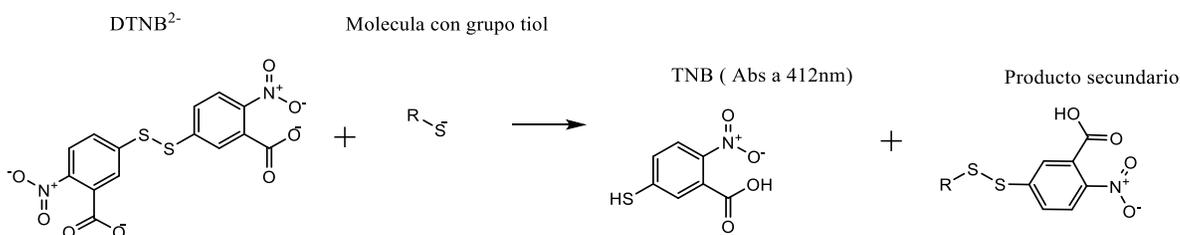


Figura 9. Reacción del reactivo de Ellman para determinación de grupos tioles libres.

### 5.3.3 Síntesis conjugado CH-RF:

Una solución de quitosano tiolado al 2% (500 mg) se ajustó a pH 6 con KOH 1 M mientras la solución es agitada, procurando no formar precipitados en exceso. El producto RF-PMPI (32  $\mu$ moles RF-PMPI) se solubilizó en la menor cantidad posible de DMSO y se agrega a la solución de quitosano tiolado. La solución se deja en agitación, bajo temperatura ambiente, protegida de la luz y en atmósfera inerte de  $\text{N}_2$  durante toda la noche. La solución resultante se somete a diálisis durante 6 horas con 600 mL de agua destilada, cambiando

el medio cada 2 horas y protegiendo el producto de la luz. Finalmente, la solución se puede almacenar en frío o liofilizar. El cálculo de la concentración de RF en el producto se realizó a través de una curva de calibración de emisión de fluorescencia de RF-PMPI a 524 nm.

#### **5.4 Síntesis Conjugado PPIX-CH:**

Se masaron 31,8 mg de PPIX y son agregados a una solución que contiene 0,1 g de quitosano en 5 mL de ácido acético 1%, obteniendo una relación molar PPIX:Unidades glucosamina 0,1:1. Luego se agregaron 10 mg de EDC a la solución anterior, obteniendo una relación molar PPIX:EDC 1:1. Posteriormente se diluyó la solución en un volumen equivalente de metanol y se mantuvo en agitación constante, protegido de la luz y a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, la solución se precipita con una mezcla 7:3 de metanol:amoníaco en un volumen equivalente a la solución que se quiere precipitar. Se filtra el precipitado y se lava reiteradas veces con agua, metanol y éter hasta que el líquido filtrado no presente coloración. Finalmente, el precipitado se seca y se almacena en desecadora.[72] El cálculo de la concentración de PPIX en el conjugado se realizó a través de una curva de calibración de emisión de fluorescencia de PPIX a 630 nm.

#### **5.5 Caracterización química de los conjugados:**

Para caracterizar y determinar que la conjugación química entre el quitosano y los distintos fotosensibilizadores se realizaron espectrometrías IR en pastillas aglomeradas con KBr prestando especial atención a las bandas características de los precursores y del producto final esperado. Además, se realizó una hidrólisis enzimática con pronasa a los conjugados para obtener los monómeros y así poder identificarlos a través de un análisis de masas con el fin de obtener evidencia específica de la unión de los fotosensibilizadores al quitosano. Esta determinación fue realizada a través del método reportado por

N. Tharanathan et. al.[73] 1 mg de pronasa se mezcla con una solución que contenga 100 mg del conjugado en 1% ácido acético ajustado a pH 3,5, esta solución se lleva a 37°C y es incubada durante 4 horas protegida de la luz. Luego, un equivalente en volumen de NaOH 2 M es agregado para detener la reacción y precipitar el quitosano de alto peso molecular. La mezcla es centrifugada a 1000 g durante 10 minutos y el sobrenadante es recuperado y separado por HPCL utilizando una columna de exclusión molecular (BioSep™ SEC-s3000 5 µm, 290 Å, 300 mm x 7,8 mm, Phenomenex) utilizando agua como eluyente. Las fracciones coloreadas son recuperadas y sometidas a LC-MS (AB Sciex 4500 QTrap® Mass Spectrometer equipado con Turbo Ion Spray) para determinar la masa molar de la fracción.

#### **5.6 Caracterización Fotofísica:**

Se determinaron los espectros de absorción a los fotosensibilizadores por sí solos y a los conjugados químicos obtenidos, prestando especial atención a detectar si existen corrimientos en las longitudes de onda de absorción máxima o en la forma de los espectros. Luego de caracterizada la absorción de los conjugados químicos, se determinó los espectros de emisión de fluorescencia para cada uno de los fotosensibilizadores utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 450 y 524 nm para los sistemas de RF y 408 y 635 nm para los sistemas de PPIX respectivamente, detectando cualquier cambio en la longitud de onda de emisión máxima o en la forma de los espectros. Para todos los casos se utilizó un ancho de banda de 49,5, un promedio de 3 medidas y una velocidad de 500 nm/min a temperatura ambiente. Las mediciones de los sistemas RF se hicieron en solución acuosa y las de los sistemas PPIX se realizaron en soluciones 2% Ácido acético/1% tween. Además, se determinó el tiempo de vida de fluorescencia de los distintos sistemas, utilizando como fuente de excitación un láser de 450 nm para los sistemas de RF y un láser de 570 nm para los sistemas PPIX y la

anisotropía de fluorescencia resuelta en el tiempo para caracterizar la viscosidad del microambiente.

### 5.7 Determinación de Oxígeno singlete:

La generación de oxígeno singlete se determinó mediante el seguimiento de la disminución de la emisión de la sonda fluorescente ácido 9,10-antraceniilbis(metileno)dimalónico (ABMA) a 412 nm, la cual reacciona con oxígeno singlete, el cual se generará irradiando la muestra con un equipo PTI con una lámpara de Xenón de 150 W, seleccionando la longitud de onda indicada para cada fotosensibilizador con un monocromador. Se realizaron experimentos por triplicado para cada sistema.

### 5.8 Fotodegradación

Para determinar los perfiles de Fotodegradación y rendimientos cuánticos, se irradiaron soluciones de RF y CH-RF en agua a pH 5,5 y PPIX y CH-PPIX en 2% Ácido acético/1% Tween pH 4,5 ajustadas a una absorbancia de 0,3 a las longitudes de onda de los filtros correspondientes. Se utilizaron filtros de interferencia de 450 nm para el caso de los sistemas de riboflavina y 589 nm para los sistemas de protoporfirina IX, esto con el fin de obtener una irradiación de luz monocromática. La irradiación se realizó durante 1 hora midiendo absorbancia cada 5 minutos a las longitudes de onda establecidas. Se realizaron duplicados para cada sistema. La ecuación utilizada para calcular el rendimiento cuántico y la intensidad absorbida se presentan en la Ecuación 2. Intensidad inicial determinada por radiómetro Delta OHM modelo HD 2302.0

$$\phi_{pd} = \frac{\text{No.moléculas de PS degradado}}{\text{No.Fotones absorbidos}} = \frac{-d[A]/dt}{I_{abs}} \quad \text{Ecuación (2)}$$

$$I_{absorbida} = I_{inicial} (1 - 10^{-Abs \ 450 \ nm})$$

### **5.9 Aislamiento e identificación de *Penicillium digitatum*:**

Se seleccionaron diferentes frutas contaminadas con el hongo patógeno y se realizarán raspajes por triplicado con bisturí estéril, directamente a Agar Sabouroud Dextrosa (denominado S4%) mediante siembra por corte. Estas siembras se dejan incubar a 30°C entre 5 a 7 días procurando vigilar el crecimiento de estas. Luego se seleccionan las colonias más aisladas, comprobando su diámetro, color, ancho, micelas algodonadas y desarrollo de esporas. Estas colonias son repicadas en otras placas Petri para su mejor aislamiento. Luego del tiempo de incubación, las colonias se identifican microscópicamente mediante un frotis con un hisopo estéril directamente desde la placa Petri a un portaobjetos, teñido con Azul de Lactofenol y llevado a observación bajo microscopio. Finalmente se seleccionan las mejores colonias candidatas según morfología y se aislarán en tubos de ensayo con agar S4% expandido y mantenidas de 2 a 4 °C.

### **5.10 Determinación de la concentración de esporas:**

Con una espátula estéril se realizó un raspaje superficial del hongo incubado de 5 a 7 días, luego este raspaje se depositó en 10 mL de Tween 20 0,01% en agua estéril. La suspensión de esporas se filtró a través de gasa estéril. La cantidad de esporas fue determinada a través del conteo de éstas en un hemocitómetro o cámara de Neubauer. Luego de determinar la cantidad de esporas, se realizarán diluciones necesarias para ajustar a la concentración de esporas dependiendo del experimento que se vaya a realizar.

### **5.11 Optimización de concentraciones para tratamiento aPDT y concentraciones mínimas inhibitorias:**

Basado en el método descrito por Braga et al[32]. para determinar la concentración mínima inhibitoria de cada sistema, los experimentos se realizaron en placas de 96 pocillos en los cuales se agregaron en solución los sistemas de fotosensibilizador, polímero y el conjugado polímero-

fotosensibilizador a distintas concentraciones en presencia de  $1 \times 10^5$  esporas/mL de *Penicillium digitatum*. Las placas con los distintos sistemas se incubaron durante 1 hora y luego se sometieron a irradiación durante 1 hora, otra placa idéntica se utilizó de control en oscuro. Luego cada muestra se dejó en una placa Petri y por examen visual y/o análisis de turbidimetría se determinaron las concentraciones adecuadas para realizar los ensayos cuantitativos de efecto fungicida bajo aPDT.

#### **5.12 Evaluación del efecto fungicida fotodinámico en el crecimiento y morfología de los hongos patógenos\*:**

El efecto fungicida de los distintos sistemas se evaluó a través de la medición del diámetro de las colonias de *Penicillium digitatum* a los 7 días de crecimiento, en presencia o en ausencia del sistema fungicida y bajo irradiación o en oscuro.

En una placa de 96 pocillos se prepararon varios experimentos para determinar la actividad fotodinámica fungicida de los distintos sistemas. Cada set contiene un experimento de control de crecimiento, un experimento de la actividad fungicida de la riboflavina, del quitosano, del conjugado y de una mezcla física proporcional de los 2 componentes. Cada experimento se realizó por triplicado en la placa de 96 con una concentración de esporas de  $1 \times 10^4$  esporas/mL, agua y una concentración de los sistemas que se determinó previamente como indica el punto 5.11. Luego de preparados los distintos experimentos en la placa de 96, se procedió a incubar en oscuro durante una hora para luego someter a irradiación durante 1 hora la placa que corresponda al tratamiento aPDT y a guardar durante una hora en oscuro a la placa que corresponda al tratamiento sin luz. Luego de estos pasos, se sacaron alícuotas de 5  $\mu$ L de cada pocillo y se transfirieron a una placa Petri con agar S4% y fueron inoculadas al medio de esta. La incubación se realizó durante 7 días a 30°C para luego medir el diámetro de crecimiento de la colonia de *Penicillium digitatum* en cada placa. Cada Set de experimentos (Control, RF, CH<sub>H</sub>, CH-RF

y CH<sub>H</sub>/RF con y sin luz) se realizó 3 veces de manera independiente, obteniendo un total de 9 datos por cada experimento. De estos datos se obtendrán promedios, desviaciones estándar y Porcentajes de crecimiento.

Las condiciones para los experimentos con los sistemas RF se pueden ver en la Figura 10.

- Soluciones Stock:
  - Esporas: 5x10<sup>4</sup> esporas/mL
  - RF: 100 μM en H<sub>2</sub>O
  - CH 1% en H<sub>2</sub>O
  - CH-RF\* 1% en H<sub>2</sub>O
- Sistemas en Placa 96:
  - Esporas: 1x10<sup>4</sup> esporas/mL
  - RF: 21 μM
  - CH 0,5%
  - CH-RF\* 0.5%
  - CH/RF (0.5%/21 μM)
- Condiciones de experimento:
  - Tiempo de pre-incubación de 1 hora
  - Tiempo de irradiación para tratamiento aPDT 1 hora
  - Incubación a 30°C
  - Medición de diámetro de crecimiento desde los 5 días de incubación

\*4,2 μM RF/g CH<sub>H</sub>

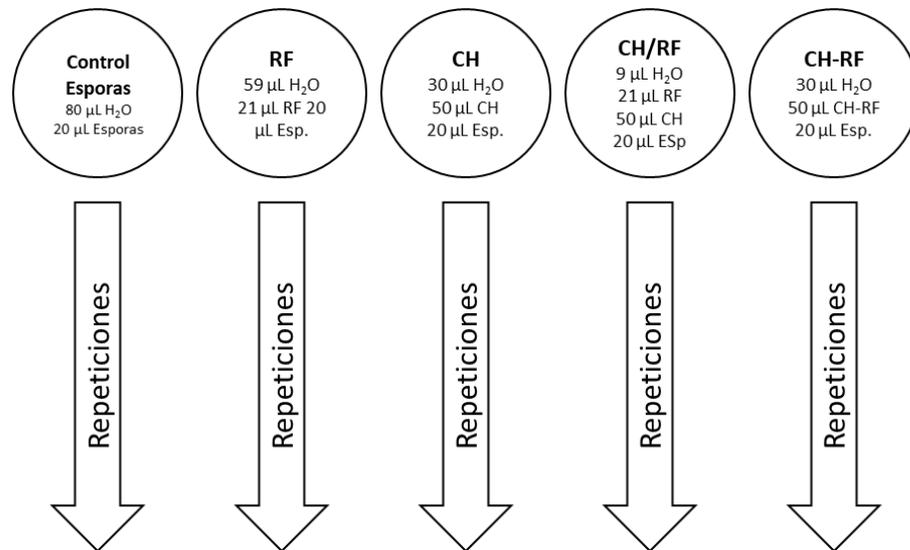


Figura 10. Representación de las distintas condiciones de crecimiento para los experimentos de crecimiento radial de *Penicillium digitatum* con sistemas RF.

Las condiciones para los experimentos con los sistemas PPIX se pueden ver en la Figura 11.

- Soluciones Stock:
    - Esporas:  $5 \times 10^4$  esporas/mL
    - PPIX: 11  $\mu$ M en Tween 1%/Ácido Acético 1%
    - CH  $2 \times 10^{-2}\%$  en Tween 1%/Ácido Acético 1%
    - CH-PPIX\*  $2 \times 10^{-2}\%$  en Tween 1%/Ácido Acético 1%
  - Sistemas en Placa 96:
    - Esporas:  $1 \times 10^4$  esporas/mL
    - PPIX: 2,8  $\mu$ M
    - CH  $5 \times 10^{-3}\%$
    - CH-PPIX\*  $5 \times 10^{-3}\%$
    - CH/PPIX ( $5 \times 10^{-3}\%$  /2,8 $\mu$ M)
  - Condiciones de experimento:
    - Tiempo de pre-incubación de 1 hora
    - Tiempo de irradiación para tratamiento aPDT 1 hora
    - Incubación a 30°C
    - Medición de diámetro de crecimiento desde los 7 días de incubación
- \*56  $\mu$ mol PPIX/g CH

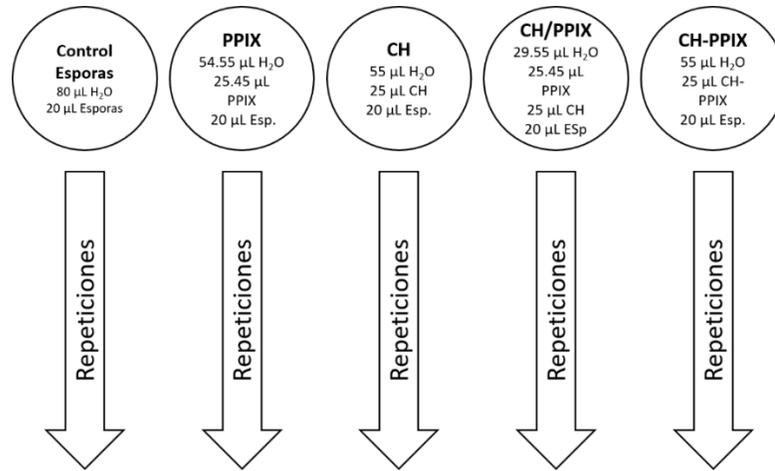


Figura 11. Representación de las distintas condiciones de crecimiento para los experimentos de crecimiento radial de *Penicillium digitatum* con sistemas PPIX.

\* Este experimento se debe realizar conociendo la cantidad de fotosensibilizador conjugado en el producto final.

### 5.13 Microscopía de Fluorescencia

Para dilucidar la interacción de los conjugados con las esporas del patógeno, se realizaron estudios de microscopía de fluorescencia con (Microscopio de Fluorescencia Carl Zeiss Axiostar Plus). Suspensiones de esporas de  $3 \times 10^6$  esporas/mL se trataron con las mismas concentraciones de conjugado de los estudios de efecto fungicida, fueron incubadas durante 1 hora y luego fueron centrifugadas y lavadas 3 veces para eliminar el exceso de conjugado. Luego

se resuspendieron en agua y se observaron a través del microscopio utilizando filtros de excitación y emisión de 450 y 510 nm para el conjugado CH-RF y filtros de 550 y 615 nm para el conjugado CH-PPIX. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software ImageJ para ajustar el brillo y el contraste utilizando los mismos valores para todas las imágenes.

# **CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **6. Resultados y Discusión:**

Los resultados presentados en esta sección corresponden a los resultados de la preparación del quitosano hidrolizado y luego los resultados correspondientes a los conjugados CH-RF y CH-PPIX, presentando los resultados en orden de realización, es decir Síntesis, Caracterización, Fotofísica y Fotoquímica y Evaluación de efectos fungicidas. Para este efecto, este capítulo se divide en 3 partes: Resultados de preparación de quitosano hidrolizado, CH-RF y CH-PPIX.

### **6.1 Hidrólisis del Quitosano y Caracterización.**

Según varios reportes en la literatura, los oligómeros de quitosano presentan mayor actividad fungicida que sus similares de mayor peso molecular[74, 75]. Esto posiblemente debido a que, además de su efecto a nivel superficial descrito en la sección 2.5, los oligómeros de quitosano se acumulan en la superficie de la célula fúngica para luego irrumpir en el interior de la célula y acumularse en el citoplasma[76], pudiendo intervenir con enzimas encargadas del crecimiento del hongo[77].

Además de lo anterior, someter al quitosano a hidrólisis, disminuye su peso molecular y por tanto aumenta su solubilidad en agua. Esto posiblemente podría aumentar la eficiencia de las reacciones de conjugación que se realizarán. Estas son las razones por las cuales se decidió trabajar con quitosano hidrolizado y no con quitosano de peso molecular medio.

La hidrólisis fue realizada según el método descrito en 5.1. Luego de la hidrólisis, se determinó el nuevo peso molecular del quitosano hidrolizado a través de viscosimetría (Tabla 2) utilizando la fórmula de Mark-Houwink, basados en los parámetros reportados por Pengcheng Li et al [67] y el grado de desacetilación a través de RMN (Figura 12).

Tabla 2. Datos de viscosimetría y Pesos moleculares viscosimétricos del quitosano

Sistema	t (s)	n <sub>r</sub>	n <sub>sp</sub>	[η]	Mw <sub>(v)</sub> g/mol	c g/mL	α	K
CH	132	5,07	4,07	3,69x10 <sup>4</sup>	39585	6,0x10 <sup>-5</sup>	0,96	1,424
CH <sub>H</sub>	51	1,96	0,96	2,53x10 <sup>3</sup>	2426	3,0x10 <sup>-4</sup>	---	---
Solvente	26	---	---	---	---	---	---	---

t: Tiempo de flujo de la muestra en el viscosímetro

n<sub>r</sub>: Viscosidad Relativa

n<sub>sp</sub>: Viscosidad específica

[η]: Viscosidad intrínseca

α y K: Constantes de la ecuación de Mark-Houwkin para el sistema Polímero-Solvente utilizado

El peso molecular inicial del quitosano era de aproximadamente 40000 g/mol, luego de la hidrólisis se determinó que el peso molecular bajó a 2400 g/mol.

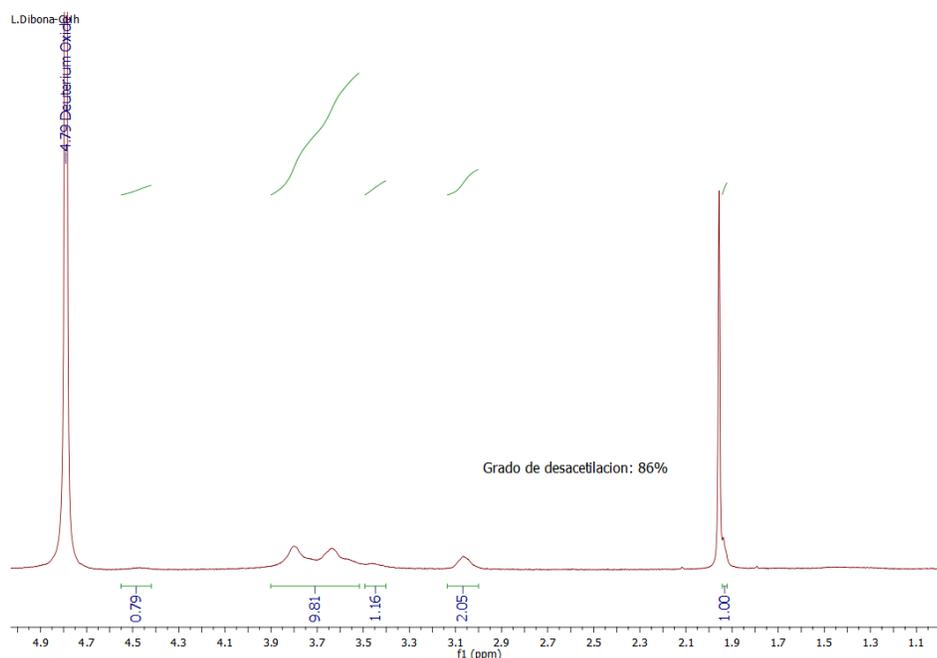


Figura 12. Espectro H1 RMN del quitosano hidrolizado, valores de integraciones de señales correspondientes a las utilizadas por la ecuación en el punto 5.2 y grado de desacetilación calculado.

A través del análisis del espectro RMN presentado en la Figura 12 y utilizando la ecuación 1, se determinó que el grado de desacetilación del quitosano hidrolizado es de un 86%. Este valor coincide con el intervalo de valores reportado por el proveedor (75%-85%, Sigma Aldrich). Considerando el peso molecular calculado para el quitosano hidrolizado y el grado de desacetilación, la composición porcentual de los monómeros en el polímero es la siguiente (detalle de los cálculos en Anexo):

Composición Porcentual de componentes en Quitosano:

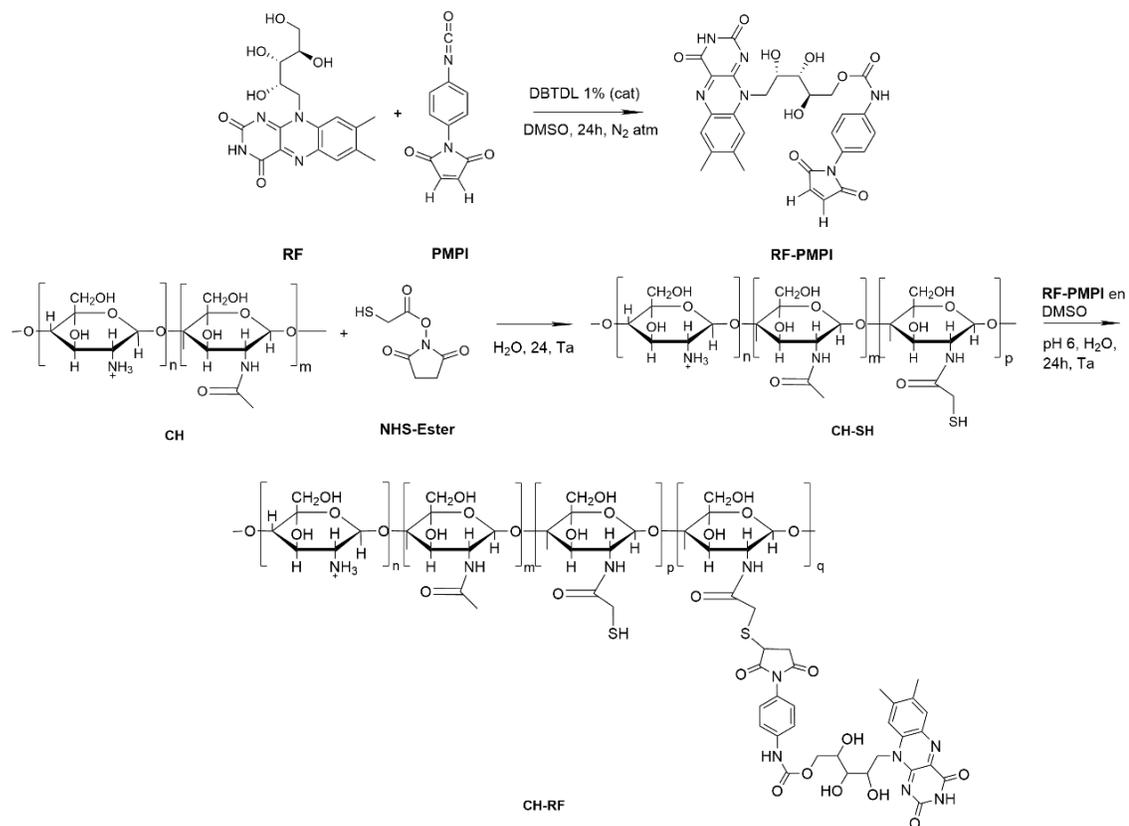
86% GlcN ( $3,54 \times 10^{-4}$  moles GlcN en 1 g CH)

14% GlcNAc ( $5,8 \times 10^{-5}$  moles GlcNAc en 1 g CH)

**CONJUGADO DE  
RIBOFLAVINA  
CH-RF**

## 6.2 Conjugado CH-RF

La síntesis del conjugado CH-RF se llevó a cabo en 3 pasos: la síntesis del quitosano tiolado, la síntesis del derivado Riboflavina-PMPI (RF-PMPI), y finalmente la conjugación de estos 2 productos.



Esquema 1. Diagrama de síntesis general del conjugado CH-RF.

### 6.2.1 Síntesis del quitosano tiolado

La síntesis del quitosano tiolado se llevó a cabo según el procedimiento 5.3.2. Después de la diálisis del producto de tiolación, este se liofilizó para almacenarlo en forma de sólido. Se realizó un ensayo de determinación de grupos tioles libres por el método de Ellman.

A través de este análisis se obtiene que en el quitosano tiolado hay una concentración de  $6,52 \times 10^{-5}$  M de grupos tioles libres. Posteriormente se

realizaron los cálculos necesarios (detalles en Anexo) para obtener los moles de cada componente en 1 g de quitosano y luego se calculó la composición porcentual de cada componente en el quitosano tiolado presentada a continuación. Cabe debe destacar que los moles obtenidos de grupos tioles ( $6,52 \times 10^{-5}$  moles) se restaron directamente de los moles de glucosamina ( $3,54 \times 10^{-4}$  moles) bajo la lógica de que este es el único monómero del quitosano en donde puede ocurrir la reacción de tiolación.

GlcN: 70% ( $2,89 \times 10^{-4}$  moles en 1 g de CH-SH)

GlcNAc: 14% ( $5,8 \times 10^{-5}$  moles en 1 g de CH-SH)

GlcN-SH: 16% ( $6,52 \times 10^{-5}$  moles en 1 g de CH-SH)

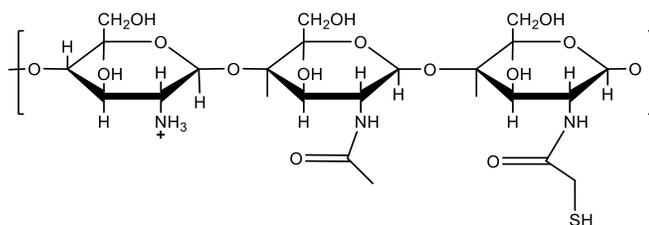


Figura 13. Diagrama representativo de los distintos monómeros que posee el quitosano tiolado.

Luego de cuantificar los grupos tioles libres del quitosano modificado, se realizó un espectro FTIR por pastillas aglomeradas con KBr para confirmar la presencia de estos grupos tioles, como se puede apreciar en la Figura 14.

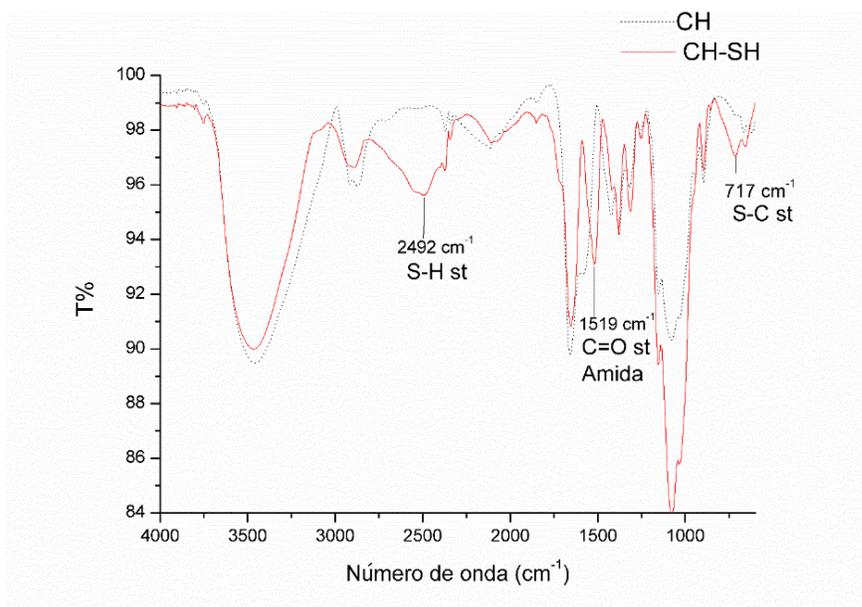


Figura 14. Espectro FTIR del quitosano (CH) y del quitosano Tiolado (CH-SH) Las bandas importantes para la caracterización del quitosano tiolado están destacadas con el número de onda y al grupo que corresponden.

Las señales a las que hay que poner atención para evidenciar que la reacción de tiolación se llevó a cabo son las señales correspondientes a la vibración del enlace S-H localizada a  $2492\text{ cm}^{-1}$  la cual es la principal evidencia de la inserción de grupos tioles en el quitosano. De manera secundaria también se puede apreciar la vibración del enlace S-C en  $717\text{ cm}^{-1}$  [78] que reafirma que el quitosano reaccionó de la manera esperada.

### 6.2.2 Síntesis del Derivado Riboflavina-PMPI

La síntesis del derivado RF-PMPI se llevó a cabo según método 5.3.1. La riboflavina junto al PMPI y el catalizador DTDBL se dejaron reaccionar en atmósfera de  $\text{N}_2$ , protegido de la luz y a  $45^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Luego del tiempo de reacción la mezcla que contiene el producto y los precursores que no reaccionaron fue llevada a un embudo de separación y fue diluida con agua 10 veces. En este punto, para tener una idea de las polaridades de los distintos componentes de la mezcla de reacción, se calcularon los coeficientes de reparto octanol/agua de cada molécula presente en la mezcla de reacción,

estas son: RF, PMPI y RF-PMPI. El programa utilizado fue Marvin Sketch a través del método Consensus y los valores son presentados en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de coeficientes de reparto de los distintos componentes de la mezcla de reacción de la derivatización de RF-PMPI.

Molécula	LogP
RF	-0,92
PMPI	1,16
DTDBL <sup>a</sup>	3,12
RF-PMPI	0,7

<sup>a</sup> Valor obtenido desde [79]

Considerando que el coeficiente de reparto octanol/agua es un indicativo de la polaridad de la molécula, se puede inferir entonces que la riboflavina es la molécula más polar de la mezcla de la reacción, el PMPI es más apolar que la riboflavina y que el producto tiene una polaridad intermedia a estos dos.

Se realizaron extracciones con acetato de etilo y recuperando la fracción superior, luego los extractos fueron concentrados en rotavapor y separados por cromatografía preparativa de placa utilizando como eluyente acetato de etilo: metanol 9:1. La separación del extracto concentrado se presenta en la Figura 15.

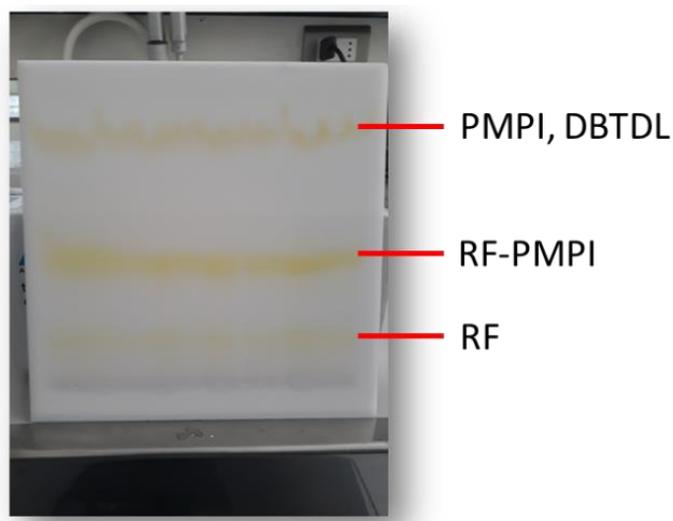


Figura 15. Separación por cromatografía preparativa de placa fina del extracto orgánico de reacción RF-PMPI. Fase móvil Acetato de Etilo:Metanol 9:1.

Considerando las polaridades de las distintas moléculas representadas por su coeficiente de reparto y que la fase móvil acetato de etilo:metanol 9:1 es apolar, lo que se esperaría es que los componentes más apolares sean los que eluyan más y que los más polares sean retenidos por la sílica. Esta idea es apoyada por el hecho de que, al someter a esta placa a una lámpara de luz Ultravioleta, las primeras 2 fracciones (la inferior y media) presentan la fluorescencia característica de la Riboflavina (emisión de luz verde) mientras que la fracción superior no presenta fluorescencia alguna. Considerando estas evidencias, se concluyó que la fracción superior corresponde al PMPI sin reaccionar, DBTDL (especies con alto valor de  $\log P$ ), la fracción intermedia corresponde al producto RF-PMPI ( $\log P$  intermedio entre RF y PMPI) y la fracción inferior corresponde a la riboflavina sin reaccionar (valor bajo de  $\log P$ ).

La fracción media se raspó y recuperó disolviendo el RF-PMPI en metanol y luego eliminando el solvente por rotavapor. Se realizó un análisis de RMN en DMSO-d<sub>6</sub> a la fracción intermedia que contiene RF-PMPI, presentado en la Figura 16.

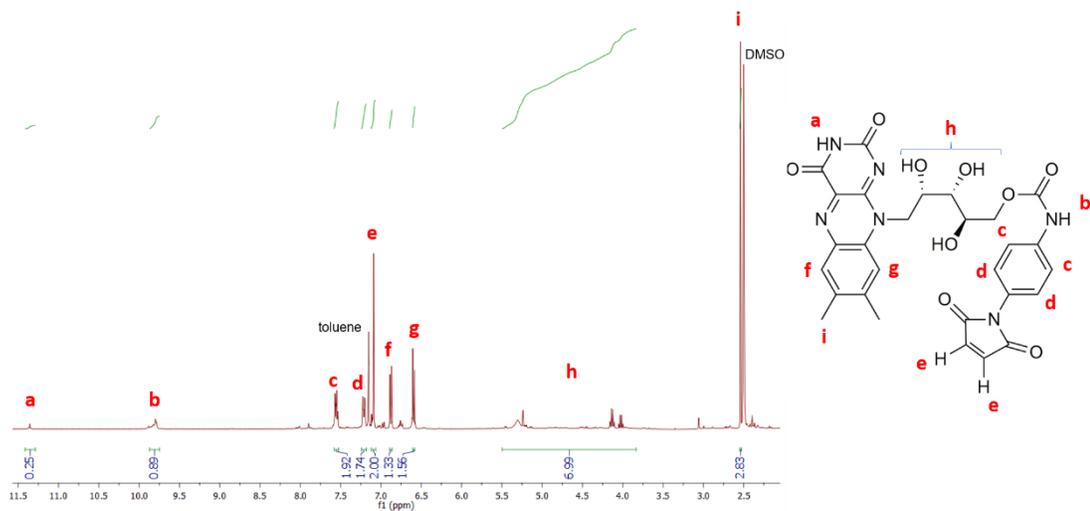


Figura 16. Espectro H1-RMN en DMSO-d<sub>6</sub> de RF-PMPI luego de separación por cromatografía preparativa en placa.

El sector aromático del espectro de RMN muestra señales características del PMPI y de la riboflavina como se puede apreciar en la Figura 16. La evidencia que la reacción ocurrió es la aparición de la señal del protón a 9,86 ppm (b) el cual es característico del enlace carbamato formado por la reacción entre el grupo isocianato del PMPI y el grupo OH primario de la riboflavina. En el sector alifático se pueden apreciar los protones (h) de la cadena ribitol de la riboflavina y en la señal alrededor de 2,5 ppm se aprecian los protones de los metilos del anillo isoaloxazina, uno de ellos estando superpuesto con la señal residual del solvente.

Luego de haber obtenido el quitosano tiolado y el derivado RF-PMPI, se procedió a realizar la síntesis del conjugado CH-RF.

### 6.2.3 Síntesis del Conjugado CH-RF

La síntesis del conjugado CH-RF se realizó según el protocolo 5.3.3. Luego de haber sometido al conjugado a una diálisis exhaustiva y a liofilización, se almaceno en frío para su posterior uso. Cabe destacar que el sólido presentaba coloración amarilla típica de la riboflavina. Al igual que con el quitosano tiolado, se realizó una espectrometría FTIR para determinar si la

conjugación se llevó a cabo. Este análisis se realizó de manera similar al realizado en el quitosano tiolado, ocupando pastillas de KBr como aglomerante para la muestra. El espectro se puede apreciar en la Figura 17.

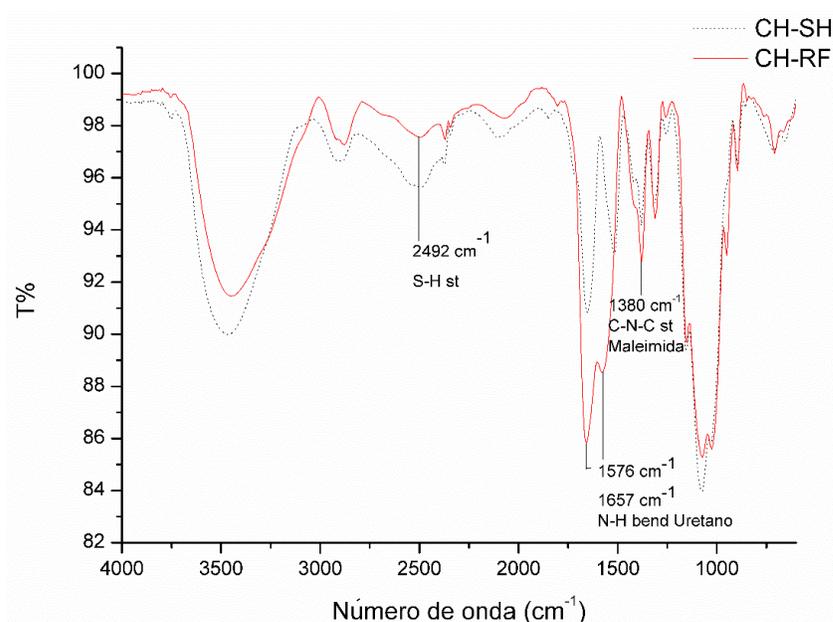


Figura 17. Espectro FTIR del quitosano tiolado (CH-SH) y del conjugado con riboflavina (CH-RF)

La evidencia principal que se puede extraer de este espectro para apoyar la idea de que la conjugación química del RF-PMPI con el CH-SH se llevó a cabo es la disminución de la intensidad de la señal S-H en  $2492\text{ cm}^{-1}$  [78], la cual es indicativo de que ocurrió una disminución de los grupos tioles libres disponibles. Es de esperar que esta disminución sea debido a que los grupos tioles reaccionaron con el grupo maleimida del RF-PMPI, el cual es especialmente reactivo ante grupos tioles libres. Además, como se puede apreciar en la Figura 17, se destacan las señales correspondientes a la vibración del enlace C-N-C a  $1380\text{ cm}^{-1}$  [80] característico de la maleimida presente en el agente acoplante PMPI. El análisis de la disminución de la señal correspondiente al grupo S-H es un indicativo de la formación del conjugado CH-RF.

De manera complementaria y en colaboración con el Laboratorio de Espectroscopía Vibracional de la Universidad de Chile se realizó un análisis por espectroscopia RAMAN al conjugado CH-RF, prestando especial atención a las señales características de este polímero modificado. Las señales de  $650\text{ cm}^{-1}$  y  $735\text{ cm}^{-1}$  dan cuenta del estiramiento del enlace C-S-C, el enlace que une la cadena principal del quitosano con el RF-PMPI. El espectro y los detalles de las asignaciones de bandas se encuentran en el Anexo.

Finalmente, se realizó una hidrólisis enzimática al conjugado, siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.5, con el fin de obtener el monómero del conjugado y así poder caracterizarlo. Luego de la hidrólisis y separación de fracciones por HPLC SEC, se recuperó la última fracción que presentaba absorción a  $450\text{ nm}$  y se sometió a espectrometría de masas acoplada a HPLC.

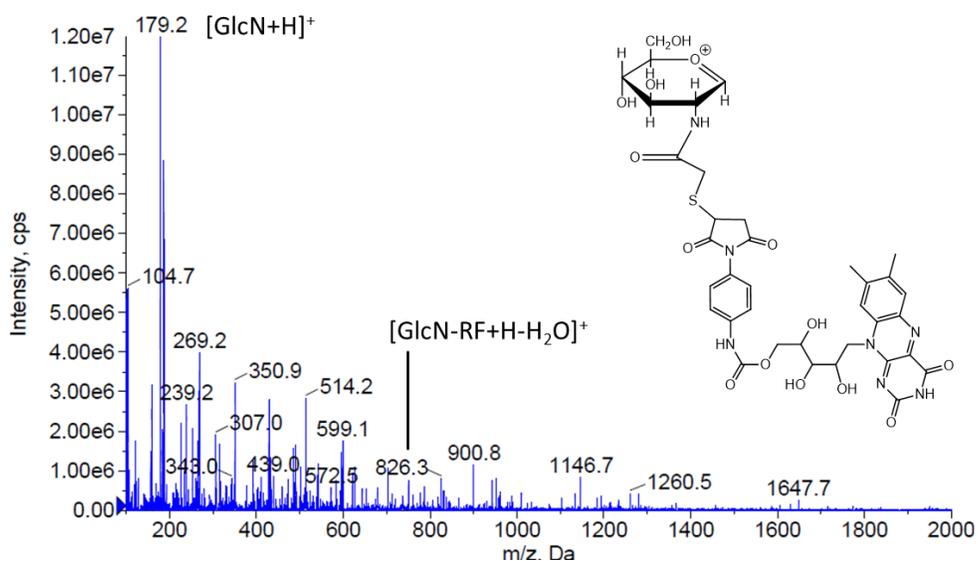


Figura 18. Espectro de masas de la fracción. Destacada la masa del monómero del conjugado CH-RF fragmentado.

Como se puede apreciar en la imagen, hay una pequeña señal la cual se puede atribuir al monómero de CH-RF con la sección de quitosano

presentando una fragmentación común en el anillo de glucosamina[81]. La conjugación de riboflavina al quitosano es solo de un 1%, es por esta razón que la señal correspondiente al monómero es de tan baja intensidad.

Luego de caracterizar estructuralmente el conjugado, se procedió a determinar la concentración de riboflavina presente en este. Para este propósito se utilizó una curva de fluorescencia basada en RF-PMPI presentada en la Figura 19.

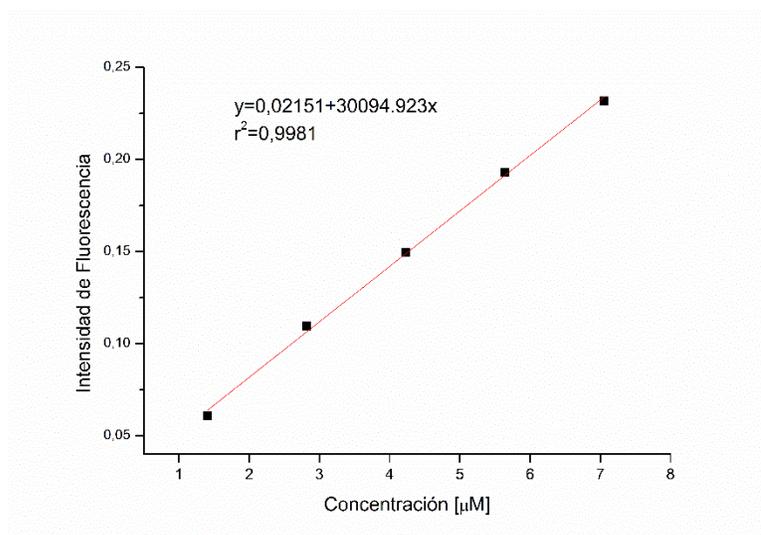


Figura 19. Curva de calibración de Emisión de fluorescencia a 524 nm de RF-PMPI en agua para determinación de RF en CH-RF.

Con este experimento se obtuvo una concentración de  $4,19 \times 10^{-6}$  moles de riboflavina/g CH, por tanto, la composición porcentual del conjugado final, considerando que la reacción de conjugación solo puede ocurrir en las unidades tioladas, queda de la siguiente manera:

GlcN: 70% ( $2,89 \times 10^{-4}$  moles en 1 g de CH-RF)

GlcNAc: 14% ( $5,8 \times 10^{-5}$  moles en 1 g de CH-RF)

GlcN-SH: 15% ( $6,1 \times 10^{-5}$  moles en 1g de CH-RF)

GlcN-RF: 1% ( $4,19 \times 10^{-6}$  moles en 1 g de CH-RF)

La composición porcentual molar de Riboflavina en el conjugado CH-RF es de 1%.

### 6.3 Caracterización Fotofísica del conjugado CH-RF

En primera instancia, se determinaron los espectros de absorción y de emisión del conjugado y se compararon con los espectros

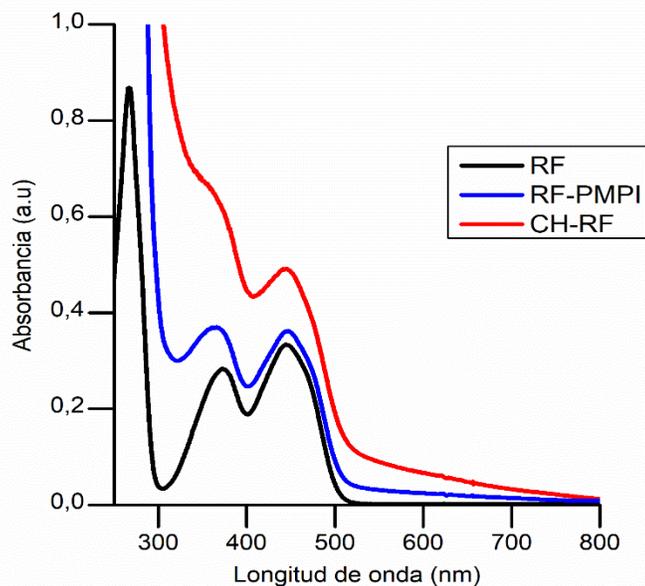


Figura 20. Espectros de absorción de RF (21  $\mu\text{M}$ ), RF-PMPI (21  $\mu\text{M}$ ) y CH-RF (1% m/v). RF y RF-PMPI preparados en DMSO y diluidos en solución acuosa.

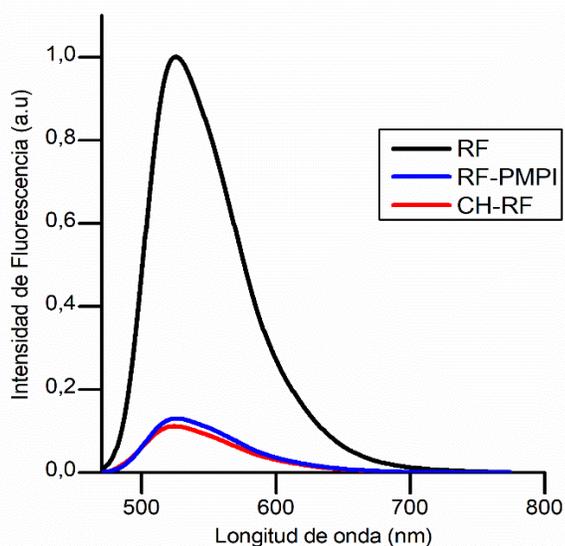


Figura 21. Espectros de emisión de fluorescencia de RF (21  $\mu\text{M}$ ), RF-PMPI (21  $\mu\text{M}$ ) y CH-RF (1% m/v). RF y RF-PMPI preparados en DMSO y diluidos en solución acuosa.  $\lambda$  Exc a 450 nm,  $\lambda$  Em a 524 nm.

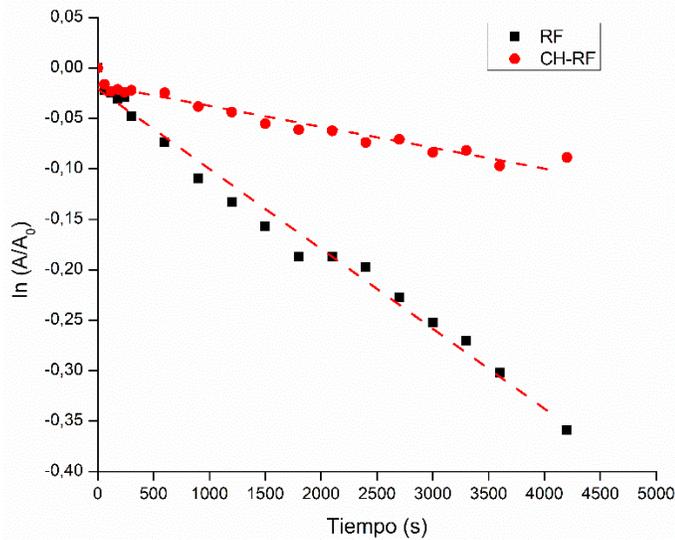


Figura 22. Fotodegradación de sistemas RF, datos linealizados. Filtro de irradiación de 450 nm, Intensidad de luz 22,08 W/m<sup>2</sup>.

También se realizó un ensayo para determinar los perfiles de generación de oxígeno singlete de la riboflavina y del conjugado CH-RF a través del seguimiento de la disminución de fluorescencia de la sonda sensible al oxígeno singlete ABMA (Figura 23).

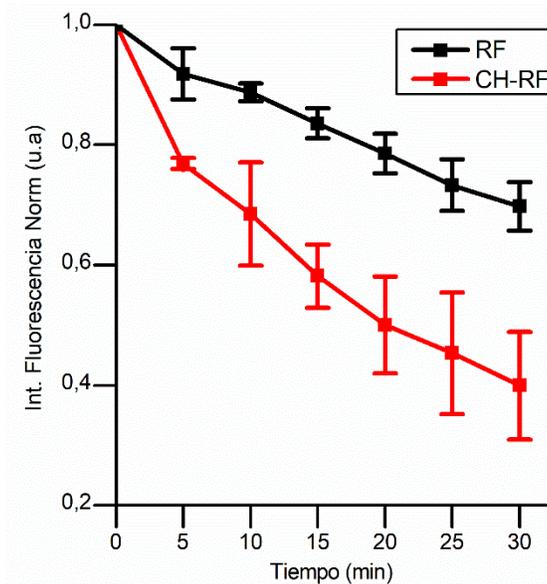


Figura 23. Perfiles de generación de oxígeno singlete de RF y CH-RF. Seguimiento de la disminución de la fluorescencia de ABMA a 412 nm.

Tabla 4. Tiempos de Vida de Fluorescencia y Anisotropía de los sistemas basados en Riboflavina en agua. Excitación a 357 nm y Medición de emisión a 524 nm

Sistema	$\tau$ (ns)	$\alpha_i$	$r_0$	$\phi$ (ns)	$r_\infty$
RF	4,8 (100%)	---	0,278	0,276	0
RF-PMPI	1,6 (18,4%)	0,033	0,276	0,374	0
	3,9 (81,6%)	0,146			
CH-RF	1,58 (25,8%)	0,046	0,237	0,485	0,011
	3,75 (74,2%)	0,132			

La Figura 20 muestra los espectros de absorción de los sistemas basados en riboflavina, se puede apreciar que la longitud de onda de absorción a 450 nm de la riboflavina no cambia considerablemente a medida que se va modificando primero con el PMPI y luego con la conjugación al quitosano. En el caso de la banda de absorción más cercana al azul, esta presenta un corrimiento hipsocrómico de alrededor de 10 nm. Se puede apreciar también que en el espectro de absorción del conjugado la línea base no vuelve a cero a longitudes de onda largas y además no presenta una definición clara de la banda alrededor de 350 nm, esto puede deberse al contenido de quitosano del conjugado el cual provoca una dispersión parcial de la luz al momento de realizar la medición en el espectrofotómetro.

En el caso de la Figura 21, es importante destacar que los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron a partir de las soluciones de los distintos sistemas con absorbancias a 450 nm ajustadas a 0,05 u.a para cada caso. En este caso el espectro se puede analizar bajo distintos enfoques. Se puede apreciar a primera vista que la derivatización de la riboflavina con el agente acoplante PMPI provoca una disminución notable de la fluorescencia, esto puede deberse a que: a) al derivatizar la riboflavina con el PMPI, la molécula se pliegue de tal manera que el anillo aromático del PMPI se

encuentre a la distancia necesaria del anillo flavina para que ocurra una interacción tipo  $\pi$ - $\pi$  stacking formando un complejo intramolecular que no presente emisión de fluorescencia o b) que el cromóforo de la riboflavina se encuentre con otra molécula de RF-PMPI y esta interactúe con el anillo aromático de la parte de PMPI de la RF-PMPI. El primer caso tratándose de un apagamiento estático y el último de un apagamiento dinámico.

Existe evidencia en la literatura que apoya la idea de que la riboflavina interactúa con otros compuestos aromáticos teniendo como consecuencia la disminución de la fluorescencia de esta[82, 83] por lo que es posible la idea de que la disminución de la fluorescencia de la riboflavina sea por efecto del anillo aromático utilizado como “spacer” o espaciador del agente acoplante PMPI.

Para confirmar la influencia del sector aromático del PMPI en la fluorescencia de la RF, de manera complementaria se realizó un experimento de apagamiento de fluorescencia para determinar mediante la ecuación de Stern-Volmer la constante de apagamiento  $K_q$  del sistema RF y PMPI. Según los resultados (gráfico y ecuación presentados en el anexo) la constante de apagamiento es de  $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , la cual indica una alta eficiencia del proceso de apagamiento de fluorescencia. Esto es indicativo que efectivamente el PMPI está involucrado en el proceso de apagamiento de fluorescencia del RF-PMPI.

Una forma de empezar a dilucidar el mecanismo del proceso de apagamiento de fluorescencia que está ocurriendo es mirar directamente a los valores de tiempos de vida de fluorescencia y compararlos en presencia y en ausencia del apagador o quencher. Según los resultados la riboflavina presenta un tiempo de vida de fluorescencia de 4,8 ns, mientras que el RF-PMPI presenta dos tiempos de fluorescencia de 1,6 ns y 3,9 ns. Este resultado indica 2 poblaciones de fluoróforos los cuales ven su fluorescencia apagada por distintos procesos. El tiempo menor de 1,6 ns puede deberse a la interacción intramolecular entre el anillo isoaloxazina y el anillo aromático del PMPI

facilitado por el plegamiento de la molécula, lo que provocaría una interacción tipo  $\pi$ - $\pi$  stacking que disminuiría el tiempo de vida del estado excitado singlete de la molécula, tratándose entonces de un quenching dinámico intramolecular.

Existe evidencia en la literatura de la existencia de un fenómeno conocido como auto-apagamiento intramolecular[84]. Este ocurre cuando en una misma molécula se encuentra un cromóforo fluorescente y una especie apagadora o quencher, separados por un espaciador basado en una cadena alquílica de longitud variable. En esa misma investigación, se reporta el apagamiento de fluorescencia de la fluoresceína unida por una cadena de 5 metilos a un grupo apagador 1,8-naftalimida. Los autores atribuyen este fenómeno a una transferencia electrónica de energía intramolecular (Intra EET por sus siglas en inglés). En el caso de este trabajo de tesis, la disminución de la fluorescencia del RF-PMPI (en el cual el cromóforo isoaloxazina de la RF y el sector aromático del PMPI están separados por la cadena ribitol de 5 carbonos), puede deberse a una transferencia electrónica desde la riboflavina como donador hacia el PMPI como aceptor. Esta explicación es apoyada por investigaciones en la literatura que reportan el apagamiento de la fluorescencia de la RF por interacciones con moléculas aromáticas como grafeno, fenoles, indoles y extractos aromáticos de plantas[82, 83], todas sugiriendo que ocurre una transferencia de carga desde la riboflavina hacia los compuestos aromáticos. Este tipo de fenómeno correspondería al tiempo más largo de fluorescencia de 3,9 ns.

Además, como se observa en la Tabla 4, los tiempos de vida de fluorescencia del RF-PMPI y el CH-RF son los mismos, se reafirma que el apagamiento es de naturaleza intramolecular ya que en el polímero el fluoróforo se encuentra inmovilizado en la cadena polimérica principal.

Se puede apreciar en la Figura 23 que el conjugado CH-RF presenta una mayor generación de oxígeno singlete que la riboflavina por si sola. Esto puede deberse a que el fotosensibilizador al estar inmovilizado en las cadenas de

CH, restringe las desactivaciones rotacionales del estado excitado triplete, lo que favorece otros mecanismos de desactivación como la generación de ROS y  $^1\text{O}_2$ , el último siendo confirmado en este experimento. Este resultado es prometedor ya que para la aplicación de aPDT, una mayor generación de oxígeno singlete significaría una mayor capacidad citotóxica del sistema.

Con respecto a la Fotodegradación de los sistemas RF, se puede apreciar en la Figura 22 que el conjugado CH-RF posee una tendencia a fotodegradarse en menor magnitud que la RF por sí sola como se aprecia en la Figura 22. Esto se comprueba calculando los rendimientos cuánticos de fotodegradación a través de la Ecuación 2, utilizando los datos ajustados a una cinética de pseudo-primer orden. Los valores son  $\phi_{pd} 4,04 \times 10^{-4}$  para la RF y  $\phi_{pd} 1,05 \times 10^{-4}$  para el caso del CH-RF. Esto nos indica que el conjugado es 4 veces más fotoestable que el fotosensibilizador por sí solo. La fotodegradación de la riboflavina ocurre a través de mecanismos de tipo I, provocando fotoreducciones, fotoadiciones y fotodesalquilaciones intramoleculares [85, 86], y según los experimentos realizados, la conjugación al quitosano favorece la desactivación del estado triplete a través de mecanismos del tipo II, por ende las desactivaciones de tipo I, que provocan la fotodegradación, deberían disminuir en consecuencia, explicando así la disminución en la fotodegradación del conjugado CH-RF.

Considerando estos resultados, se procedió a realizar los ensayos en *Penicillium digitatum* para evaluar la actividad fungicida del conjugado y compararla con los componentes en solitario.

#### **6.4 Evaluación de Actividad Fungicida de Sistemas basados en Riboflavina.**

En primera instancia, se realizaron ensayos preliminares para poder determinar la concentración a la cual se trabajará para el tratamiento aPDT del hongo patógeno. La optimización de concentración se realizó para el

conjugado CH-RF. Obteniendo la concentración óptima para este compuesto se pueden realizar los ensayos con Riboflavina y Quitosano igualando la concentración de riboflavina a través de los resultados presentados en 6.2.3 y de Quitosano a través de la concentración porcentual % m/v.

La optimización de la concentración de CH-RF para aPDT se realizó sometiendo al patógeno a concentraciones crecientes del conjugado y determinando su crecimiento a través de la medición de la turbidez provocada por el crecimiento micelar del hongo bajo cada tratamiento, si bien para el caso de los hongos patógenos esta no es una medición totalmente certera, nos puede dar un indicio de las concentraciones con las cuales se puede trabajar. Las condiciones del tratamiento aPDT fueron de pre-incubación durante 1 hora, irradiación durante 1 hora de incubación para crecimiento del hongo durante 1 semana. Como se puede apreciar en la Figura 24 se puede concluir que la inhibición del crecimiento de *Penicillium digitatum* presenta un comportamiento directamente proporcional a concentraciones crecientes del conjugado CH-RF. A través de este experimento se logró calcular el IC90 (concentración en la cual hay una inhibición de crecimiento del 90%) de CH-RF utilizando la herramienta online AAT Bioquest, Inc. Quest Graph™ IC50 Calculator, obteniendo el valor de 0,91% (m/v).

En esta investigación se quiere poner especial énfasis en el efecto de la luz en la actividad fungicida de los distintos sistemas basados en riboflavina, por lo que la concentración adecuada para esto debe ser la que presente mayor diferencia de inhibición en oscuro y con irradiación. Por esto es por lo que se escogió la concentración de 0,5% m/v de CH-RF para realizar todos los experimentos posteriores de aPDT ya que es la condición que mejor cumple el criterio antes mencionado tanto por análisis visual como por turbidez.

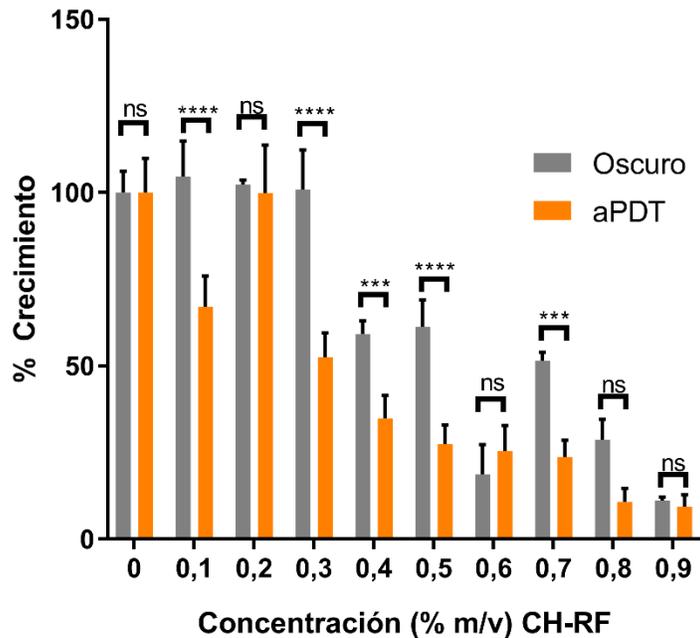


Figura 24. Optimización de concentraciones para aPDT de conjugado CH-RF.

La determinación de concentraciones óptimas para aPDT del conjugado de riboflavina se realizó con un tiempo de incubación de 1 hora y un tiempo de irradiación de 1 hora, estos valores fueron elegidos de manera arbitraria para realizar en primera instancia este experimento del cual se obtuvieron resultados satisfactorios.

Luego de definir los parámetros del tratamiento, se realizó la evaluación de la actividad fungicida de los distintos sistemas basados en riboflavina. La medición del crecimiento del patógeno se realizó midiendo el crecimiento radial del hongo a los 7 días de crecimiento a 30°C, como se indica en la sección 5.12

Además del tratamiento aPDT, se realiza un control en oscuro idéntico en otra placa para poder determinar la toxicidad en oscuro de los distintos sistemas. Cada tratamiento en la placa de 96 se realizó por triplicado. Cada experimento

(todos los tratamientos, en oscuro y en luz) se realizó 3 veces, obteniendo un total de 9 resultados para cada tratamiento.

Luego de una incubación de 7 días a 30°C, se procedió a determinar el crecimiento radial en cm de cada placa Petri y luego a través de una comparación con la placa de control de crecimiento (100% de crecimiento), se obtuvieron los porcentajes de crecimiento para cada tratamiento en oscuro y en luz, un resumen del análisis de los datos obtenidos y fotos representativas de cada placa son presentadas en la Figura 25

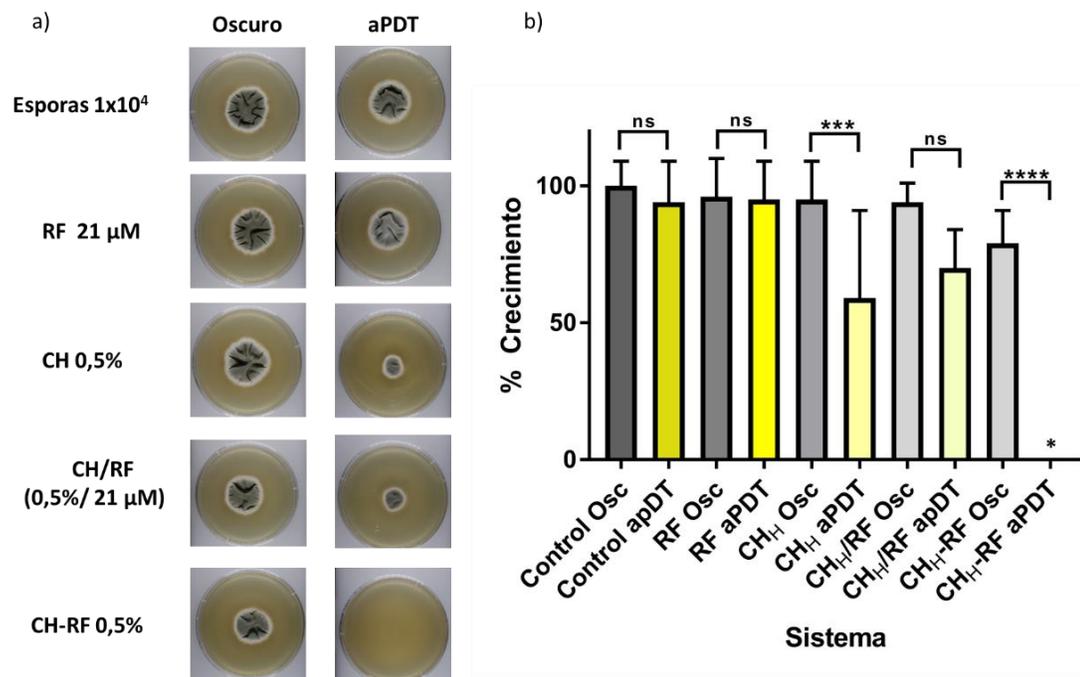


Figura 25. a) Fotos representativas de las placas Petri y el crecimiento radial. b) Porcentajes de crecimiento de *Penicillium digitatum* bajo tratamiento aPDT y oscuro con sistemas de RF. \* Las placas con el sistema CH-RF 0,5% no presentaron crecimiento alguno.

A continuación, se discutirán los resultados de los componentes por sí solos para luego dar paso al análisis del conjugado CH-RF.

La riboflavina en estas condiciones no presenta una inhibición del crecimiento significativa con respecto al control y tampoco presenta diferencia en la inhibición en presencia de luz o en oscuro en el tratamiento. Esto puede

deberse a que la riboflavina no presente una buena interacción con las células del hongo patógeno, por lo que no ocurre una incorporación del fotosensibilizador al interior de la célula o que este no se adhiera a la superficie de la célula. Esto puede significar que la generación de oxígeno singlete no está ocurriendo cerca de posibles estructuras objetivo de la célula del patógeno. Todo esto puede provocar finalmente un ineficiente efecto del fotosensibilizador por si solo sobre el crecimiento de *Penicillium digitatum*.

Además, se realizó un experimento utilizando ambos componentes del conjugado, pero en una mezcla física. La inhibición resulta ser similar al caso del quitosano por separado, lo que indica que el polímero es el único que está teniendo algún efecto sobre el crecimiento del hongo. Esto da a entender además que no existe interacción entre el quitosano y la riboflavina en términos de algún tipo de efecto sinérgico al utilizar ambos componentes en una mezcla física.

Finalmente, el tratamiento con el conjugado químico CH-RF resultó ser el más eficaz de todos los sistemas de RF con diferencia. En el caso del tratamiento en oscuro, se puede apreciar que tiene un efecto similar a los tratamientos en presencia del polímero, esto es coherente ya que la riboflavina, si tuviera algún tipo de efecto, este no ocurriría sin una irradiación y generación de oxígeno singlete previa. Lo interesante ocurre cuando se realiza el tratamiento aPDT a las esporas de *Penicillium digitatum*. Se puede apreciar tanto en las fotos representativas de la Figura 25 como en el gráfico de % de crecimiento que el efecto de inhibición es de un 100%. No se observó crecimiento alguno en ninguna de las placas Petri que fueron tratadas con luz y 0,5% de CH-RF.

Este efecto se puede explicar bajo la lógica de que la riboflavina al estar unida covalentemente a la matriz polimérica del quitosano es transportada y localizada en la superficie de las esporas del patógeno debido a la interacción que el quitosano posee con las paredes celulares de estas células gracias a los grupos aminos protonados del polímero. Esto es posible ya que, a pesar

de la tiolación y conjugación con la riboflavina, el porcentaje de grupos aminos desacetilados que pueden presentar carga positiva en el quitosano es de un 70%, siendo este el componente mayoritario en el conjugado. Considerando lo anterior, en este caso entonces la generación de especies reactivas de oxígeno ocurriría en las cercanías de las paredes celulares de las esporas, provocando una mayor posibilidad de que estas especies citotóxicas puedan encontrarse y reaccionar con estructuras críticas en la supervivencia de la espora, como pueden ser varios componentes de la pared celular y el ergosterol de la membrana celular, provocando finalmente la inviabilidad celular de las esporas y finalmente la inhibición del crecimiento del patógeno.

Esta explicación es apoyada por las fotos tomadas por microscopia de fluorescencia a cada uno de los sistemas que presente riboflavina, presentados en la Figura 26.

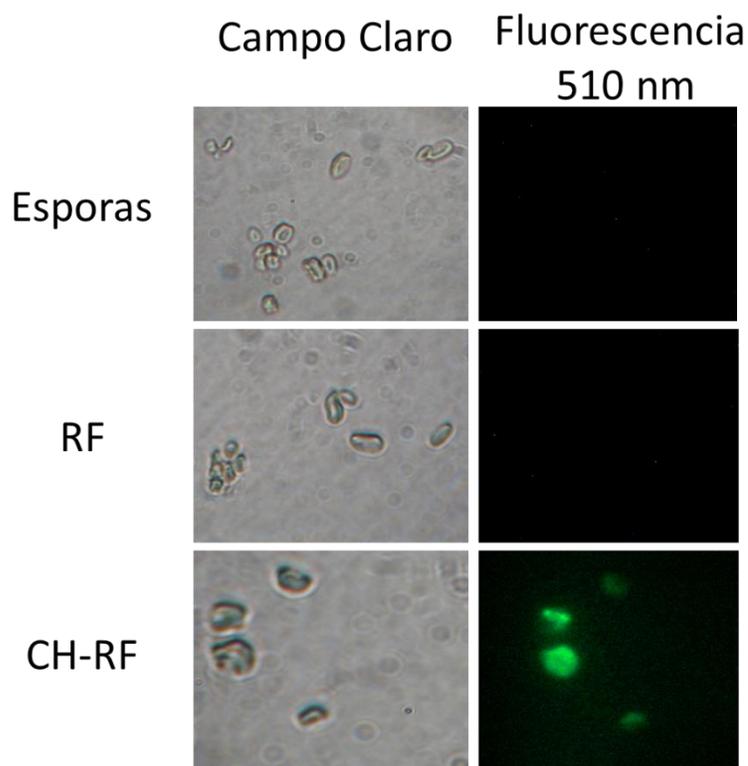


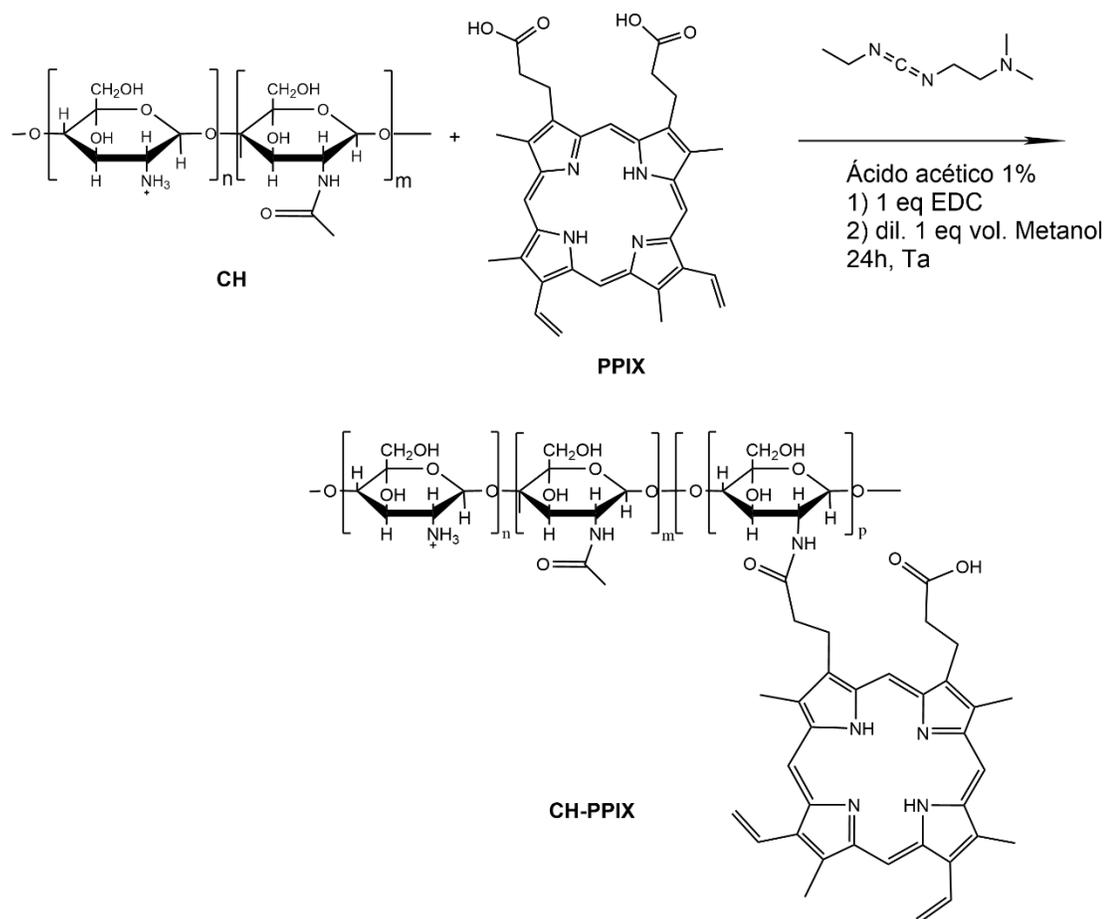
Figura 26. Fotos en campo claro y con Filtro de fluorescencia a 510 nm. Excitación a 450nm.

Como se puede apreciar, no se observa fluorescencia a 510 nm en las esporas en presencia de Riboflavina sola, por lo que se puede inferir que la riboflavina por sí sola no se adhiere a las esporas de *Penicillium digitatum*. Esto es debido a que no presenta carga alguna que pudiera eventualmente interactuar con la carga negativa característica de las estructuras superficiales de la célula del hongo. Interesantemente en el caso del conjugado con el quitosano, las esporas sí presentan la fluorescencia característica de la riboflavina. Esto es indicativo que el quitosano conjugado con la riboflavina interactúa con las esporas llevando el contenido de fotosensibilizador a las cercanías de la espora. Este resultado está en concordancia con los resultados de inhibición por aPDT presentados anteriormente. El quitosano efectivamente acerca al fotosensibilizador a la célula para que la acción fotodinámica ocurra “in situ”[87].

**CONJUGADO DE  
PROTOPORFIRINA  
IX  
CH-PPIX**

## 6.5 Síntesis del Conjugado CH-PPIX.

La síntesis de este conjugado basado en protoporfirina IX fue realizada en un solo paso el cual es descrito en la sección 5.4.



Esquema 2. Diagrama de síntesis total del conjugado CH-PPIX.

Para caracterizar estructuralmente el conjugado y confirmar la unión del fotosensibilizador y el polímero se realizaron análisis de FTIR al conjugado y se comparó con la riboflavina por si sola. Como se puede apreciar en la Figura 27, el espectro del conjugado presenta una banda ancha en los  $3440\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del enlace O-H característico del quitosano. Otra evidencia es la aparición de varias bandas de los  $1500\text{ a }1200\text{ cm}^{-1}$  características de los anillos pirrol de la PPIX [78]. La señal del grupo C=O de

la PPIX a  $1620\text{ cm}^{-1}$  corresponde a una conformación en la cual la PPIX esta agregada interactuando con otra molécula de PPIX a través de  $\pi$ -stacking, provocando esto puentes de hidrógeno entre los grupos carboxílicos de la PPIX teniendo como resultado esta señal[88]. En el caso del conjugado esta señal del grupo C=O tiene un corrimiento hacia números de onda más altos ( $1658\text{ cm}^{-1}$ ) indicando que se rompen los puentes de hidrógeno debido a la desagregación de la PPIX debido a que esta se encuentra unida a las cadenas de quitosano.

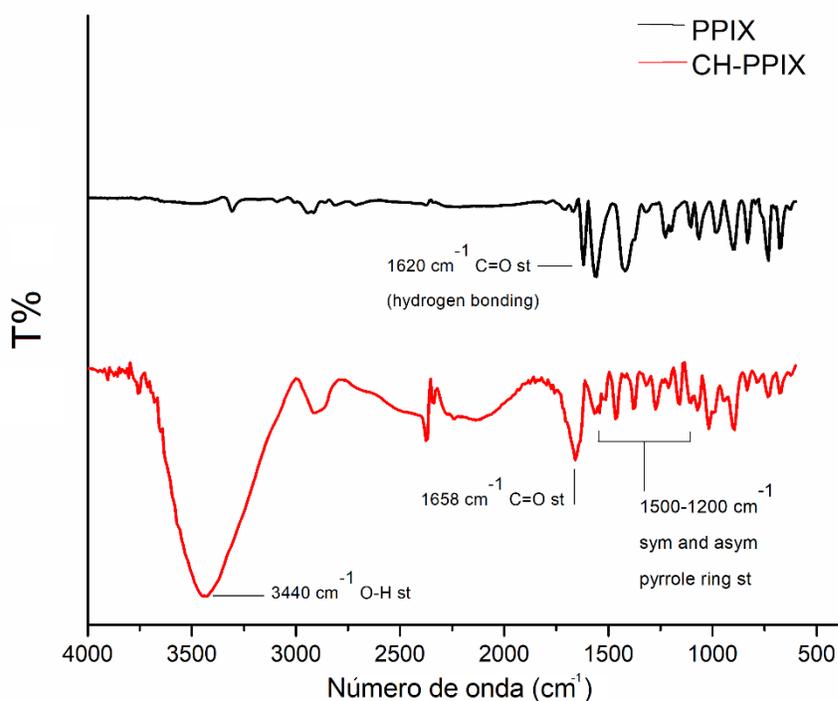


Figura 27. Espectro FTIR de PPIX y el conjugado CH-PPIX.

Como evidencia final de la conjugación de la PPIX en CH se realizó una hidrólisis enzimática con pronasa al conjugado con el fin de obtener los monómeros como es descrito en la sección 5.5. Luego de realizada la hidrólisis y recuperado el sobrenadante que contiene las fracciones de menor peso molecular, este se sometió a una separación por HPLC equipado con una columna de exclusión por tamaño, enfocándose en recuperar la fracción que eluya más lento, y que por tanto presente en menor peso molecular y que presente absorción característica de la PPIX, para

esto se utilizó un detector UV-vis acoplado al HPLC midiendo a 400 nm. Luego de separada y recolectada, esta fracción fue sometida a una espectrometría de masas, resultando el siguiente espectro en la Figura 28.

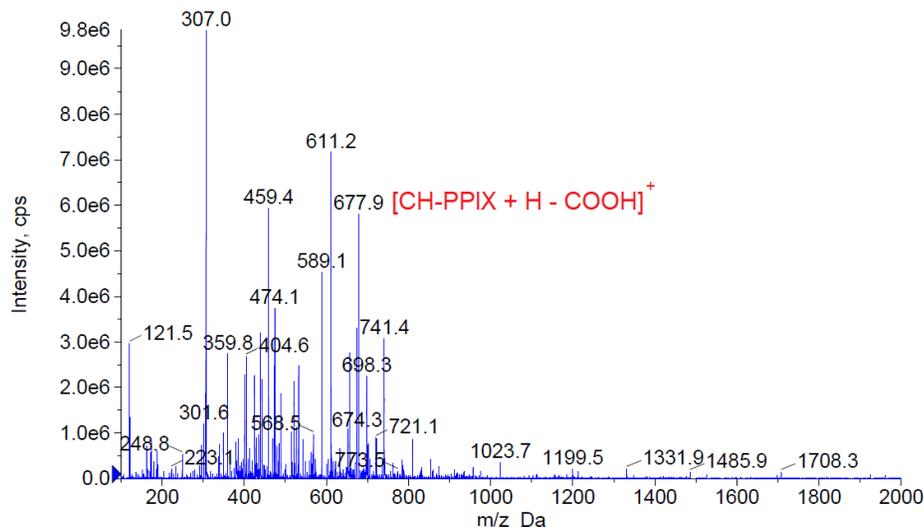


Figura 28. Espectro de masas de la fracción. Destacada la masa del monómero del conjugado CH-PPIX fragmentado

Destacado en rojo en la Figura 28 se observa la fragmentación que corresponde a la masa encontrada de 677,9 g/mol, la cual corresponde al monómero de CH-PPIX protonado y descarboxilado, fragmentaciones las cuales están reportadas para la protoporfirina IX [89]. Siendo esta la evidencia final que confirma la unión del fotosensibilizador al polímero.

Luego de determinar estructuralmente el conjugado, se procedió a determinar el grado de sustitución de la PPIX en el quitosano. Se realizó una determinación por emisión de fluorescencia de la PPIX a 635 nm a través de una curva de calibración (Figura 29) y una solución muestra del conjugado CH-PPIX. Al igual que en el conjugado CH-RF, se escogió una curva de calibración de fluorescencia debido a que la PPIX es el único componente en el sistema que presenta emisión, por tanto, solo se está detectando la cantidad de fotosensibilizador en el conjugado. Los resultados indican que hay  $5,6 \times 10^{-5}$  moles PPIX/g CH, lo que se traduce en un 13,3% de PPIX presente en el conjugado.

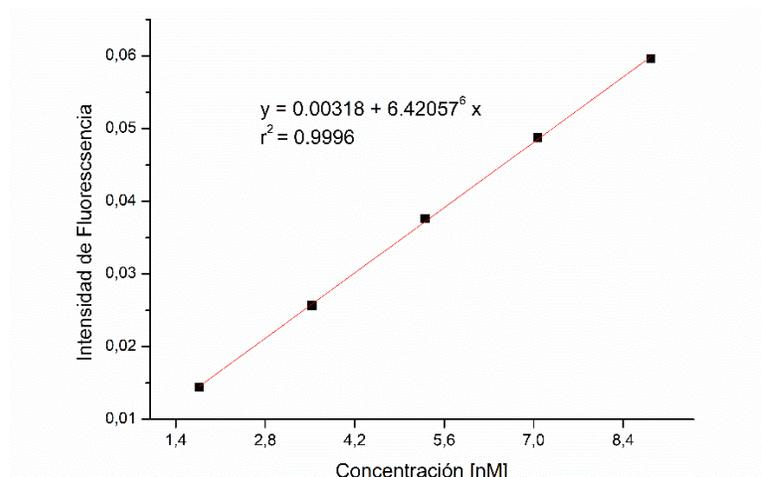


Figura 29. Curva de calibración de Emisión de fluorescencia a 635 nm de PPIX en Ácido acético 2%/Tween 20 1% para la determinación de PPIX en CH-PPIX.

## 6.6 Caracterización Fotofísica del conjugado CH-PPIX

Para determinar si la conjugación de la PPIX al CH afecta en algo sus propiedades fotofísicas en una primera instancia se realizaron determinaciones de sus espectros de absorción y emisión.

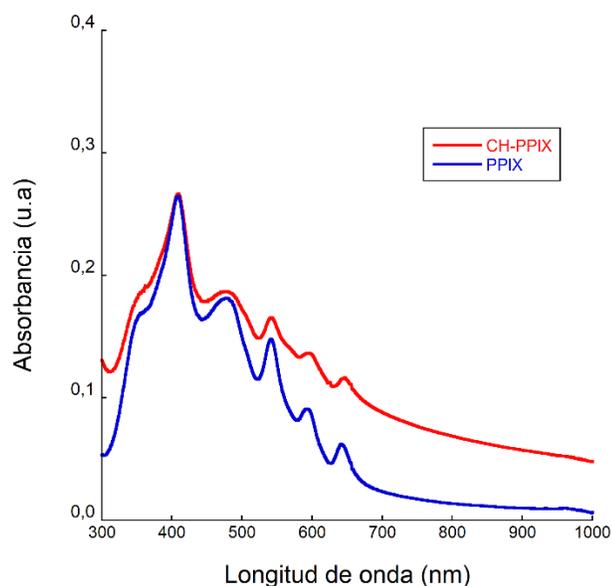


Figura 30. Espectro de absorción de PPIX y CH-PPIX en Ácido acético 2%/Tween 1%.

Como se puede apreciar en la Figura 30, la conjugación de la PPIX en CH no afecta las bandas de absorción características del fotosensibilizador, pero se aprecia una clara dispersión de luz debido a que la conjugación de la PPIX al CH vuelve al conjugado menos soluble en agua. Necesitando utilizar surfactante para poder solubilizar este polímero. Sin embargo, como se apreciará en los siguientes resultados, esto no impide que ocurran procesos fotoquímicos y fotofísicos asociados a la absorción en el fotosensibilizador.

En la Figura 31 se puede apreciar que hay una pequeña disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia, siendo posible causa la dispersión parcial de la luz causada por el conjugado. Los máximos se mantienen en las mismas longitudes de onda.

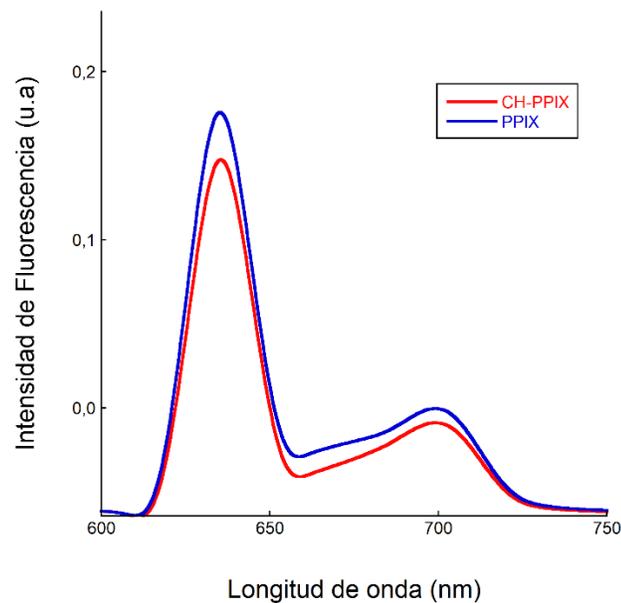


Figura 31. Espectro de emisión de fluorescencia de PPIX y CH-PPIX en Ácido acético 2%/Tween 1%.

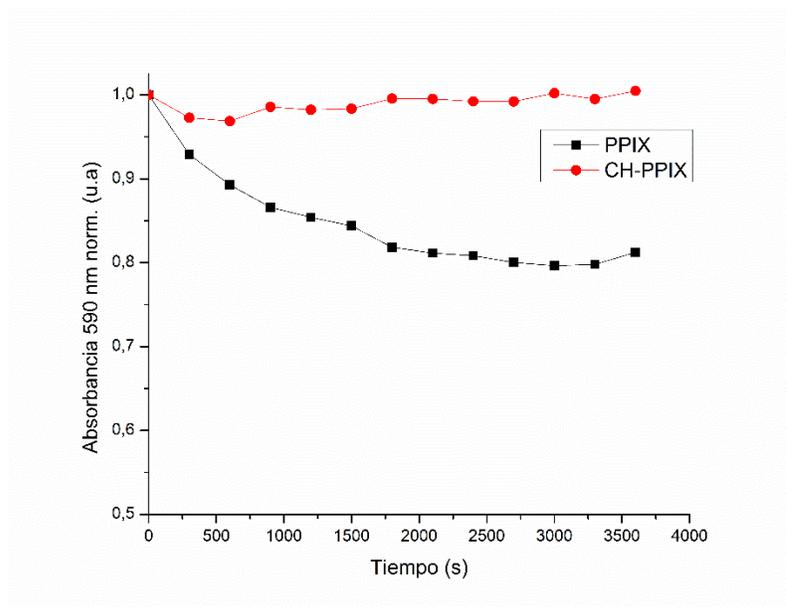


Figura 32. Perfiles de Fotodegradación de los sistemas basados en PPIX. Filtro de irradiación de 590 nm, Intensidad de luz 36,7 W/m<sup>2</sup>.

Como se puede apreciar en la Figura 32, el conjugado CH-PPIX prácticamente no presenta tendencia alguna a la fotodegradación, indicando su alta fotoestabilidad en las condiciones del experimento. En el caso de la PPIX, se aprecia una fotodegradación evidente. En este caso en particular los datos obtenidos para la PPIX no se pudieron ajustar a cinéticas simples para determinar el rendimiento cuántico de fotodegradación y por consecuencia tampoco se pudo determinar el rendimiento del conjugado. Sin embargo, se puede inferir en primera instancia que el conjugado es más fotoestable que la PPIX. Esto se puede deber a que el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generado por la PPIX, que oxida a la misma PPIX como principal mecanismo de fotooxidación[90], difunde hacia el medio fuera de la estructura polimérica en la que se encuentra inmerso el fotosensibilizador, disminuyendo entonces los choques efectivos del <sup>1</sup>O<sub>2</sub> con la PPIX y en consecuencia disminuyendo su fotodegradación.

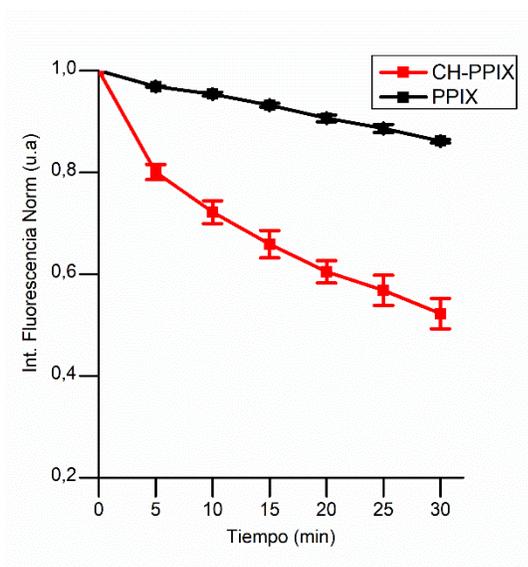


Figura 33. Perfiles de generación de oxígeno singlete de PPIX y CH-PPIX. Seguimiento de la disminución de la fluorescencia de ABMA a 412nm.

Se puede apreciar en la Figura 33 que la generación de  $^1O_2$ , medida indirectamente por la disminución de fluorescencia de la sonda ABMA, es mayor en el conjugado CH-PPIX que en el fotosensibilizador por sí solo. Siendo esto un resultado prometedor para la aplicación de este conjugado en aPDT. El hecho que la sonda responda al oxígeno singlete generado por la PPIX en el polímero es un indicador que apoya la idea de que este difunde hacia el medio y no oxida a la PPIX, disminuyendo su fotodegradación como se mencionó anteriormente.

En el caso de las mediciones de tiempos de vida de fluorescencia de los sistemas PPIX, se ha tenido que ocupar soluciones con Tween 20 para poder detectar fluorescencia de los sistemas y así poder realizar las mediciones. Sin embargo, este surfactante forma micelas para solubilizar la PPIX, modificando los tiempos de vida, 17,9 ns para la PPIX y 5,9 ns (22%) y 17,7 ns (78%) para el conjugado, explicando este segundo tiempo de vida como 2 moléculas de PPIX cercanas en la cadena de CH, provocando un apagamiento de fluorescencia, siendo esto un fenómeno esperable debido a tener un 13,3% de

PPIX en el sistema. Los tiempos de correlación rotacional también se ven modificados por la formación de micelas, incrementándolos considerablemente: 4,6 ns para PPIX y 4,1 ns para CH-PPIX, comparándolos con el tiempo de correlación de PPIX en etanol de 0,49 ns. Por esta interacción secundaria del surfactante con el fotosensibilizador, no se puede concluir el efecto de la conjugación en las propiedades fotofísicas de tiempo de vida de fluorescencia y anisotropía en las condiciones trabajadas en esta tesis.

### 6.7 Evaluación de efecto fungicida de sistemas basados en PPIX

De la misma forma que con el conjugado CH-RF, se realizó en primera instancia el efecto de la concentración de CH-PPIX en el crecimiento de *Penicillium Digitatum*. Cabe destacar que debido a la baja solubilidad de este conjugado se utilizó un rango más bajo de concentraciones, siendo estas del orden de  $1 \times 10^{-3}\%$  (m/v). La concentración de esporas es de  $1 \times 10^4$  esporas/mL y se utilizaron 1 hora de incubación y 1 hora de irradiación para todos los experimentos.

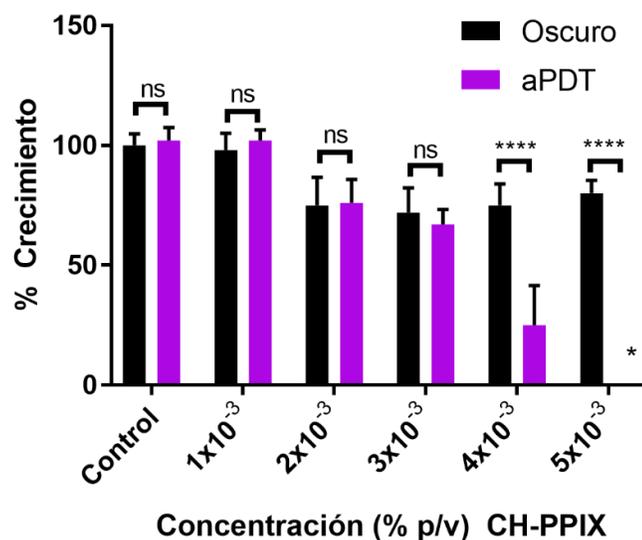


Figura 34. Optimización de concentraciones para aPDT de conjugado CH-PPIX. \* No se detectó crecimiento con el conjugado a concentración  $5 \times 10^{-3}\%$  en presencia de luz.

Como se puede apreciar en la Figura 34, existe claramente un efecto dosis respuesta de inhibición de crecimiento a dosis crecientes del conjugado CH-PPIX, logrando la total inhibición a  $5 \times 10^{-3} \%$ . Esta concentración será utilizada para realizar los siguientes ensayos. Con esta información y de igual manera que con el conjugado CH-RF, se pudo calcular el IC90 obteniendo un valor de  $4,4 \times 10^{-3} \%$ . Cabe destacar que se realizaron experimentos a concentraciones más elevadas y en estos el efecto inhibitorio en oscuro no aumentó, por lo que se infiere que el efecto de inhibición es principalmente debido a la fotoactividad de la PPIX presente en el conjugado.

Luego se realizaron los experimentos comparando PPIX, CH, una mezcla proporcional de PPIX y CH y finalmente el conjugado CH-PPIX utilizando las condiciones descritas en la sección de metodología.

Luego de los 7 días de crecimiento, se procedió a determinar el radio de crecimiento para cada repetición de cada sistema. Se realizaron experimentos en oscuro solamente considerando la hora de incubación, pero sin irradiación de luz. Luego del tratamiento estadístico correspondiente y la documentación en fotografías representativas, se obtuvieron los siguientes resultados para los sistemas basados en PPIX.

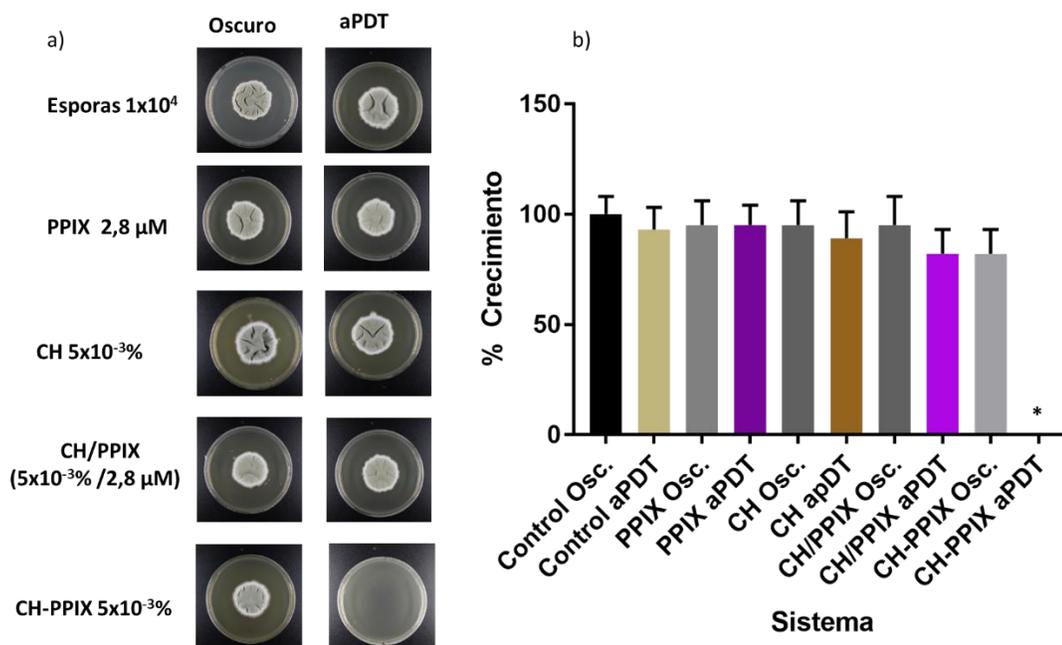


Figura 35. a) Fotos representativas de las placas Petri y el crecimiento radial. b) Porcentajes de crecimiento de *Penicillium digitatum* bajo tratamiento aPDT y oscuro con sistemas de PPIX. \* Las placas con el sistema CH-PPIX Irradiado no presentaron crecimiento alguno.

Como se puede apreciar en la Figura 35, el conjugado CH-PPIX con tratamiento aPDT posee el mayor efecto fungicida de todos los sistemas, llegando a inhibir al 100% el crecimiento de *Penicillium digitatum* en las condiciones de este experimento. Los otros sistemas no presentan inhibición aparente en oscuro o con tratamiento aPDT. Esto es evidencia que la conjugación de la PPIX al CH aumenta las capacidades fungicidas de ambos compuestos. Esto puede deberse a, como en el caso de la RF, una mayor interacción del fotosensibilizador con las estructuras superficiales de la espora gracias al transporte vía quitosano hacia la pared celular de la espora, provocando una generación de  $^1O_2$  *in situ* en biomoléculas esenciales para la supervivencia y proliferación del hongo patógeno. En este caso el quitosano no estaría teniendo efecto debido a sus bajas concentraciones, por lo que la actividad fotodinámica del conjugado se adjudica toda la capacidad fungicida de este compuesto. Cabe destacar que este conjugado, si bien posee una

solubilidad limitada, logra obtener un control del hongo patógeno a concentraciones muy bajas, siendo 100 veces menores que las logradas en el conjugado CH-RF, esto puede deberse a que la PPIX tiene un alto rendimiento de generación de oxígeno singlete en sistemas acuosos con surfactantes, llegando a valores de 0,8[47]. Finalmente, es importante indicar que este conjugado se integraría a los pocos casos en los que una porfirina aniónica y de origen natural es capaz de ser utilizada como agente antifúngico en hongos de interés agronómico[91, 92].

Al igual que con el conjugado CH-RF, se realizaron microscopias de fluorescencia para detectar si había fotosensibilizador incorporado en las esporas, pero debido a las bajas concentraciones de este no se logró detectar fluorescencia en este ensayo.

#### **7. Comparación entre conjugados y azul de metileno.**

Luego de realizar la evaluación de efecto fungicida de ambos conjugados, se realizó un ensayo control positivo con azul de metileno (AM), fotosensibilizador ampliamente utilizado para el control de hongos patógenos a través de aPDT. El ensayo se realizó con concentraciones de 100 µg/mL, condiciones de máxima inhibición para *Metarhizium anisopliae* y *Aspergillus nidulans* según reportan U.L Braga et al.[93], manteniendo todas las otras condiciones de incubación e irradiación iguales a los otros experimentos.

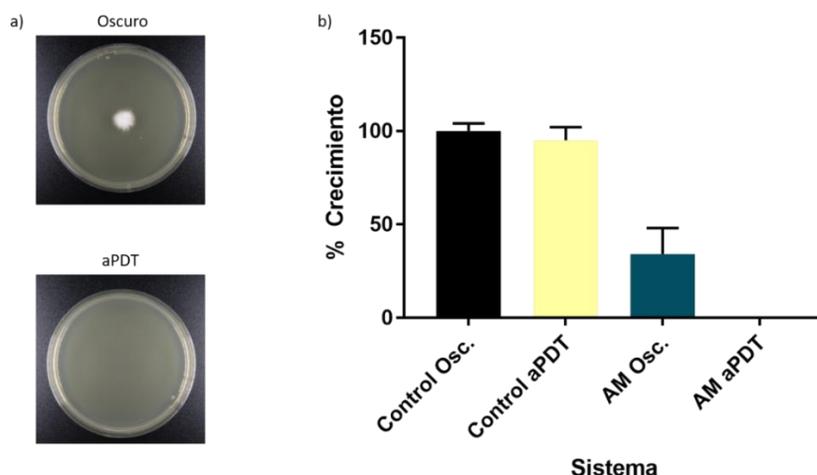


Figura 36. a) Fotos representativas del efecto fungicida fotodinámico del azul de metileno. b) Grafico de inhibición del azul de metileno en oscuro y con tratamiento aPDT.

El azul de metileno, por su carga positiva, tiende a presentar gran efecto inhibitor frente a microorganismos con paredes celulares con carga negativa como las bacterias gram(-) u hongos. Esto se ve reflejado en la Figura 36, la cual indica que la actividad antifúngica con tratamiento aPDT, en las condiciones indicadas en esta tesis frente a *Penicillium digitatum* logra una inhibición del 100% al igual que los 2 conjugados sintetizados en esta tesis. Esto nos indica que los conjugados CH-RF y CH-PPIX cumplen comparativamente con la efectividad de un fotosensibilizador estándar ocupado ampliamente en PDT.

### 8. Modelo de acción conjugados Quitosano-Fotosensibilizador

Considerando los resultados obtenidos con respecto a los conjugados quitosano-fotosensibilizador para el caso de riboflavina y protoporfirina IX, es evidente que la conjugación tiene un efecto en la capacidad fungicida fotodinámica del compuesto, siendo superior al efecto de sus componentes juntos en mezcla simple. Esto se debe principalmente a dos factores los cuales van a ser discutidos considerando resultados y lo reportado en la literatura y serán desarrollados a continuación:

### *1. Inmovilización de fotosensibilizadores en polímeros.*

La inmovilización de fotosensibilizadores en polímeros es una técnica utilizada comúnmente en aPDT, la cual busca adherir a través de adsorción, disolución, enlaces covalentes o interacciones electroestáticas[94] los fotosensibilizadores a superficies de interés como puede ser celulosa[95], o mezclas de distintos polímeros como alginato, pectinas etc.[96] para manufacturar materiales con propiedades antibacterianas para uso en medicina, tratamiento de aguas residuales o agricultura. La literatura presenta amplia evidencia que los fotosensibilizadores inmovilizados en matrices poliméricas tienden a encontrarse en mayor proporción en su estado monomérico [63, 64, 96-98]. La formación de agregados de fotosensibilizadores, comúnmente dímeros u estructuras más organizadas, promueve en gran medida las desactivaciones de estados excitados a través de conversión interna no radiativa, lo que provoca una disminución en los tiempos de vida de estados tripletes y como consecuencia final, la disminución de la generación de oxígeno singlete[99, 100]. La inmovilización de los fotosensibilizadores en polímeros provoca un aislamiento de las moléculas de fotosensibilizadores e impide la interacción entre ellas, una consecuencia directa de aquello es la disminución considerable de los procesos de agregación y formación de dímeros y la disminución de procesos de desactivación no radiativa y, en consecuencia, otros procesos fotofísicos se ven favorecidos como por ejemplo el aumento de los tiempos de vida del estado triplete y la generación de oxígeno singlete, lo cual se traduce finalmente en mejores propiedades terapéuticas para la terapia fotodinámica antimicrobiana.

Para el caso de los fotosensibilizadores utilizados en este trabajo de tesis, hay amplia evidencia que indica que, para las flavinas, los estados agregados disminuyen substancialmente sus propiedades de fotoxidación entre las que se encuentra la generación de oxígeno singlete [101] y que cuando se

inmovilizan en matrices como  $\beta$ -ciclodextrinas[102] y Cicleno de Zinc (II)[103] se rompen los agregados, manteniendo estados monoméricos y aumentando sus propiedades relacionadas a la fotooxidación y generación de ROS.

Para el caso de la PPIX, su estructura con grupos carboxílicos ionizables y su anillo hidrofóbico le otorgan propiedades anfífilas, lo que provoca formación de agregados a través de interacciones  $\pi$ - $\pi$ [88]. Hay estudios recientes que indican que sus propiedades fotofísicas varían según las características del medio en que se encuentre, como por ejemplo polaridad de solvente y viscosidad, el cual afecta en el grado de agregación del fotosensibilizador, provocando directamente una disminución en la generación de oxígeno singlete[105]. Existen varios reportes en la literatura que indican que la inmovilización de porfirinas en matrices como nanopartículas de polímeros conjugados[106] o insertas en polímeros con microporos[107] aumentan la eficacia sus propiedades relacionadas con PDT como generación de oxígeno singlete, acumulación en células objetivos etc.

Es por esto por lo que uno de los efectos clave para el sorprendente efecto potenciador de efecto fungicida de la conjugación de fotosensibilizadores a quitosano es la desagregación de estos, afectando directamente a propiedades determinantes en aPDT como es la generación de oxígeno singlete y por tanto a su capacidad oxidativa en las células fúngicas, más específicamente a la oxidación del ergosterol, como se mencionó anteriormente en este trabajo.

## *2. Transporte y Acumulación de los fotosensibilizadores en las células objetivo por el Quitosano.*

En secciones anteriores de este trabajo de tesis ya se desarrollaron los temas referidos a las propiedades del quitosano como fungicida y sus mecanismos, sin embargo, los resultados indican que a las concentraciones trabajadas, el quitosano presenta poco a nulo efecto fungicida en las condiciones

experimentales y que el mayor efecto fungicida se relaciona con la fotoactivación de los fotosensibilizadores, es por esto que el rol del quitosano en estos sistemas está relacionado a un efecto de transporte y acumulación de los fotosensibilizadores en la célula fúngica. Por esto, a luz de los resultados obtenidos en esta tesis queda ahondar más en los detalles de cómo el quitosano puede localizar y acumular a los fotosensibilizadores en las células fúngicas. Es conocido en la literatura que los oligómeros de quitosano tienen gran interacción con las estructuras superficiales de las células fúngicas [108] y que la eficacia del efecto fungicida es más alta en los oligómeros de quitosano. Hay reportes que indican que las especies de hongo que poseen más ácidos grasos insaturados en las estructuras de sus membranas, son más susceptibles al efecto del quitosano, sugiriendo entonces que el efecto de permeabilización del quitosano sea dependiente de la fluidez de la membrana celular, siendo el efecto mayor cuando más fluida se considere la membrana celular[109, 110].

Los pocos estudios que involucran quitosano y fotosensibilizadores en hongos patógenos en frutas indican que las principales causas del aumento de fotoactividad de los conjugados con respecto al fotosensibilizador por si solo radican en un aumento de la incorporación celular del fotosensibilizador gracias al transporte del quitosano hacia la célula fúngica, gracias en gran medida a la interacción de los grupos amino con carga positiva del quitosano con las cargas negativas de las fosfomanosas de la pared celular y de los fosfolípidos de la membrana celular y en el aumento de la generación de ROS gracias a la inmovilización del fotosensibilizador en la cadena polimérica, lo que provoca una mayor y más concentrada presencia de ROS en la célula, aumentando la eficacia del efecto fungicida fotodinámico[62-64, 66]. Según los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se puede inferir que el efecto potenciador de las conjugaciones de RF y PPIX al quitosano ocurre por las mismas razones mencionadas en la literatura.

Considerando ambos efectos, se propone entonces como modelo de acción de los conjugados Fotosensibilizador-Quitosano:

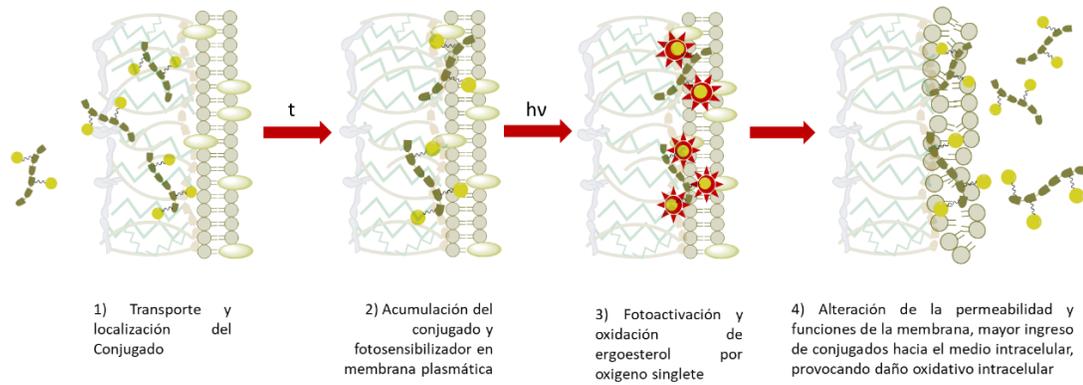


Figura 37. Diagrama de modelo propuesto de acción fungicida de los conjugados Quitosano-Fotosensibilizador.

El fotosensibilizador es transportado hacia las estructuras superficiales de la célula fúngica gracias a la interacción electroestática del quitosano con las fosfomanosas superficiales de la pared celular y los fosfolípidos presentes en la membrana celular, esto altera parcialmente la permeabilidad de la membrana celular haciendo que el conjugado pueda acumularse y concentrarse en la membrana celular. Luego, se irradian las células fúngicas cargadas con fotosensibilizador y la generación de oxígeno singlete y el efecto fotodinámico ocurren *in situ*, aumentando la capacidad oxidativa del tratamiento, el ergosterol es uno de los principales objetivos del oxígeno singlete generado *in situ* en la membrana plasmática y este es degradado, por lo que la membrana plasmática pierde rigidez y ocurren cambios en la permeabilidad y funciones de transporte de la membrana, por lo que favorece el ingreso de más moléculas de conjugado hacia el medio intracelular, provocando más daño oxidativo a nivel intracelular lo que provoca finalmente la inviabilidad de la célula y provoca la muerte celular, traduciéndose esto en un control en la proliferación y crecimiento del hongo patógeno a través de la terapia fotodinámica antimicrobiana asistida por quitosano.

## 9. Resumen de resultados y proyección de los conjugados:

Los resultados obtenidos para ambos conjugados permiten dilucidar ciertas conclusiones parciales enfocándose en la comparación de ambos conjugados entre sí y con un estándar en aPDT como es el azul de metileno. A continuación, se presentan un resumen de los distintos aspectos de cada fotosensibilizador:

Dosis de los conjugados: Los resultados indican que el conjugado CH-RF tiene un efecto fungicida total sobre *Penicillium digitatum* a una dosis de 0,5% y el conjugado CH-PPIX alcanza este mismo efecto a concentraciones 100 veces más bajas,  $5 \times 10^{-3}\%$ . Cabe mencionar que el conjugado CH-RF es mucho más soluble que el conjugado CH-PPIX, pudiendo preparar soluciones más concentradas del primero, en cambio el conjugado CH-PPIX podría formularse como suspensiones o similares. Cabe destacar que ambos conjugados alcanzan una inhibición de crecimiento del 100% a concentraciones más bajas que las utilizadas normalmente en fungicidas comerciales basados en quitosano, que utilizan concentraciones del orden de 2.5% (Biorend) u otros fungicidas comerciales para este patógeno como Tiabendazol (1.5%).

Dosis equivalente de fotosensibilizador: En el caso del AM, para lograr una inhibición del 100% de *Penicillium digitatum* se ocupó una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que con el CH-RF se ocuparon 8  $\mu\text{g/mL}$  de RF (recordando que, a concentraciones de 0,5% el quitosano también posee efecto fungicida) y finalmente CH-PPIX con 1,5  $\mu\text{g/mL}$  de PPIX. Esto indica que en ambos conjugados, la cantidad de dosis de fotosensibilizador es mucho más baja que en el control positivo.

Síntesis: En este caso, el azul de metileno se encuentra disponible comercialmente y es ampliamente utilizado en varias áreas de la medicina, pero es de naturaleza sintética no renovable. En el caso del CH-RF se requieren múltiples pasos de síntesis y purificaciones para obtener el

conjugado, sin embargo, la mayoría de los componentes ocupados para su síntesis están disponibles comercialmente y los que no, tienen sus síntesis descritas en la literatura y potencialmente se pueden producir en grandes cantidades. Finalmente, en el caso del CH-PPIX, la síntesis desarrollada en esta tesis tiene solo un paso, obteniendo el producto puro luego de varios lavados con solvente. La desventaja en este caso es la falta de disposición de la PPIX en cantidades comerciales como para suplir una producción en mayor escala.

Fotoestabilidad: En el caso de los fotosensibilizadores, tanto la RF como la PPIX presentan una clara fotodegradación en las condiciones utilizadas en esta tesis. La conjugación química al quitosano en ambos casos resultó en un aumento en la fotoestabilidad de los fotosensibilizadores. Lo que es un resultado prometedor para ambos sistemas para poder ser utilizados en aplicaciones industriales y de campo en donde se requieren que el fungicida se mantenga activo por tiempos prolongados.

# **CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES**

## 10. Conclusiones

Los conjugados químicos de quitosano con los distintos fotosensibilizadores, tanto riboflavina como protoporfirina IX, fueron sintetizados y caracterizados estructural y fotofísicamente. Se logró determinar que las estructuras de los nuevos conjugados coincidían con las estructuras propuestas en el diseño de síntesis y además se determinó la cantidad de fotosensibilizador insertado en el quitosano para ambos casos, logrando unir covalentemente 4,2 $\mu$ mol RF/g CH en el caso de conjugado CH-RF y 56 $\mu$ mol PPIX/g CH en el caso del conjugado CH-PPIX.

Se determinó indirectamente la generación de oxígeno singlete para los conjugados CH-RF y CH-PPIX. En ambos casos, la generación de oxígeno singlete fue mayor para el conjugado en comparación del fotosensibilizador correspondiente por separado. Una razón de esto es la inmovilización de los fotosensibilizadores en las cadenas poliméricas del quitosano, provocando desagregación y disminuyendo los mecanismos de desactivación del estado excitado no radiativos.

Se lograron determinar las concentraciones mínimas inhibitorias para cada conjugado frente a *Penicillium digitatum in vitro* y se determinó el efecto fungicida fotodinámico de cada sistema por separado para ser comparados en condiciones de irradiación de luz y en oscuridad.

Para ambos casos, el conjugado (CH-RF o CH-PPIX) bajo tratamiento aPDT fue el sistema más eficiente comparado por sus componentes por separado (CH y RF o PPIX) o con sus componentes en mezcla simple. El sistema CH-RF bajo aPDT logro una inhibición total *in vitro* de *Penicillium digitatum* a concentraciones de 0,5% (m/v). El sistema CH-PPIX bajo aPDT logro una inhibición total *in vitro* de *Penicillium digitatum* a concentraciones de 5x10<sup>-3</sup>% (m/v).

Basado en los resultados de esta tesis y en la literatura, se propone un mecanismo para ambos conjugados que consiste principalmente en el transporte del fotosensibilizador hacia la célula fúngica gracias al quitosano, la acumulación del conjugado en la membrana plasmática y finalmente en la fotoactivación del fotosensibilizador *in situ* generando ROS dañando principalmente a componentes estructurales de la membrana, permeabilizándola y permitiendo ingresar al conjugado al medio intracelular, aumentando el daño oxidativo y provocando finalmente la muerte celular.

La comparación de los conjugados con un tratamiento estándar de la técnica aPDT, en este caso Azul de Metileno, indica que los conjugados son competitivos en términos de efectividad y concentraciones.

Finalmente, estos conjugados químicos entre fotosensibilizador y quitosano son prometedores para ser la base de formulaciones de fungicidas verdes debido a su buen control de patógenos, bajas concentraciones de acción, componentes naturales y biodegradables y técnica de control de patógenos innovadora a través de la aPDT, la cual reduce la probabilidad de producir cepas resistentes a tratamientos. Todas estas propiedades responden a problemas presentes en el sector de pesticidas y fungicidas y a las tendencias actuales y futuras en el área de agroquímicos a nivel mundial.

## 11. Referencias:

1. Fisher, M.C., et al., *Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health*. Nature, 2012. **484**(7393): p. 186-194.
2. Deising, H.B., S. Reimann, and S.F. Pascholati, *Mechanisms and significance of fungicide resistance*. Brazilian Journal of Microbiology, 2008. **39**: p. 286-295.
3. Almeida, F., M.L. Rodrigues, and C. Coelho, *The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide*. Frontiers in microbiology, 2019. **10**: p. 214-214.
4. Ishii, H., *Impact of Fungicide Resistance in Plant Pathogens on Crop Disease Control and Agricultural Environment*. Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ, 2006. **40**(3): p. 205-211.
5. Erasmus, A., et al., *Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus postharvest green and blue mould: Impact and options*. Postharvest Biology and Technology, 2015. **107**: p. 66-76.
6. Mercer, E.I., *Morpholine antifungals and their mode of action*. 1991, Portland Press Limited.
7. University), E.S.L.P.S. *Potential Health Effects of Pesticides*. 2017 [cited 2019 18/06/19]; Available from: <https://extension.psu.edu/potential-health-effects-of-pesticides>.
8. Comission, E. *EU pesticides database*. 2018 5/2018]; Available from: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=download.MRL>.
9. Agriculture, U.S.D.o. *China: Maximum Residue Limits for Pesticides in Food*. 2014 5/2018]; Available from: <https://www.fas.usda.gov/data/china-maximum-residue-limits-pesticides-food>.
10. Wightwick, A.M., et al., *Environmental Fate of Fungicides in Surface Waters of a Horticultural-Production Catchment in Southeastern Australia*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2012. **62**(3): p. 380-390.
11. Silva, V., et al., *Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded*. Science of The Total Environment, 2019. **653**: p. 1532-1545.
12. Jaffe, B.D., A.N. Lois, and C. Guédot, *Effect of Fungicide on Pollen Foraging by Honeybees (Hymenoptera: Apidae) in Cranberry Differs by Fungicide Type*. Journal of Economic Entomology, 2018. **112**(1): p. 499-503.
13. Mussen, E.C., J.E. Lopez, and C.Y.S. Peng, *Effects of Selected Fungicides on Growth and Development of Larval Honey Bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)*. Environmental Entomology, 2004. **33**(5): p. 1151-1154.
14. Guardian, T. *California defies Trump to ban pesticide linked to childhood brain damage*. 2019 [cited 2019 18/06/19]; Available from: <https://www.theguardian.com/us-news/2019/may/08/california-pesticide-ban-chlorpyrifos-agriculture>.
15. Reuters. *France to ban widely used crop fungicide over health concerns*. 2019 [cited 2019 18/06/2019]; Available from: <https://www.reuters.com/article/us-france-health-fungicide/france-to-ban-widely-used-crop-fungicide-over-health-concerns-idUSKCN1SY1VI>.
16. Guardian, T. *EU bans UK's most-used pesticide over health and environment fears*. 2019 [cited 2019 18/06/19]; Available from:

<https://www.theguardian.com/environment/2019/mar/29/eu-bans-widely-used-pesticide-over-safety-concerns>.

17. Hamblin, M.R., *Advances in photodynamic therapy: basic, translational, and clinical*. 2008: Artech House.
18. Jarvi, M.T., M.S. Patterson, and B.C. Wilson, *Insights into photodynamic therapy dosimetry: simultaneous singlet oxygen luminescence and photosensitizer photobleaching measurements*. *Biophys J*, 2012. **102**(3): p. 661-71.
19. Liang, Y.I., et al., *Photodynamic therapy as an antifungal treatment*. *Exp Ther Med*, 2016. **12**(1): p. 23-27.
20. Robinson-Duggon, J., et al., *Potential Applications of Cucurbit[n]urils Inclusion Complexes in Photodynamic Therapy*. *Israel Journal of Chemistry*, 2018. **58**(3-4): p. 199-214.
21. Dabrowski, J.M. and L.G. Arnaut, *Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment*. *Photochem Photobiol Sci*, 2015. **14**(10): p. 1765-80.
22. Rajesh, S., et al., *Antimicrobial photodynamic therapy: An overview*. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 2011. **15**(4): p. 323-327.
23. Kibbler, C.C., et al., *Oxford Textbook of Medical Mycology*, in *Fungal cell structure and organization*. 2017, Oxford University Press.
24. Moore, D., G.D. Robson, and A.P.J. Trinci, *21st Century Guidebook to Fungi*. 2000, Cambridge: Cambridge University Press.
25. Ibeas, J., et al., *Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein*. Vol. 23. 2000. 375-383.
26. Lipke, P.N. and R. Ovalle, *Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges*. *Journal of bacteriology*, 1998. **180**(15): p. 3735-3740.
27. Souza, R.C., et al., *Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against Candida albicans*. *Lasers Med Sci*, 2010. **25**(3): p. 385-9.
28. Mittal, S., S. Roy, and J.N. Srivastava, *Fungicidal response of a novel natural photosensitizer (Beta vulgaris) on Candida albicans with low-power laser radiation*. *Laser Physics*, 2013. **23**(5): p. 055606.
29. Njoki, L.M., S.A. Okoth, and P.M. Wachira, *Effects of Medicinal Plant Extracts and Photosensitization on Aflatoxin Producing Aspergillus flavus (Raper and Fennell)*. *Int J Microbiol*, 2017. **2017**: p. 5273893.
30. Baltazar, L.M., et al., *Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections*. *Front Microbiol*, 2015. **6**: p. 202.
31. Dai, T., et al., *Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform*. *Front Microbiol*, 2012. **3**: p. 120.
32. de Menezes, H.D., et al., *In Vitro Photodynamic Inactivation of Plant-Pathogenic Fungi Colletotrichum acutatum and Colletotrichum gloeosporioides with Novel Phenothiazinium Photosensitizers*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014. **80**(5): p. 1623-1632.
33. Gonzales, J.C., et al., *Photodynamic inactivation of conidia of the fungus Colletotrichum abscissum on Citrus sinensis plants with methylene blue under solar radiation*. *J Photochem Photobiol B*, 2017. **176**: p. 54-61.

34. Lazzaro, A., et al., *Light- and singlet oxygen-mediated antifungal activity of phenylphenalenone phytoalexins*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2004. **3**(7): p. 706-710.
35. De Lucca, A.J., et al., *Blue light (470 nm) effectively inhibits bacterial and fungal growth*. Lett Appl Microbiol, 2012. **55**(6): p. 460-6.
36. Rodrigues, G.B., et al., *Susceptibilities of the dermatophytes Trichophyton mentagrophytes and T. rubrum microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light*. J Photochem Photobiol B, 2012. **116**: p. 89-94.
37. P., G.F., et al., *Photodynamic Inactivation of Conidia of the Fungi Metarhizium anisopliae and Aspergillus nidulans with Methylene Blue and Toluidine Blue*. Photochemistry and Photobiology, 2010. **86**(3): p. 653-661.
38. Böcking, T., et al., *Effects of singlet oxygen on membrane sterols in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. European Journal of Biochemistry, 2000. **267**(6): p. 1607-1618.
39. Olmedo, G.M., et al., *UVA Photoactivation of Harmol Enhances Its Antifungal Activity against the Phytopathogens Penicillium digitatum and Botrytis cinerea*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 347.
40. Olmedo, G.M., et al., *Antifungal activity of beta-carbolines on Penicillium digitatum and Botrytis cinerea*. Food Microbiol, 2017. **62**: p. 9-14.
41. Calzavara-Pinton, P., et al., *Photodynamic antifungal chemotherapy*. Photochem Photobiol, 2012. **88**(3): p. 512-22.
42. Sheraz, M.A., et al., *Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin*. Beilstein J Org Chem, 2014. **10**: p. 1999-2012.
43. Cardoso, D.R., S.H. Libardi, and L.H. Skibsted, *Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality*. Food Funct, 2012. **3**(5): p. 487-502.
44. Nielsen, H.K., et al., *Comparison of Riboflavin and Toluidine Blue O as Photosensitizers for Photoactivated Disinfection on Endodontic and Periodontal Pathogens In Vitro*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0140720.
45. Wachowska, M., et al., *Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer*. Molecules, 2011. **16**(12): p. 4140-4164.
46. Gotardo, F., et al., *Investigating the intersystem crossing rate and triplet quantum yield of Protoporphyrin IX by means of pulse train fluorescence technique*. Chemical Physics Letters, 2017. **674**: p. 48-57.
47. Nishimura, T., et al., *Determination and analysis of singlet oxygen quantum yields of talaporfin sodium, protoporphyrin IX, and lipidated protoporphyrin IX using near-infrared luminescence spectroscopy*. Lasers in Medical Science, 2020. **35**(6): p. 1289-1297.
48. Harris, F. and L. Pierpoint, *Photodynamic therapy based on 5-aminolevulinic acid and its use as an antimicrobial agent*. Med Res Rev, 2012. **32**(6): p. 1292-327.
49. Kamp, H., et al., *Antifungal effect of 5-aminolevulinic acid PDT in Trichophyton rubrum*. Mycoses, 2005. **48**(2): p. 101-107.
50. Monfrecola, G., et al., *In vitro effect of 5-aminolaevulinic acid plus visible light on Candida albicans*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2004. **3**(5): p. 419-422.
51. Hassni, M., et al., *Chitosan, Antifungal Product against Fusarium oxysporum f. sp. albedinis and Elicitor of Defence Reactions in Date Palm Roots*. 2004. Vol. 43. 2004.

52. Ait Barka, E., et al., *Chitosan improves development, and protects Vitis vinifera L. against Botrytis cinerea*. Plant Cell Reports, 2004. **22**(8): p. 608-614.
53. Turdi, Y.s. and X.q. Zhu. *Inhibition of Chitosan and Oligochitosan on Hyphal Growth of Four Species of Brown Rot Fungi*. in 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology. 2012.
54. Chen, J., et al., *Combination effect of chitosan and methyl jasmonate on controlling Alternaria alternata and enhancing activity of cherry tomato fruit defense mechanisms*. Crop Protection, 2014. **56**: p. 31-36.
55. Long, L.T., et al., *Study on Antifungal Ability of Water Soluble Chitosan Against Green Mould Infection in Harvested Oranges*. Journal of Agricultural Science, 2014. **6**(8).
56. El Hadrami, A., et al., *Chitosan in plant protection*. Mar Drugs, 2010. **8**(4): p. 968-87.
57. Hirano, S., et al., *The preparation and applications of functional fibres from crab shell chitin*. Journal of Biotechnology, 1999. **70**(1): p. 373-377.
58. Bornet, A. and P.-L. Teissedre, *Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (Ochratoxin A) contaminants in wines*. Vol. 226. 2007. 681-689.
59. Pena, A., N.S. Sanchez, and M. Calahorra, *Effects of chitosan on Candida albicans: conditions for its antifungal activity*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 527549.
60. Lee, S.J., et al., *Comparative study of photosensitizer loaded and conjugated glycol chitosan nanoparticles for cancer therapy*. J Control Release, 2011. **152**(1): p. 21-9.
61. Wallat, J.D., et al., *Fluorinated polymer–photosensitizer conjugates enable improved generation of ROS for anticancer photodynamic therapy*. Polymer Chemistry, 2017. **8**(20): p. 3195-3202.
62. Shrestha, A. and A. Kishen, *Polycationic chitosan-conjugated photosensitizer for antibacterial photodynamic therapy*. Photochem Photobiol, 2012. **88**(3): p. 577-83.
63. Tang, F., et al., *Carboxymethyl chitosan-zinc(II) phthalocyanine conjugates: Synthesis, characterization and photodynamic antifungal therapy*. Carbohydr Polym, 2020. **235**: p. 115949.
64. Tang, F.-X., et al., *Preparation and antifungal properties of monosubstituted zinc(II) phthalocyanine-chitosan oligosaccharide conjugates and their quaternized derivatives*. Dyes and Pigments, 2018. **159**: p. 439-448.
65. Luksiene, Z. and I. Buchovec, *Novel Approach to Control Microbial Contamination of Germinated Wheat Sprouts: Photoactivatedchlorophyllin-Chitosan Complex*. International Journal of Food Processing Technology, 2015. **2**(1): p. 26-30.
66. Luksiene, Z. and I. Buchovec, *Impact of chlorophyllin-chitosan coating and visible light on the microbial contamination, shelf life, nutritional and visual quality of strawberries*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2019. **52**: p. 463-472.
67. Xing, R., et al., *Salt-assisted acid hydrolysis of chitosan to oligomers under microwave irradiation*. Carbohydrate Research, 2005. **340**(13): p. 2150-2153.
68. Jiang, Y., et al., *Determination of the Deacetylation Degree of Chitooligosaccharides*. Marine drugs, 2017. **15**(11): p. 332.
69. Lévesque, S.G. and M.S. Shoichet, *Synthesis of Enzyme-Degradable, Peptide-Cross-Linked Dextran Hydrogels*. Bioconjugate Chemistry, 2007. **18**(3): p. 874-885.
70. Zhu, X., et al., *Synthesis of thiolated chitosan and preparation nanoparticles with sodium alginate for ocular drug delivery*. Molecular Vision, 2012. **18**: p. 1973-1982.

71. Bonanata, J., et al., *The thiol of human serum albumin: Acidity, microenvironment and mechanistic insights on its oxidation to sulfenic acid*. Free Radic Biol Med, 2017. **108**: p. 952-962.
72. Lee, K.Y., et al., *Self-aggregates of deoxycholic acid-modified chitosan as a novel carrier of adriamycin*. Colloid and Polymer Science, 2000. **278**(12): p. 1216-1219.
73. Kumar, A.B., L.R. Gowda, and R.N. Tharanathan, *Non-specific depolymerization of chitosan by pronase and characterization of the resultant products*. Eur J Biochem, 2004. **271**(4): p. 713-23.
74. El Hadrami, A., et al., *Chitosan in plant protection*. Marine drugs, 2010. **8**(4): p. 968-987.
75. Rabea, E.I., et al., *Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action*. Biomacromolecules, 2003. **4**(6): p. 1457-1465.
76. Ganan, M., et al., *Antifungal activity of well-defined chito-oligosaccharide preparations against medically relevant yeasts*. PLOS ONE, 2019. **14**(1): p. e0210208.
77. Goy, R.C., D.d. Britto, and O.B.G. Assis, *A review of the antimicrobial activity of chitosan*. Polímeros, 2009. **19**: p. 241-247.
78. Pretsch, E., et al., *Structure determination of organic compounds*. 2000: Springer.
79. Tsuda, T., et al., *Bioconcentration of butyltin compounds by round crucian carp*. Toxicological & Environmental Chemistry, 1986. **12**(1-2): p. 137-143.
80. Parker, S.F., *Vibrational spectroscopy of N-phenylmaleimide*. Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy, 2006. **63**(3): p. 544-549.
81. Kim, J., et al., *LC-MS/MS analysis of chito-oligosaccharides*. Carbohydrate Research, 2013. **372**: p. 23-29.
82. Dinoiu, V., et al., *Spectroscopic Study on the Riboflavin - Plant Extracts Interaction*. Vol. 62. 2011. 1111-1114.
83. Díez-Pascual, A.M., et al., *Determination of riboflavin based on fluorescence quenching by graphene dispersions in polyethylene glycol*. RSC Advances, 2016. **6**(24): p. 19686-19699.
84. Kim, T.-W., J.-H. Park, and J.-I. Hong, *Self-quenching Mechanism: the Influence of Quencher and Spacer on Quencher-fluorescein Probes*. Vol. 28. 2007.
85. Sheraz, M.A., et al., *Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin*. Beilstein journal of organic chemistry, 2014. **10**: p. 1999-2012.
86. Insińska-Rak, M., et al., *Riboflavin degradation products; combined photochemical and mass spectrometry approach*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2020. **403**: p. 112837.
87. Dibona-Villanueva, L. and D. Fuentealba, *Novel Chitosan-Riboflavin Conjugate with Visible Light-Enhanced Antifungal Properties against Penicillium digitatum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021. **69**(3): p. 945-954.
88. Seo, J., et al., *Stacking Geometries of Early Protoporphyrin IX Aggregates Revealed by Gas-Phase Infrared Spectroscopy*. J Am Chem Soc, 2016. **138**(50): p. 16315-16321.
89. Bernigaud, V., et al., *Electron-capture-induced dissociation of protoporphyrin IX ions*. J Am Soc Mass Spectrom, 2008. **19**(6): p. 809-13.
90. Ericson, M.B., et al., *A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin IX in solution*. Lasers Med Sci, 2003. **18**(1): p. 56-62.

91. Luksiene, Z. and E. Paskeviciute, *Novel approach to the microbial decontamination of strawberries: chlorophyllin-based photosensitization*. Journal of Applied Microbiology, 2011. **110**(5): p. 1274-1283.
92. Ambrosini, V., et al., *Photodynamic inactivation of Botrytis cinerea by an anionic porphyrin: an alternative pest management of grapevine*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 17438.
93. Gonzales, F.P., et al., *Photodynamic inactivation of conidia of the fungi Metarhizium anisopliae and Aspergillus nidulans with methylene blue and toluidine blue*. Photochem Photobiol, 2010. **86**(3): p. 653-61.
94. Valkov, A., F. Nakonechny, and M. Nisnevitch, *Polymer-immobilized photosensitizers for continuous eradication of bacteria*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(9): p. 14984-96.
95. Spagnul, C., L.C. Turner, and R.W. Boyle, *Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications*. J Photochem Photobiol B, 2015. **150**: p. 11-30.
96. Sharma, M., A. Dube, and S.K. Majumder, *Antibacterial photodynamic activity of photosensitizer-embedded alginate-pectin-carboxymethyl cellulose composite biopolymer films*. Lasers Med Sci, 2021. **36**(4): p. 763-772.
97. Diaz, C., et al., *Dispersion of the Photosensitizer 5,10,15,20-Tetrakis(4-Sulfonatophenyl)-porphyrin by the Amphiphilic Polymer Poly(vinylpyrrolidone) in Highly Porous Solid Materials Designed for Photodynamic Therapy*. J Phys Chem B, 2017. **121**(30): p. 7373-7381.
98. M, Q.M., et al., *Revisiting Current Photoactive Materials for Antimicrobial Photodynamic Therapy*. Molecules, 2018. **23**(10).
99. Vara, J., et al., *Two phenothiazine dyes as photosensitizers for the production of singlet oxygen. Photophysics, photochemistry and effects of aggregation*. Journal of Molecular Structure, 2019. **1181**: p. 1-7.
100. Tanielian, C., et al., *Quantum yield of singlet oxygen production by monomeric and aggregated forms of hematoporphyrin derivative*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**(2): p. 208-12.
101. Dadova, J., et al., *Aggregation effects in visible-light flavin photocatalysts: synthesis, structure, and catalytic activity of 10-arylflavins*. Chemistry, 2013. **19**(3): p. 1066-75.
102. D'Souza, V.T., *Modification of Cyclodextrins for Use as Artificial Enzymes*. Supramolecular Chemistry, 2003. **15**(3): p. 221-229.
103. Cibulka, R., R. Vasold, and B. König, *Catalytic Photooxidation of 4-Methoxybenzyl Alcohol with a Flavin–Zinc(II)-Cyclen Complex*. Chemistry – A European Journal, 2004. **10**(24): p. 6223-6231.
104. Scolaro, L.M., et al., *Aggregation Behavior of Protoporphyrin IX in Aqueous Solutions: Clear Evidence of Vesicle Formation*. The Journal of Physical Chemistry B, 2002. **106**(10): p. 2453-2459.
105. Myrzakhmetov, B., et al., *Photophysical Properties of Protoporphyrin IX, Pyropheophorbide-a and Photofrin((R)) in Different Conditions*. Pharmaceuticals (Basel), 2021. **14**(2).
106. Ibarra, L.E., et al., *Metallated porphyrin-doped conjugated polymer nanoparticles for efficient photodynamic therapy of brain and colorectal tumor cells*. Nanomedicine (Lond), 2018. **13**(6): p. 605-624.

107. Park, K.C., J. Cho, and C.Y. Lee, *Porphyrin and pyrene-based conjugated microporous polymer for efficient sequestration of CO<sub>2</sub> and iodine and photosensitization for singlet oxygen generation*. RSC Advances, 2016. **6**(79): p. 75478-75481.
108. Lopez-Moya, F., M. Suarez-Fernandez, and L.V. Lopez-Llorca, *Molecular Mechanisms of Chitosan Interactions with Fungi and Plants*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(2).
109. Palma-Guerrero, J., et al., *Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan*. Mol Microbiol, 2010. **75**(4): p. 1021-32.
110. Fawzya, Y.N., et al., *Antifungal activity of chitosan oligomer prepared using chitosanase of Aeromonas media KLU 11.16*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2019. **278**: p. 012026.

## 10. Anexos

### Cálculos moles GlcNac y GlcN

Considerando:

Peso molecular determinado por viscosimetría de CH<sub>H</sub>: 2426 g/mol

Grado de desacetilación de CH<sub>H</sub> por RMN: 86%.

1 g CH<sub>H</sub> → 4,12x10<sup>-4</sup> moles CH<sub>H</sub>

Entonces

1 mol CH<sub>H</sub> → 0,86 moles GlcN

4,12x10<sup>-4</sup> moles CH<sub>H</sub> → X moles de GlcN

X = (4,12x10<sup>-4</sup> x 0,86) / 1 = 3,54x10<sup>-4</sup> moles GlcN en 1 g CH<sub>H</sub>

Entonces: 4,12x10<sup>-4</sup> – 3,54x10<sup>-4</sup> = 0,58x10<sup>-4</sup> moles GlcNAc en 1 g CH<sub>H</sub>

### Composición Porcentual de componentes en Quitosano:

86% GlcN

14% GlcNAc

Tabla S1. Datos de Ensayo de Ellman para la determinación de grupos tioles libres en quitosano tiolado.

Muestra	Abs	ΔAbs	c [M]
Ellman Control	0.03695	---	---
CHh-SH	0.0306	---	---
CHh-SH + Ellman	1.019	0.92249	6,52x10 <sup>-5</sup>

### Cálculos Reacción de Tiolación y Experimento de Ellman:

Se realizó en una solución de 1mL CH<sub>H</sub>-SH 0,1% (m/v) en Buffer Pirofosfato pH 9 y se obtiene una concentración de 6,52x10<sup>-5</sup> M de SH en el Quitosano Tiolado.

6,52x10<sup>-5</sup> moles de -SH → 1000mL

X moles de -SH → 1mL

$X = (6,52 \times 10^{-5} \times 1) / 1000 = 6,52 \times 10^{-8}$  moles de -SH en 1 mL de solución CH<sub>H</sub>-SH 0,1%(m/v).

Luego:

CH<sub>H</sub>-SH 0,1%(m/v) = 0,1g → 100mL

X g → 1mL

$X = (0,1 \times 1) / 100 = 0,001$ g de CH<sub>H</sub>-SH en 1mL de solución 0,1%(m/v).

Entonces:

$6,52 \times 10^{-8}$  moles de -SH → 0,001g CH<sub>H</sub>-SH

X moles de -SH → 1g CH<sub>H</sub>-SH

$X = (6,52 \times 10^{-8} \times 1) / 0,001 = 65,2 \times 10^{-6}$  moles -SH en 1 g CH<sub>H</sub>

Como la reacción de Tiolación solo puede ocurrir en GlcN:

$3,54 \times 10^{-4} - 65,2 \times 10^{-6} = 2,88 \times 10^{-4}$  moles de GlcN restantes luego de reacción de tiolacion.

#### Cálculos para cantidad de RF en CH-RF

Emisión de Fluorescencia a 524nm, paso óptico 1cm, 3mL CH<sub>H</sub>-RF 0,1%(m/v) en agua: 0,1477

Por Curva de Fluorescencia (Figura 19) (a partir de RF-PMPI 4,29mM):  $y = 0,02151 + 30094,923x$   $r^2 = 0,9991$

$C = (0,1477 - 0,02151) / 30094,923 = 4,19 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$

$4,19 \times 10^{-6}$  moles RF → 1000mL

X moles RF → 3mL

$X = (4,19 \times 10^{-6} \times 3) / 1000 = 1,257 \times 10^{-8}$  moles de RF en 3mL CH<sub>H</sub>-RF 0,1% (0,003g)

$1,257 \times 10^{-8}$  moles RF → 0,003g Conjugado

X moles RF → 1g Conjugado

$X = (1,257 \times 10^{-8} \times 1) / 0,003 = 4,19 \times 10^{-6}$  moles de RF en 1g de Conjugado.

Cálculos para la concentración de PPIX en CH-PPIX:

Emisión de Fluorescencia a 635nm, paso óptico 1cm, 3mL CH-PPIX  
2.2x10<sup>-3</sup>%(m/v) en Tween 1%/Ácido acético 2%: 0.08259

Por Curva de Fluorescencia (Figura 29) y = 0,00318 + 6.42057x10<sup>6</sup> x  
r<sup>2</sup>= 0,9996

$$C = (0.082597 - 0,00318) / 6.42057 \times 10^6 = 1.236 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$$

$$1.236 \times 10^{-8} \text{ moles PPIX} \rightarrow 1000\text{mL}$$

$$X \quad \text{moles PPIX} \rightarrow 3\text{mL}$$

$$X = (1.236 \times 10^{-8} \times 3) / 1000 = 3.71 \times 10^{-11} \text{ moles de PPIX en 3mL CH-PPIX}$$
$$2.2 \times 10^{-5}\%$$

$$3.71 \times 10^{-11} \text{ moles PPIX} \rightarrow 6.6 \times 10^{-7} \text{ g Conjugado}$$

$$X \quad \text{moles PPIX} \rightarrow 1\text{g Conjugado}$$

$$X = (3.71 \times 10^{-11} \times 1) / 6.6 \times 10^{-7} = 56,21 \times 10^{-6} \text{ moles de RF en 1g de Conjugado.}$$

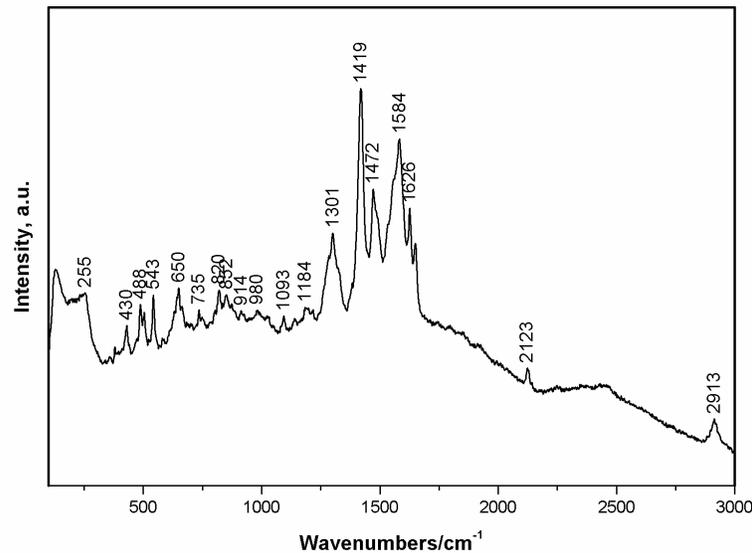


Figura S1. Espectro RAMAN del conjugado CH-RF.

Los espectros Raman fueron recolectados por un espectrometro Raman, marca Renishaw, modelo InVia, con un detector CCD, utilizando una fuente de excitación laser de 785nm. Para la obtencion del espectro SERS (surface-enhanced Raman Scattering) se utilizaron coloides de plata utilizando citrato sodico como reductor (metodo Lee-Meisel).

Desaparicion S-H Stretching ( $2600-2580\text{ cm}^{-1}$ ) que da cuenta de que los -SH ya no estan o bien estan posicionados de una manera que el detector no los puede observar. Ademas en el espectro se observan las bandas  $533, 650, 735, 820$  y  $832\text{ cm}^{-1}$  que indican Stretching simetrico y asimetrico de los enlaces C-S. Los corrimientos raman fueron asignados a partir de las siguientes referencias: (Lin-Vien, Colthup et al. 1991) Lin-Vien, D., et al. (1991) y The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules, Elsevier.

Tabla S2. Asignaciones de los corrimientos RAMAN del conjugado CH-RF.

Raman Shift	Assign
650	Ring Bending, C-S-C Stretching
735	C-S-C Stretching, C-S Stretching, C-S-R Stretching
820	CS Stretching
832	CS Stretching
914	CC Stretching
980	CC Stretching
1093	C=C sym. Stretching
1184	C-C Skeletal Stretching
1301	Methylene twist-rocking
1419	Benzene para-subst.
1472	HCH Deformation
1584	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> asym. Def.
1626	C=O Stretching
2123	Ar-NC
2913	CH <sub>2</sub> antisym. Stretching

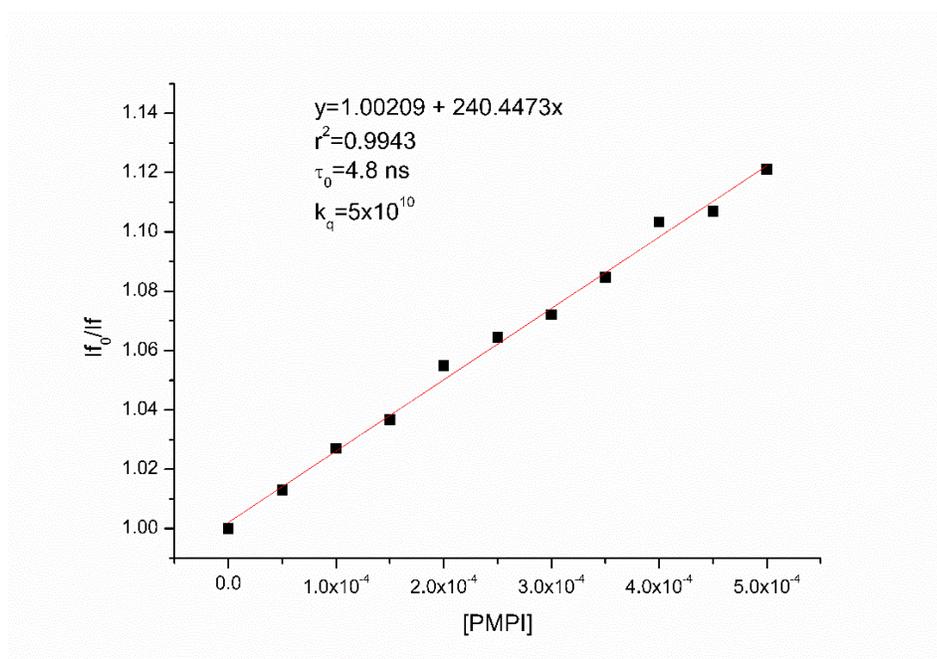


Figura S2. Gráfico de Stern Volmer para el sistema RF utilizando de apagador PMPI.

La constante  $k_q$  fue calculada utilizando el tiempo de vida obtenido de la tabla 4 y utilizando la ecuación de Stern-Volmer:

$$I_{f0}/I_f = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$