

FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE



DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

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

"COMPLEJOS BIOSUPRAMOLECULARES DE DERIVADOS DE AZUL DE TOLUIDINA UNIDOS COVALENTEMENTE A ALBÚMINA DE SUERO HUMANA Y SU INTERACCIÓN CON CUCURBIT[7]URILO. ESTUDIOS DE SU FOTOTOXICIDAD EN CÉLULAS TUMORALES CULTIVADAS *IN VITRO*"

Tesis presentada por:

NORY JOHANA MARIÑO OCAMPO

Para optar al Grado Académico de Doctor en Química.

APROBADA POR:

Dra. Margarita Aliaga Miranda Prof. Examinador	
Dr. Nancy Pizarro Urzúa Prof. Examinador	
Dra. Angélica Fierro Huerta Prof. Examinador	
Dr. Germán Günther Sapunar Prof. Examinador	
Dr. Denis Alberto Fuentealba Patiño Prof. Director de Tesis	

MARZO - 2022

Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido. Ahora es el momento de comprender más para temer menos .- Marie Curie

Agradecimientos

Inicialmente a Dios, por permitirme tener salud y todas las diferentes oportunidades que se me presentaron en este camino.

A la Facultad de Química y de Farmacia por su formación.

A la Vicerrectoria de Investigación UC (VRI) y la Agencia Naciónal de Investigación y Desarrollo (ANID) por financiar mi posgrado con la Beca ANID No. 21210160, también a los proyectos FONDECYT No. 1160443 y los FONDEQUIP UHPL-MS/MS No. 120065 y ITC EQM No. 170120. Finalmente, a la beca Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP) que me financio mi estadía de investigación en Canadá en la Universidad de Calgary.

A mi tutor el Dr. Denis Fuentealba por sus enseñanzas, paciencia y apoyo en cada una de las etapas tanto de investigación como de crecimiento como profesional.

A la comisión la Dra. Margarita Aliga, Dra. Nancy Pizarro, Dra. Angélica Fierro y el Dr. German Günter por guiarme y corregirme durante la tesis y así lograr culminarla exitosamente.

A la Dra. Belinda Heyne por recibirme en su laboratorio y guiarme en mi estadía de investigación en la Universidad de Calgary.

A todos mis compañeros de laboratorio José, Luciano, Daniel Guerra, Daniel Zúñiga, Elizabeth, Pablo, Benjamín, Fresia, Liliana, Felipe, Nicole y Skarlet por cada momento de apoyo motivacional, excelentes discusiones de investigación y felices momentos que pudimos compartir durante estos años.

A mi amada familia, a mi padre que desde muy pequeña siempre me dio las alas para poder alcanzar los objetivos que me proponga, a mi madre que siempre me ha apoyado de todas las maneras posibles en todas mis locuras y en todas mis travesías. A mi hermana y Edith, por siempre ser un apoyo y cuidar a toda la familia incluyendo a Chanel y Laddoo. A mi abuela por siempre velar por apoyarme en cada paso que he dado.

A mi amado Diego F. Rodríguez por ser ese soporte emocional, físico y psicológico en cada una de las fases durante toda esta aventura, manteniendo siempre el equipo que se apoya totalmente.

Finalmente, a mis amigos Paola, Vanessa, Ingri, Alejandro y Juan David que desde lejos me han brindado su apoyo.

Lista de Abreviaciones

¹ O ₂	Oxígeno Singlete	9	
AMPSO	Ácido	3-[(1,1-dimetil-2-hidroxietil)	amino]-2-
	hidroxipropansulf	ónico	
aPDT	Terapia Fotodinámica Antimicrobial		
BSA	Albúmina de Suero Bovino		
CB[7]	Cucurbit[7]urilo		
CID	Disociación inducida por colisión		
Cob+	Hexafluorofosfato de cobaltaceno		
Cys34	Residuo de cisteína 34		
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad		
DIPEA	N, N-diisopropilet	tilenamina	
DMEM	Medio de cultivo	modificado	
DMF	Dimetilformamida	a	
DTBO	Derivados de Azul de Toluidina		
DTT	Ditiotreitol		
EMCS	N-succinimidil 6-r	maleimidocaproato	
EPR	Efecto de Perme	abilidad y Retención mejorada	
ESI	Ionización por Ele	ectrospray	
Φ_Δ	Rendimiento cuá	ntico de oxígeno singlete	
Φ_{F}	Rendimiento cuá	ntico de fluorescencia	
Φ_{pd}	Rendimiento cuá	ntico de fotodegradación	
FBS	Suero bovino feta	al	
FDA	Administración de	e medicamentos y Alimentos	
HeLa	Línea celular de o	cáncer cérvico-uterino	
HRMS	Espectrometría d	le masa de alta resolución	
HSA	Albúmina de Sue	ro Humana	
IC	Conversión Intern	na	

ISC	Cruce entre Sistemas
ITC	Calorimetría de Titulación Isotérmica
Ka	Constante de asociación
LDLs	Lipoproteína de Baja Densidad
MB	Azul de Metileno
MC	Medio de cultivo sin suplementar
MC3%	Medio de cultivo suplementado al 3%
MC10%	Medio de cultivo suplementado al 10%
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
NaP	Fosfato de sodio dibasico dihidratado
NaPP	Pirofosfato de Sodio
PDT	Terapia Fotodinámica
PS	Fotosensibilizador
RB	Rosa de Bengala
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SPDP	N-succinimidil 3-(2-piridiltio)propionato
ТВО	Azul de Toluidina

Índice de Contenido

Índice de TablasI	V
Índice de Figuras	V
Índice de EsquemasIX	X
Índice de Ecuaciones	X
Índice de AnexosX	(]
Capítulo I. Introducción	1
1.1. Cáncer, Impacto en la sociedad	1
1.2. Terapia Fotodinámica, Tratamiento contra el Cáncer	1
1.3. Fotosensibilizadores	4
1.4. Oxígeno Singlete	5
1.4.1. Rendimiento cuántico	8
1.5. Azul de Toluidina 14	4
1.6. Albúmina de suero humana como vehículo de transporte de	е
fármacos15	5
1.7. Conjugaciones covalentes de fármacos1	8
1.8. Cucurbiturilos20	0
1.9. Complejos Biosupramoleculares2	2
Capítulo II. Hipótesis de Trabajo 23	3
Capítulo III. Objetivos	3
3.1. Objetivo general	3
3.2. Objetivos específicos	3
Capítulo IV. Parte Experimental 24	4
4.1. Reactivos	4
4.2. Síntesis y Caracterización de los derivados del azul de toluidina 24	4
4.2.1. Síntesis del derivado del N-succinimidil 3-(2-piridiltio)propionationation	0
(TBOPDP)	4
4.2.2. Síntesis del derivado del N-succinimidil 6-maleimidocaproat	0
(TBOEMC)	5

I

4.2.3. Caracterización mediante Espectrometría de masas
4.2.3.1. Espectrometria de masas de alta resolucion HRMS 26
4.2.3.2. Espectrometria de masas de UHPLC-MS/MS
4.3. Determinación de la formación de los complejos de inclusión de los
derivados del TBO y CB[7] 27
4.3.1. Determinación de las constantes de asociación con el
CB[7]27
4.3.2. Estudios computacionales de los complejos de inclusión de los
derivados del TBO y CB[7] 28
4.4. Unión covalente de los derivados del azul de toluidina a la HSA 29
4.4.1. Liberación del residuo de Cys34 de la HSA
4.4.2. Cuantificación del residuo de Cys34 libre de la HSA
4.4.3. Determinación del pKa del residuo de Cys34 de la HSA
4.4.4. Unión covalente de los derivados de TBO con el residuo de Cys34
de la HSA
4.5. Caracterización por Espectrometria de masas de MALDI-TOF 31
4.6. Caracterización por Dicroismo Circular 31
4.7. Caracterización Fotofísica y Fotoquímica
4.7.1. Determinación de la fotoestabilidad de los Derivados de Azul de
Toluidina
4.7.2. Determinación del tiempo de vida de Fluorescencia
4.7.3. Determinación de oxígeno singlete y rendimiento cuántico 33
4.7.4. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia
4.8. Estudios <i>in-vitro</i>
4.8.1. Ensayos de viabilidad celular
4.8.2. Determinación de citotoxicidad en oscuro
4.8.3. Determinación de fototoxicidad de los derivados de TBO y los
diferentes sistemas
4.8.4. Estudios de incorporación de los derivados de TBO y los diferentes
sistemas

Capítulo V. Resultados y Discusión 4	0
5.1. Síntesis y Caracterización de los derivados 4	0
5.1.1. Síntesis y Caracterización de TBOPDP 4	0
5.1.2. Síntesis y caracterización de TBOEMC 4	6
5.1.3. Caracterización Fotofísica de los derivados de azul de toluidina 5	1
5.1.4. Fotoestabilidad de los derivados de azul de toluidina 5	3
5.2. Determinación de la formación de los complejos de inclusión de lo	S
derivados del TBO y el CB[7]5	6
5.2.1. Determinación de la constante de asociación con el CB[7] 5	8
5.2.2. Estudios computaciones de los complejos de inclusión de lo	S
derivados del TBO y CB[7]6	1
5.3. Unión covalente de los derivados del azul de toluidina a la HSA 6	3
5.3.1. Determinación del pKa del residuo de Cys34 de la HSA6	3
5.3.2. Unión covalente de TBOPDP y TBOEMC con el residuo de Cys3	4
de la HSA6	4
5.4. Complejos Biosupramoleculares6	7
5.5. Estudio del tiempo de vida de fluorescencia6	9
5.6. Determinación de oxígeno singlete7	1
5.7. Estudios <i>in-vitro</i> 7	7
5.7.1. Determinación de citotoxicidad en oscuro7	8
5.7.2. Determinación de fototoxicidad de los derivados de TBO y lo	S
diferentes sistemas78	8
5.7.3. Estudios de incorporación de los derivados de TBO y los diferente	s
sistemas	4
Capítulo VI. Conclusiones	0
Bibliografía9	2

Índice de Tablas

Tabla 1. Resumen de procesos de producción y desactivación de ${}^{1}O_{2}$.[47]12
Tabla 2. Rendimiento cuántico de fotodegradación (Φ_{pd}) y constante de
velocidad de pseudo-primer orden (k_{pd}) en solución buffer del TBO y sus
derivados55
Tabla 3. Tiempos de vida de fluorescencia para el TBO, TBOPDP y TBOEMC.
Tabla 4. Determinación del tiempo de vida del oxígeno singlete y rendimiento
cuántico de oxígeno singlete para los derivados, conjugados, complejos y
complejos biosupramoleculares en acetonitrilo y en buffer fosfato 10 mM pH
7.0. Equilibrado a la atmósfera
Tabla 5. Rendimiento cuántico de fluorescencia relativo para los derivados,
conjugados, complejos en acetonitrilo y en buffer fosfato 10 mM pH 7.0.
Equilibrado a la atmósfera77
Tabla 6. Resultados de citotoxicidad en oscuro a 24 horas de incubación a
distintas concentraciones de fotosensibilizador en células HeLa

Índice de Figuras

Figura 1. Representación de los diagramas de orbital molecular del oxígeno
molecular $3\Sigma g$ – y sus dos estados excitados $1\Delta g$ y $1\Sigma g$ +
Figura 2. Diagrama de energía potencial del oxígeno molecular en estado
basal y sus dos estados excitados degenerados.[35]7
Figura 3. Estructura química del Azul de Toluidina (TBO) 15
Figura 4. Estructura cristalina de la HSA PDB:1AO6. Se presentan los
dominios I, II, III sus respectivos sub-dominios, sitios Sudlow 1-2 y el residuo
de cisteína Cys34.[68] 17
Figura 5. Estructura general de los CB[n]s (n=5-8,10), Estructura CB[n]s
cíclicos como CB[7] y CB[8]s21
Figura 6. Reacción del reactivo de Ellman para determinación de grupos tioles
libres
Figura 7. Espectro de masa de alta resolución del derivado TBOPDP en modo
de ionización positivo
Figura 8. Espectro de ¹ H RMN del derivado TBOPDP en CD ₃ OH 44
Figura 9. Comparación de espectros de 1H RMN de los reactivos TBO y SPDP
con el derivado TBOPDP en CD ₃ OH 45
Figura 10. Prueba de DTT para la detección del 2-mercaptopiridina. Espectro
de absorción: a) TBOPDP (rojo) , b) TBOPDP con DTT (azul) 46
Figura 11. Espectro de masa exacta del derivado TBOEMC en modo de
ionización positivo
Figura 12. Espectro de ¹ H RMN del derivado TBOEMC en CD ₃ OH 50
Figura 13. Comparación de espectros de 1H RMN de los reactivos TBO y
EMCS con el derivado TBOEMC en CD ₃ OH 51
Figura 14. a) Espectro de absorción normalizada del: TBO (azul, $\lambda_{\text{max}}626$ nm),
TBOPDP (magenta, λ_{max} 550 nm) y TBOEMC (verde, λ_{max} 544 nm). b)
Espectro de emisión normalizada del: TBO (azul, λ_{max} 658 nm), TBOPDP
(magenta, λ_{max} 623 nm) y TBOEMC (verde, λ_{max} 626 nm) en acetonitrilo 52

V

Figura 15. a) Espectro de absorción normalizada del: TBO (azul, λ_{max} 636 nm), TBOPDP (magenta, λ_{max} 609 nm) y TBOEMC (verde, λ_{max} 610 nm). b) Espectro de emisión normalizada del: TBO (azul, λ_{max} 664 nm), TBOPDP (magenta, λ_{max} 651 nm) y TBOEMC (verde, λ_{max} 656 nm) en buffer fosfato 10 Figura 16. Ajuste a una cinética de pseudo-primer orden del TBO(Azul), TBOPDP(Violeta), TBOEMC (Magenta) en solución buffer fosfato. Irradiado a Figura 17. a) Espectro de absorción normalizada de: TBOPDP (2 µM) en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 en ausencia (magenta, λ_{max} 609 nm) y presencia de CB[7] 50 μ M (azul, λ_{max} 608 nm). b) Espectro de emisión de: TBOPDP (2 μ M) en ausencia (magenta, λ_{max} 651 nm) y presencia de CB[7] 50 μ M (azul, λ_{max} Figura 18. a) Espectro de absorción normalizada de: TBOEMC (2 µM) en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 en ausencia (magenta, λ_{max} 610 nm) y presencia de CB[7] 50 μ M (azul, λ_{max} 609 nm). b) Espectro de emisión normalizada de: TBOEMC (2 μ M) en ausencia (magenta, λ_{max} 656 nm) y presencia de CB[7] Figura 19. Isoterma de unión del TBOPDP 2 µM en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a CB[7] (0-30 μ M), excitando a 610 nm y recolectando los datos a 646 nm...... 59 Figura 20. Isoterma de unión del TBOEMC 2 µM en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a CB[7] (0-100 μ M), excitando a 610 nm y recolectando los datos a 648 nm...... 60 Figura 21. Acople molecular de los complejos de inclusión: a) TBO@CB[7], b) Figura 22. Determinación del pKa del residuo de cisteína34 de la albúmina de suero humana......64 Figura 23. Espectros de absorción en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 de: a) HSA-TBOPDP (λ_{max} 595 nm) y b) HSA-TBOEMC (λ_{max} 600 nm). Los recuadros

muestran una ampliación de la banda de absorción entre 500-700 nm. Espectros de emisión normalizada de: c) TBOPDP (rojo, λ_{max} 651 nm) y HSA-TBOPDP (azul, λ_{max} 645 nm), d) TBOEMC (rojo, λ_{max} 656 nm) y HSA-TBOEMC Figura 24. Espectros MALDI-TOF de: a) HSA-TBOEMC., b) HSA-TBOPDP, c) Figura 25. Espectros de absorción en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 de: a) HSA-TBOPDP@CB[7] (λ_{max} 595 nm) y b) HSA-TBOEMC@CB[7] (λ_{max} 600 nm). Los recuadros muestran una ampliación de la banda de absorción entre 500-700 nm. Espectros de emisión normalizada de: c) TBOPDP (rojo, λ_{max} 651 nm) y HSA-TBOPDP@CB[7] (azul, λ_{max} 643 nm), d) TBOEMC (rojo, λ_{max} 656 nm) y Figura 26. Estudios del tiempo de incubación de los derivados: a) TBOPDP y b) TBOEMC a una concentración de 2 µM e incubados durante 1.5, 3, 6 y 24 horas. Las barras oscuras corresponden a los controles de cada sistema en Figura 27. Estudios de la citotoxicidad de los derivados solos y conjugados a la HSA a concentraciones de: a) $2 \mu M y b$) $3 \mu M$. Cada sistema fue incorporado e irradiado durante 90 minutos. Las barras oscuras corresponden a los controles de cada sistema en oscuro y las barras violetas a las muestras Figura 28. Estudios de fototoxicidad del TBOPDP solo y con diferentes sistemas de transporte como HSA y CB[7]. Cada sistema fue incorporado e irradiado durante 90 minutos. Las barras oscuras corresponden a los controles de cada sistema en oscuro y las barras violetas a las muestras irradiadas. El TBOPDP 3 µM solo, en presencia de CB[7] 50 µM (TBOPDP@CB[7]), conjugado con la HSA donde la HSA tenía una concentración de 6 µM (HSA-TBOPDP) y el complejo biosupramolecular en presencia de HSA 6 µM y CB[7]

VII

Figura 29. Estudios de fototoxicidad del TBOEMC solo y con diferentes sistemas de transporte como HSA y CB[7]. Cada sistema fue incorporado e irradiado durante 90 minutos. Las barras oscuras corresponden a los controles de cada sistema en oscuro y las barras violetas a las muestras irradiadas. El TBOEMC 3 µM solo, en presencia de CB[7] 50 µM (TBOEMC@CB[7]), conjugado con la HSA donde la HSA tenía una concentración de 7 µM (HSA-TBOEMC) y el complejo biosupramolecuar en presencia de HSA 7 µM y CB[7] Figura 30. Estudios de incorporación de: a) El TBOPDP 3 µM solo, en presencia de CB[7] 50 µM (TBOPDP@CB[7]), conjugado con la HSA donde la HSA tenía una concentración de 6 µM (HSA-TBOPDP) y el complejo biosupramolecuar en presencia de HSA 6 µM y CB[7] 50 µM (HSA-TBOPDP@CB[7]). b) EI TBOEMC 3 µM solo, en presencia de CB[7] 50 µM (TBOEMC@CB[7]), conjugado con la HSA donde la HSA tenía una concentración de 7 µM (HSA-TBOEMC) y el complejo biosupramolecuar en presencia de HSA 7 µM y CB[7] 50 µM (HSA-TBOEMC@CB[7]) incubados

Índice de Esquemas

Esquema 1. a) Diagrama de Jablonski de un PS donde se representa lo	S
métodos de desactivación y las reacciones fotoquímica tipo I y II, t))
Representación de la PDT y muerte tumoral. [16]	3
Esquema 2. Diagrama general de desactivación del PS	9
Esquema 3. Reacción del TBO con éster SPDP para preparar el derivad	0
TBOPDP	0
Esquema 4. Reacción del TBO con éster EMCS para preparar el derivad	0
TBOEMC	7

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Ecuación general del rendimiento cuántico de un proceso (i) 9
Ecuación 2. Ecuación general del rendimiento cuántico de fluorescencia 10
Ecuación 3. Ecuación del rendimiento cuántico de fluorescencia 10
Ecuación 4. Ecuación general del rendimiento cuántico de fotodegradación.
Ecuación 5. Ecuación de intensidad de luz absorbida
Ecuación 6. Ecuación general del rendimiento cuántico de generación de PS
en el estado excitado triplete 12
Ecuación 7. Ecuación del tiempo de vida del PS en el estado excitado triplete
en ausencia de oxígeno 13
Ecuación 8. Ecuación del tiempo de vida del PS en el estado excitado triplete
en presencia de oxígeno 13
Ecuación 9. Ecuación de la proporción de ³ PS desactivado por oxígeno 13
Ecuación 10. Ecuación de la fracción de ³ PS desactivado por oxígeno 13
Ecuación 11. Ecuación de rendimiento cuántico de generación de oxígeno
singlete14
Ecuación 12. Ecuación utilizada para el ajuste de los datos de las isotermas
de unión para la determinación de la constante de asociación
Ecuación 13. Ecuación utilizada para el ajuste en base a la ecuación de
Henderson-Hasselbach
Ecuación 14. Ajuste del decaimiento de fluorescencia
Ecuación 15. Modelo bi-exponencial de la formación y decaimiento del oxígeno
singlete
Ecuación 16. Ecuación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete 35

Índice de Anexos

Anexo 1. Volumen de las cajas utilizadas para los cálculos de acoplamiento
molecular
Anexo 2. Espectro de masa de derivado TBOPDP tomado en el UHPLC-
MS/MS. Se empleó como fase móvil Metanol:Ácido fórmico (100:0.1) y como
fase estacionaria una columna fase reversa C18
Anexo 3. Primer fragmento detectado del derivado TBOPDP. Se empleó como
fase móvil Metanol:Ácido fórmico (100:0.1) y como fase estacionaria una
columna fase reversa C18 117
Anexo 4. Segundo fragmento detectado del derivado TBOPDP. Se empleó
como fase móvil Metanol:Ácido fórmico (100:0.1) y como fase estacionaria una
columna fase reversa C18 118
Anexo 5. Cromatograma obtenido del UHPLC del TBO usando como fase móvil
Metanol:Ácido fórmico (100:0.1) y como fase estacionaria una columna fase
reversa C18 119
Anexo 6. Cromatograma obtenido del UHPLC del TBOPDP usando como fase
móvil Metanol:Ácido fórmico (100:0.1) y como fase estacionaria una columna
fase reversa C18 120
Anexo 7. Espectro ¹ H RMN del TBO. ¹ H RMN (400 MHz, Metanol-d ₃) δ 7.90-
7.71 (m, 2H), 7.42 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 3.36 (s, 6H), 2.29 (d, <i>J</i> =
30.0 Hz, 3H) 121
Anexo 8. Espectro ¹ H RMN del SPDP. ¹ H RMN (400 MHz, Metanol-d ₃) δ 8.43
(d, J=4.8 Hz, 1H), 7.86 (m, 2H), 7.23 (t, J=5.7 Hz, 1H), 3.16 (t, J=6.3 Hz, 2H),
3.08 (t, J=6.5 Hz, 2H), 2.85 (s, 4H) 122
Anexo 9. Espectro ¹ H RMN del EMCS. ¹ H RMN (400 MHz, Metanol-d ₃) δ 6.79
(s, 2H), 3.51 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H), 2.84 (s, 4H), 2.62 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 1.75 (m,
2H) 1.62 (m. 2H) 1.41 (m. 2H) 123

Anexo 10. Ampliación de la comparación de la región alifática del espectro de RMN ¹H del derivado TBOPDP con sus dos precursores TBO y SPDP en Anexo 11. Ampliación de la comparación de la región aromática del espectro de RMN ¹H del derivado TBOPDP con sus dos precursores TBO y SPDP en Anexo 12. Espectro ¹³C RMN del TBOPDP. ¹³C RMN (100 MHz, metanol-d₃) δ 17.9, 35.7, 37.6, 40.5, 113.1, 117.0, 121.2, 122.4, 125.1, 125.9, 126.8, 127.2, 127.4, 131.3, 134.4, 137.9, 138.3, 139.2, 143.5, 150.4, 161.2, 173.1. 126 Anexo 13. Espectro de masa del derivado TBOEMC tomado en el UHPLC-MS/MS. Se empleó como fase móvil Metanol: Ácido fórmico (100:0.1) y como Anexo 14. Fragmento detectado del derivado TBOEMC. Se empleó como fase móvil Metanol: Ácido fórmico (100:0.1) y como fase estacionaria una columna Anexo 15. Cromatograma obtenido del UHPLC del TBOEMC usando como fase móvil Metanol: Ácido fórmico (100:0.1) y como fase estacionaria una columna fase reversa C18. 129 Anexo 16. Ampliación de la comparación de la región alifática del espectro de RMN ¹H del derivado TBOEMC con sus dos precursores TBO y EMCS en Anexo 17. Ampliación de la comparación de la región aromática del espectro de RMN ¹H del derivado TBOEMC con sus dos precursores TBO y EMCS en Anexo 18. Espectro ¹³C RMN del TBOEMC. ¹³C RMN (100 MHz, metanol-d₃) δ 17.41, 25.42,27.45, 29.18, 34.68, 38.44, 41.50, 106.89, 108.43, 119.93, 122.47, 127.62, 131.45, 135.44, 136.48, 137.50, 139.52, 155.57, 158.09, Anexo 19. Comparación de los máximos de absorción y emisión de los derivados (TBOPDP y TBOEMC), complejos (TBOPDP@CB[7] y TBOEMC@CB[7]), conjugados (HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC), complejos biosupramoleculares (HSA-TBOPDP@CB[7] y HSA-TBOEMC@CB[7]) y su precursor TBO en acetonitrilo y buffer fosfato 10 mM pH 7.0..... 133 Anexo 20. Fotodegradación del TBO(Azul), TBOPDP(Violeta), TBOEMC Anexo 21. Cinética de reacción entre la HSA y el TBOPDP monitoreada por 1 Anexo 22. Espectro de dicroísmo celular normalizado para la HSA (rojo), HSA-Anexo 23. Tiempos de vida de fluorescencia para el TBO, TBOPDP y TBOEMC obtenidos en atmósfera inerte. 137 Anexo 24. Señal de fosforescencia resuelta en el tiempo de ¹O₂ obtenida en acetonitrilo a 1270 nm de: a) TBO (negro, izquierda), TBOPDP (negro, centro), TBOEMC (negro, derecha) y su correspondiente ajuste (azul). b) Graficas residuales obtenidas de los ajustes. 138 Anexo 25. Señal de fosforescencia resuelta en el tiempo de ¹O₂ obtenida en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 a 1270 nm de: a) TBO (negro, izquierda), TBOPDP (negro, centro), TBOEMC (negro, derecha) y su correspondiente ajuste (azul). Anexo 26. Señal de fosforescencia resuelta en el tiempo de ¹O₂ obtenida en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 a 1270 nm de: a) TBO@CB[7] (negro, izquierda), TBOPDP@CB[7] (negro, centro), TBOEMC@CB[7] (negro, derecha) y su correspondiente ajuste (azul). b) Graficas residuales obtenidas de los ajustes. Anexo 27. Señal de fosforescencia resuelta en el tiempo de ¹O₂ obtenida en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 a 1270 nm de: a) HSA-TBOPDP (negro,

Resumen

El cáncer es la segunda causa de muerte reportada a nivel mundial, entre las diversas terapias empleadas para su tratamiento se encuentra la terapia fotodinámica (PDT). La PDT consta del uso de tres componentes: oxígeno, un agente fotoactivo llamado fotosensibilizador (PS) y luz. En el contexto de la terapia fotodinámica, el presente trabajo se basó en la síntesis de dos derivados del fotosensibilizador Azul de Toluidina y el empleo de dos vehículos como lo son la albúmina de suero humana (HSA) y el macrociclo cucurbit[7]urilo (CB[7]). Los derivados sintetizados poseen un enlace disulfuro y un anillo de maleimida respectivamente, lo que permitió realizar su conjugación covalente con el residuo de cisteína 34 de la HSA y posteriormente la formación de un complejo biosupramolecular con el CB[7], esto con el objetivo de incrementar su incorporación y efecto fototóxico en células tumorales cultivadas *in vitro*.

Los resultados obtenidos comprueban la síntesis de los derivados, conjugados con la HSA, formación de los complejos de inclusión con el CB[7] y complejos biosupramoleculares con la HSA y el CB[7]. La caracterización química se realizó empleando técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas y dicroísmo circular. La caracterización fotofísica y fotoquímica se realizó determinando los espectros de absorción, fluorescencia en estado estacionario, fluorescencia resuelta en el tiempo, determinación de la fotoestabilidad, rendimiento cuántico de oxígeno singlete y rendimiento cuántico de fluorescencia. Los derivados presentaron mayor fotoestabilidad y un rendimiento cuántico de oxígeno singlete similar respecto a su precursor en solución buffer, estos resultados son de gran interés para su aplicación en la terapia fotodinámica. Los complejos de inclusión entre los derivados y el CB[7] presentaron constantes de asociación altas y cambios en sus propiedades fotofísicas como se vio reflejado en el rendimiento cuántico de fluorescencia y

de oxígeno singlete. Los conjugados con la HSA presentaron cambios en sus propiedades fotofísicas con la aparición de una banda de absorción y emisión en el rango visible, y así mismo, cambios considerables en el rendimiento cuántico de oxígeno singlete. Finalmente, los estudios *in-vitro* de los diferentes derivados y sistemas mostraron una diferencia significativa en la incorporación de los sistemas en los que participaba la HSA como vehículo e influenciando en su fototoxicidad. La información obtenida permitió demostrar las ventajas y el potencial uso de los conjugados y complejos biosupramoleculares en la terapia fotodinámica.

Capítulo I. Introducción

1.1. Cáncer, Impacto en la sociedad

Cáncer es un término genérico para un gran grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento de células anormales más allá de sus límites habituales que luego pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y/o diseminarse a otros órganos.[1] En el presente año se estima que los casos de personas que padecen cáncer son de 19.3 millones de nuevos casos y 10 millones de casos de muertes alrededor del mundo en el 2020. Uno de cada 5 hombres y una de cada 6 mujeres en el mundo desarrollan cáncer durante su vida, y uno de cada 8 hombres y una de cada 11 mujeres muere debido a esta enfermedad.[2] En Chile, el cáncer es la segunda causa de muerte para ambos sexos luego de las enfermedades cardiovasculares; las muertes por cáncer presentadas en el año 2017 fueron el 25.9% del total de decesos presentados en el país.[3, 4] Los tratamientos tradicionales para combatir el cáncer incluyen la cirugía, radioterapia y quimioterapia; pero a pesar de sus ventajas estos procedimientos presentan efectos secundarios o son métodos invasivos. Debido a esto, se ha investigado y desarrollado en las últimas décadas un tipo de terapia alternativa denominada Terapia Fotodinámica.[5]

1.2. Terapia Fotodinámica, Tratamiento contra el Cáncer

La terapia fotodinámica (PDT–Photodynamic Therapy) es un tratamiento terapéutico aplicado para diversos tipos de cáncer;[6] esta terapia también es utilizada para patologías no cancerígenas como el tratamiento del acné [7, 8] e infecciones microbianas.[9-13] La PDT es una terapia mínimamente invasiva, la cual requiere el uso de tres factores: un fotosensibilizador, oxígeno y luz. La molécula denominada fotosensibilizador (PS-Photosensitizer) es un

cromóforo natural o sintético que absorbe luz a una longitud de onda específica; este es incorporado al tejido o células tumorales para luego ser excitado por una fuente de luz y generar especies reactivas de oxígeno (ROS-Reactive Oxygen Species), las cuales desencadenaran la muerte de células tumorales y posterior reducción o eliminación del tejido tumoral.[14] Cuando el PS que fue incorporado en la célula es expuesto a una longitud de onda específica pasa del estado basal (S_0) a su estado excitado singlete (S_1) , este estado tiene un tiempo de vida corto en el orden de nano a picosegundos y se desactiva por vías de conversión interna (IC-Internal Conversion) o de manera radiativa (fluorescencia). Alternativamente estando en el estado S1 puede ocurrir un cruce entre sistemas (ISC-Intersystem Crossing) y pasar al estado triplete excitado (T₁), este estado tiene un tiempo de vida en el orden de microsegundos. El estado T1 implica un cambio en el estado electrónico, lo que conlleva que la desactivación al estado basal esta prohibida por el spin por esta razón el tiempo de vida es más prolongado en comparación al estado S₁; en este estado se han reportado se pueden dar reacciones con sustratos biológicos y oxígeno molecular por vías de reacción tipo I o II respectivamente, generando ROS. Las reacciones tipo I presentan una abstracción de un átomo de hidrógeno o una transferencia de electrones generando especies radicalarias (superóxidos, hidroxilo, etc.). Por otro lado, las reacciones tipo II presentan transferencia de energía entre el estado excitado triplete del PS y el oxígeno molecular que se encuentra en estado triplete basal generando así el oxígeno singlete (1O2). Las ROS generadas son las encargadas de desencadenar daño celular y posterior muerte del tumor por necrosis, apoptosis o autofagia. (Esquema 1).[15]



Esquema 1. a) Diagrama de Jablonski de un PS donde se representa los métodos de desactivación y las reacciones fotoquímica tipo I y II, b) Representación de la PDT y muerte tumoral. [16]

La PDT presenta diferentes mecanismos en cuanto a la actividad anti-tumoral, entre estos mecanismos se encuentran el daño a las células tumorales, daño a la vascularización e inducir a una respuesta inflamatoria e inmune.[17, 18] Enfatizando en el tipo de actividad antitumoral correspondiente al daño a las células tumorales, esto depende de la localización del PS, ya que implicaría la generación de daños irreparables en las diversas partes vitales celulares como lo son lisosoma, mitocondria, retículo endoplasmático, aparato de Golgi y membrana nuclear.[19, 20] Las propiedades fisicoquímicas y la naturaleza de los PS son determinantes para entender la localización y daño celular que es producido por las ROS. Por ejemplo, un PS catiónico como derivados de porfirinas suelen permear la membrana y localizarse en la mitocondria, este al ser irradiado genera ROS debilitando la membrana mitocondrial y como resultado provocando muerte apoptótica;[6] mientras que se considera que PS hidrofóbicos como las ftalocianinas se incorporan y localizan en su mayor parte en los compartimientos lisosomales provocando autofagia celular.[21]

1.3. Fotosensibilizadores

El primer fotosensibilizador aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en 1995 fue la hematoporfirina, la cual es una porfirina endógena.[22] Los PS utilizados en la PDT son divididos en dos grupos: porfirinas y no-porfirinas. Los PS basados en porfirinas representan la mayoría de los utilizados en la PDT y estos a su vez pueden ser clasificados como primera, segunda y tercera generación. La primera generación incluye el Photofrin® el cual es un PS aprobado por la FDA, este corresponde a un oligómero de porfirina, pero presenta problemas de fotosensibilidad cutánea prolongada, baja especificidad y baja absorción de luz dentro del rango de la ventana terapéutica (600-800 nm). Para superar estas falencias se realizaron derivatizaciones de los PS para así crear los pertenecientes a la segunda generación dentro de los que se encuentran: clorinas, feofórbidos, texafirinas y ftalocianinas. Los PS de primera y segunda generación han presentado problemas de selectividad y baja solubilidad en agua, para sobrepasar esta limitación se ha investigado posibles vehículos al cual el PS esté asociado o conjugado, con frecuencia estos vehículos son macromoléculas que se dirigen o retienen en las células cancerosas.[16, 23] Finalmente los PS de tercera generación corresponden a los PS de segunda generación que utilizan vehículos como azúcares, oligonucleótidos, péptidos, proteínas entre otros para potenciar la selectividad y acumulación del PS en el tumor. [24, 25]

Por otro lado, se han desarrollado los PS no-porfirínicos entre los cuales se incluyen los PS catiónicos como colorantes derivados de cianinas, antocianinas, fenotiazinas, entre otros.[5] En el grupo de las fenotiazinas se encuentran cromóforos catiónicos como: Azure B, Tionina, Azul de Metileno, Azul de Toluidina, etc. El azul de metileno es uno de los PS catiónicos más ampliamente estudiados;[26] mientras que otro derivado de fenotiazina como el Azul de Toluidina (TBO-Toludine Blue O) ha demostrado que puede ser

4

utilizado en la PDT debido a que genera fototocixidad y muerte celular,[27, 28] pero a su vez este fotosensibilizador no ha sido tan ampliamente explorado. En la presente investigación se escogió el TBO como el PS de interés.

En general, los PS deben cumplir con características como: 1) Disponibilidad y facilidad de obtener un compuesto con alto grado de pureza y bajos costos, 2) baja toxicidad en oscuro, 3) estabilidad y solubilidad en medio acuoso debido a que la agregación genera reducción en el rendimiento cuántico de fluorescencia, del estado triplete y generación de oxígeno singlete, disminuyendo así su fotoactividad, 4) rápida excreción del cuerpo para así reducir su toxicidad al final del tratamiento, 5) presentar coeficiente de absorción molar alto en el rango entre 600-800 nm, 6) generar oxígeno singlete, 7) alto rendimiento cuántico y largo tiempo de vida del estado triplete, 8) acumularse selectivamente en el tejido o células tumorales, 9) no debe ser un agente mutagénico o cancerígeno.[29-32] Actualmente, se encuentran clinicamente aprobados para su uso en la PDT fotosensibilizadores como: Photofrin[®], Levulan[®], Metvixia[®], Foscan[®], Talaporfin[®], Verteporfina[®], Cysview[®].[15, 33]

1.4. Oxígeno Singlete

El oxígeno molecular es una molécula diatómica paramagnética que posee propiedades espectroscópicas, procesos de transferencia de energía y reactividad química particulares con respecto a otras moléculas en estado basal.[34] El oxígeno molecular en su estado basal es designado por la terminología como O₂ (${}^{3}\Sigma_{g}^{-}$) o ${}^{3}O_{2}$; este posee dos estados excitados los cuales tienen su spin apareado con multiplicidad singlete pero difieren en su orbital molecular π -antienlazante. El primer estado excitado del oxígeno o el estado excitado de menor energía es denominado O₂ (${}^{1}\Delta_{g}$) o ${}^{1}O_{2}$, mientras que su segundo estado excitado de mayor energía es denominado O₂ (${}^{1}\Sigma_{q}^{+}$) (Figura 1). La diferencia energética de los estados ${}^{1}\Delta_{g}$ y ${}^{1}\Sigma_{g}^{+}$ es de 22.5 kcal mol⁻¹ (95 kJ mol⁻¹) y 31.5 kcal mol⁻¹ (158 kJ mol⁻¹) respectivamente, esta diferencia energética es por encima de la energía del estado basal del oxígeno ${}^{3}\Sigma_{g}^{-}$ (Figura 2).[35] El tiempo de vida para las especies del estado excitado del oxígeno ${}^{1}\Delta_{g}$ y ${}^{1}\Sigma_{g}^{+}$ en estado gaseoso son de 72 minutos y 11 segundos respectivamente. Por otro lado, la transición del segundo estado excitado singlete al estado basal ${}^{1}\Sigma_{g}^{+} \leftrightarrow {}^{3}\Sigma_{g}^{-}$ presenta un decaimiento luminiscente a 762 nm y la transición del primer estado excitado singlete al estado basal ${}^{1}\Delta_{g} \leftrightarrow {}^{3}\Sigma_{g}^{-}$ presenta un decaimiento característico a 1270 nm, este último decaimiento fue utilizado para el estudio de la formación de esta especie en la presente investigación.[36]

Figura 1. Representación de los diagramas de orbital molecular del oxígeno molecular ${}^{3}\Sigma_{g}^{-}$ y sus dos estados excitados ${}^{1}\Delta_{g}$ y ${}^{1}\Sigma_{g}^{+}$.



Figura 2. Diagrama de energía potencial del oxígeno molecular en estado basal y sus dos estados excitados degenerados.[35]

En la literatura se ha presentado diferentes fuentes físicas y químicas de oxígeno singlete dentro de las cuales se encuentran: la descarga de microondas en oxígeno gaseoso, la reacción de peróxido de hidrógeno con hipoclorito de sodio,[37] descomposición espontánea del producto de la ozonólisis del trifenil fosfito,[38] la reacción de peróxido de hidrógeno con molibdatos,[39] la termólisis de endoperóxidos policíclicos aromáticos como derivados de naftaleno, tetraceno y antraceno.[40] Finalmente, otro método conocido para la generación de oxígeno singlete es el de la Fotosensibilización el cual fue descrito anteriormente y es la metodología de interés en el presente trabajo.

Luego de su formación, el oxígeno singlete puede ser desactivado por mecanismos físicos como: el decaimiento radiativo, interacción con el solvente o sustrato, ya sea con el PS o con especies otras especies presentes. Asimismo, el oxígeno singlete también puede presentar una desactivación química al interaccionar y generar nuevos productos con el PS u otros compuestos que se encuentren en el medio.[36]

Entre las aplicaciones del oxígeno singlete en la fotoquímica y fotobiología se puede resaltar su uso para: la ciencia de los polímeros, tratamiento de contaminantes en el agua, síntesis química y en la terapia fotodinámica.[35] El oxígeno singlete, es un electrófilo fuerte y reacciona rápidamente con enlaces insaturados C-C mediante: 1) reacciones ene, 2) Cicloadición [2+2] y 3) Cicloadición [4+2], similares a la reacción de Diels-Alder siendo el oxígeno singlete el dienófilo.[41] Igualmente el oxígeno singlete puede ser agente oxidante de fenoles, sulfuros y aminas. En sistemas heterogéneos en donde está presente proteínas o enzimas, el oxígeno singlete podrá interaccionar y reaccionar con residuos de aminoácidos como lo son Cisteína, Histidina, Triptófano, Metionina y Tirosina generando estrés oxidativo.[6] Por otro lado, el oxígeno singlete en un ambiente biológico puede también reaccionar con ADN,ARN y lípidos.[42]

La presente investigación esta direccionada a la aplicación del oxígeno singlete en la PDT, la obtención de este será por la fotosensibilización. La cuantificación de las moléculas de oxígeno singlete generadas por el PS y el oxígeno presente por fotón absorbido es medido con el rendimiento cuántico de oxígeno singlete (Φ_{Δ}).

1.4.1. Rendimiento cuántico

El Esquema 2 indica una representación simplificada de los procesos de desactivación que puede seguir el fotosensibilizador en su estado excitado. Entre los procesos se encuentra la desactivación no radiativa (NR) y desactivación radiativa (F). Alternativamente, se puede dar un cruce entre sistemas pasando el PS a su estado excitado triplete y a su vez siguiendo mecanismos de desactivación tipo I y tipo II mediante transferencia electrónica o de energía.



Esquema 2. Diagrama general de desactivación del PS.

El rendimiento cuántico de un proceso especifico (Φ_i) corresponde a la medición de la eficiencia de un proceso fotofísico o fotoquímico (*i*) que ocurre por cada fotón absorbido. El Φ puede expresarse en términos molares como el número de moles de un proceso *i* en relación con la cantidad de moles de fotones absorbidos o puede expresarse en términos cinéticos (k_i) como la constante de velocidad de un proceso sobre la sumatoria de las constantes de velocidad de los procesos de desactivación del estado excitado (Ecuación 1). [43, 44]

$$\Phi_i = \frac{k_i}{\sum k_i}$$

Ecuación 1. Ecuación general del rendimiento cuántico de un proceso (*i*).

El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) es la medición de la eficiencia del proceso de emisión generada por la transición del estado singlete excitado de una molécula S₁ al estado basal S₀, definido como fotones emitidos por fotones absorbidos. La fracción de moléculas que decaen por el proceso de fluorescencia se describe en la Ecuación 2. [43, 44]

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{NR} + k_{ISC}} = k_F \tau_F$$

Ecuación 2. Ecuación general del rendimiento cuántico de fluorescencia.

La manera habitual para determinar un Φ es mediante la comparación con un estándar el cual se conozca su rendimiento cuántico. El Φ_F de los reactivos de referencia o estándar es en muchos casos independiente de la longitud de onda de excitación y para su determinación se emplea la comparación de la intensidad de fluorescencia del compuesto de interés con respecto al reactivo de referencia o estándar. La Ecuación 3 muestra una relación de la intensidad de fluorescencia tanto del PS de interés como el PS de referencia con el Φ_F . [45]

$$\Phi_F{}^S = \Phi_F{}^R \left(\frac{AUC_S}{AUC_R}\right) \left(\frac{Abs_R}{Abs_S}\right) \left(\frac{\eta_S^2}{\eta_R^2}\right)$$

Ecuación 3. Ecuación del rendimiento cuántico de fluorescencia.

Donde el rendimiento cuántico de fluorescencia de la muestra $(\Phi_F{}^S)$ es función del Φ_F del reactivo de referencia $(\Phi_F{}^R)$, el área bajo la curva del espectro de fluorescencia (AUC- Area Under the Curve) tanto de la muestra (AUCs) como del PS de referencia (AUC_R), la absorción a la longitud de onda de excitación de la muestra (Abs_s), la absorción a la longitud de onda de excitación del PS de referencia (Abs_R) y correcciones del índice de refracción de los solventes empleados de la muestra (η_s^2) y del PS de referencia (η_R^2).[46]

En el Esquema 2 se puede observar que luego de un cruce entre sistemas (ISC) el PS se encuentra en el estado excitado triplete y podría generar productos ya sea por reacciones tipo I o tipo II. Entre las reacciones tipo I se puede dar reacciones radicalarias que generen la fotodegradación de un PS.

La fotodegradación es el proceso irreversible de destrucción de un fluoróforo en su estado excitado debido a interacciones con oxígeno molecular u otras moléculas en el medio. El fluoróforo es químicamente modificado al regresar a su estado basal como una nueva molécula que no absorbe luz a una longitud de onda específica; la eficiencia de este proceso se puede determinar con el rendimiento cuántico de fotodegradación (Φ_{pd}) como se indica en la Ecuación 4. [44]

$$\Phi_{pd} = \frac{No.moléculas de PS degradado}{No.Fotones absorbidos} = \frac{-\frac{d[A]}{dt}}{I_{abs}}$$

Ecuación 4. Ecuación general del rendimiento cuántico de fotodegradación.

La Ecuación 4 describe la relación de la constante de fotodegradación de un PS (-d[A]/dt) y la intensidad de luz absorbida (I_{abs}) que es descrita como el flujo de fotones incidente en la celda en relación con la ley de Beer-Lambert (Ecuación 5).

$$I_{abs} = I_0 (1 - 10^{-Abs_0})$$

Ecuación 5. Ecuación de intensidad de luz absorbida.

Por otro lado, las reacciones tipo II implican transferencia de energía con el oxígeno molecular para así generar oxígeno singlete. El rendimiento cuántico de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) se define como la eficacia de la producción de moléculas de oxígeno singlete por cada fotón absorbido por el PS. En la Tabla 1, se amplía la información del Esquema 2 enfatizando en la generación y mecanismos de desactivación del oxígeno singlete. [36, 47]

Reacción	Ecuación de velocidad	Descripción
Procesos en el estado		
excitado singlete		
$^{1}\text{PS} \rightarrow {}^{3}\text{PS}$	$-k_{ISC}[^{1}PS]$	Cruce entre sistemas
Procesos en el estado		
excitado triplete		
$^{3}\text{PS} \rightarrow \text{PS} + hv$	$-k_{RT}[^{3}PS]$	Decaimiento radiativo
		(Fosforescencia PS)
$^{3}\text{PS} \rightarrow \text{PS}$	$-k_{T,NR}[^{3}PS]$	Decaimiento no radiativo
$^{3}\text{PS} + \text{O}_{2} \rightarrow \text{PS} + ^{1}\text{O}_{2}$	$-k_{T,\Delta}^{O_2}[O_2][{}^{3}PS]$	Transferencia de energía
$^{3}PS + O_{2} \rightarrow P$	$-k_{T,P}^{O_2}[O_2][{}^{3}PS]$	Otros procesos
Procesos del oxígeno singlete		
$^{1}\text{O}_{2} \rightarrow \text{O}_{2} + hv_{1270nm}$	$-k_{\Delta,R}[\ ^{1}O_{2}]$	Decaimiento radiativo
		(Fosforescencia ¹ O ₂)
$^{1}O_{2} \rightarrow O_{2}$	$-k_{\Delta,NR}[\ ^{1}O_{2}]$	Decaimiento no radiativo
$^1O_2 + Q \rightarrow O_2 + Q$	$-k_{\Delta,F}{}^{Q}[{}^{1}O_{2}][Q]$	Desactivación Física
$^{1}O_{2}+Q\rightarrow P$	$-k_{\Delta,P}{}^{Q}[{}^{1}O_{2}][Q]$	Otros procesos

Tabla 1. Resumen de procesos de producción y desactivación de ¹O₂.[47]

El rendimiento cuántico de la producción de ³PS (Φ_T) esta descrito como:

$$\Phi_T = \frac{k_{ISC}}{k_F + k_{NR} + k_{ISC}}$$

Ecuación 6. Ecuación general del rendimiento cuántico de generación de PS en el estado excitado triplete.

El tiempo de vida del ³PS (τ_T^0) en ausencia de oxígeno se expresa en la Ecuación 7 tomando en cuenta la información de la Tabla 1.

$$\tau_T^{\ 0} = \frac{1}{k_T^{\ 0}} = \frac{1}{k_{RT} + k_{T,NR}}$$

Ecuación 7. Ecuación del tiempo de vida del PS en el estado excitado triplete en ausencia de oxígeno.

El tiempo de vida del ³PS (τ_T) en presencia de oxígeno se expresa en la Ecuación 8:

$$\tau_T = \frac{1}{k_T} = \frac{1}{k_T^{0} + (k_{T,\Delta}^{0_2} + k_{T,P}^{0_2})[O_2]}$$

Ecuación 8. Ecuación del tiempo de vida del PS en el estado excitado triplete en presencia de oxígeno.

La proporción de moléculas del ³PS que son desactivadas por el oxígeno molecular se puede describir como:

$$P_T^{O_2} = \frac{\left(k_{T,\Delta}^{O_2} + k_{T,P}^{O_2}\right)[O_2]}{k_T^{0} + \left(k_{T,\Delta}^{O_2} + k_{T,P}^{O_2}\right)[O_2]} = 1 - \frac{\tau_T}{\tau_T^{0}}$$

Ecuación 9. Ecuación de la proporción de ³PS desactivado por oxígeno.

La fracción de moléculas del ³PS que son desactivadas por el oxígeno molecular y producen oxígeno singlete se puede describir como:

$$f_{T,\Delta}{}^{O_2} = \frac{k_{T,\Delta}^{O_2}}{k_{T,\Delta}^{O_2} + k_{T,P}^{O_2}}$$

Ecuación 10. Ecuación de la fracción de ³PS desactivado por oxígeno.

Finalmente, el rendimiento cuántico de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) se puede describir como:

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{T} \times \frac{k_{T,\Delta}^{O_{2}}[O_{2}]}{k_{T}^{0} + (k_{T,\Delta}^{O_{2}} + k_{T,P}^{O_{2}})[O_{2}]} = \Phi_{T} \times P_{T}^{O_{2}} \times f_{T,\Delta}^{O_{2}}$$

Ecuación 11. Ecuación de rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete.

La cantidad de moléculas de ¹O₂ generadas por fotón absorbido (Φ_{Δ}) es determinada por tres factores: La habilidad del PS de pasar a su estado excitado triplete mediante un cruce entre sistemas (Φ_T), la interacción del PS en estado excitado triplete (³PS) con el oxígeno molecular antes de decaer ($P_T^{O_2}$) y la eficiencia del proceso de transferencia de energía del ³PS al oxígeno molecular ($f_{T,\Delta}^{O_2}$). Estos parámetros determinaran la cinética y la intensidad de la señal de fosforescencia del oxígeno singlete cuando se realiza su medición directa experimentalmente. [36, 47]

1.5. Azul de Toluidina

El azul de toluidina (TBO) es un colorante sintético hidrofílico, el cual es un derivado catiónico de fenotiazina (Figura 3). El TBO es catalogado como un fotosensibilizador de segunda generación.[5] En la literatura ha sido reportado su uso como fotosensibilizador en la terapia fotodinámica antimicrobial (aPDT) para la inactivación de bacterias.[11, 48-50] Por otro lado, el TBO también ha sido utilizado como colorante en el diagnóstico de cáncer oral, cáncer de esófago o carcinoma de células escamosas debido a que este presenta alta retención en células o tejidos malignos.[10, 51-53]
El TBO presenta ventajas como fotosensibilizador debido a que posee bajo costo, hidrofilicidad, baja toxicidad, baja energía de excitación a 626 nm, alta afinidad a ácidos nucleicos, liposacaridos y membranas y un $\Phi_{\Delta} = 0.2$ -0.9 dependiente del pH debido a la formación de su especie protonada presentando diferencias de energía entre el TBO en su estado excitado triplete y el oxígeno singlete.[54-56]



Figura 3. Estructura química del Azul de Toluidina (TBO).

1.6. Albúmina de suero humana como vehículo de transporte de fármacos

Los fármacos o PS utilizados en el tratamiento del cáncer carecen de selectividad en su incorporación a las células tumorales alojándose también en células sanas y solo llegando bajas dosis al tejido tumoral, debido a esto, se ha desarrollado la unión de fármacos a diversos vehículos de transporte como nanopartículas, liposomas, péptidos, proteínas entre otros. La unión de fármacos a proteínas podría solucionar problemas como: solubilidad, transporte, tiempo de vida del fármaco y toxicidad. La interacción fármaco-proteína es un factor farmacológico crucial debido a que afecta la distribución y eliminación de drogas. Tras la administración en el torrente sanguíneo, la mayoría de los fármacos se asocian con diversas proteínas séricas, incluidas las lipoproteínas de alta y baja densidad (LDLs) y la albúmina.[57-60]

La permeabilidad, falta de drenaje linfático y la alteración vascular en los tumores permiten o facilitan la acumulación de macromoléculas, este es un fenómeno conocido como efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR-

Enhanced permeation and retention). Por otro lado, la albúmina presenta accesibilidad mejorada a los tumores debido a los receptores gp60 y SPARC, los cuales incrementan la incorporación de la albúmina y su tiempo de retención. El mecanismo e incremento en la incorporación de este tipo de proteínas hace de gran interés el estudio de conjugaciones fármaco-proteína.[58, 61, 62]

La albúmina de suero humana (HSA-Human Serum Albumin) es la proteína más abundante en el plasma (40 mg/mL), aproximadamente 60% de la cantidad total de proteína en el plasma; también es 10 veces más concentrada que todas las lipoproteínas.[60] La HSA juega un papel biológico importante en la regulación de la presión osmótica en la sangre y también es utilizada como un sistema de transporte de compuestos endógenos que se producen en el interior del organismo como ácidos grasos, hormonas, iones y compuestos exógenos que se producen en el exterior del organismo como fármacos.[63, 64] La HSA es una proteína monomérica formada por una cadena peptídica de 585 aminoácidos, su secuencia de aminoácidos contiene 18 tirosinas, 6 metioninas, un triptófano (Trp214), 17 puentes disulfuros y un grupo sulfhidrilo libre que corresponde al residuo de cisteína 34 (Cys34). La HSA posee tres dominios homólogos helicoidales como se ve en la Figura 4 (I, II y III). La estructura tridimensional de la HSA obtenida por difracción de rayos-X con diferentes complejos ligando-proteína soportan la hipótesis que hay dos sitios de unión principales (I y II) ubicados en los subdominios IIA y IIIA denominados Sudlow 1 y 2, respectivamente.[65]

El residuo de Cys34 es una característica única de una proteína extracelular y representa aproximadamente el 90% de la concentración del grupo sulfhidrilo libre en el plasma sanguíneo, lo que lo hace interesante sus conjugación con diversos fármacos.[66] En la literatura se reporta la reactividad química de este residuo en la formación de enlaces disulfuro o reacciones de adición de tio-Michael con compuestos como homocisteína, glutatión y fármacos. [67]



Figura 4. Estructura cristalina de la HSA PDB:1AO6. Se presentan los dominios I, II, III sus respectivos sub-dominios, sitios Sudlow 1-2 y el residuo de cisteína Cys34. [68]

La HSA está presente en la circulación del torrente sanguíneo alrededor de 19 días lo cual le provee una excelente capacidad de acumulación en tumores, lo que vuelve a la albúmina un vehículo de interés para drogas utilizadas en la quimioterapia. Un ejemplo del uso de la HSA en la quimioterapia se presenta en el Abraxane[®] que consiste en nanopartículas de Paclitaxel[®] estabilizado con la albúmina.[69, 70] Por otro lado, la HSA presenta ventajas como la capacidad de enlazarse de manera covalente o reversible con un gran número de endógenos y exógenos. Existe una serie de fármacos que se unen a la HSA de manera *in situ* ya sea física o covalentemente, por ejemplo, los distintos sitios de unión de la HSA para uniones reversibles son los utilizados por los fármacos como Levemir[®], Victoza[®] y Tresiba[®] utilizando la interacción tipo HSA-Lípidos.[71] En el caso de la PDT, la HSA ha sido empleada como vehículo para fotosensibilizadores como Clorin (Ce6) y ftalocianina de Zinc, reduciendo así problemas de agregación;[72] también se ha demostrado que

utilizando complejos HSA-PS se incrementa la selectividad y eficiencia en la PDT.[73]

Entre las ventajas del uso de la HSA como vehículo se encuentra: (a) aumento de la estabilidad del fármaco, (b) tiempo de retención prolongado en el torrente sanguíneo, (c) posible cambio en la ruta de entrada a las células para drogas hidrofílicas, (d) acumulación de fármaco selectivamente en el tumor, (e) fabricación económica y simple, así como control de calidad, al igual que otras drogas de moléculas pequeñas.[70] Como desventaja presente en la PDT, se ha reportado que al realizar el conjugado del PS con la HSA se presentan cambios en sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas como lo es la disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia u oxígeno singlete en comparación con el PS libre.[74, 75]

1.7. Conjugaciones covalentes de fármacos

El largo tiempo de circulación de la albúmina en la sangre ha sido utilizado para el aumento del tiempo de vida de diversos fármacos. Ademas, la disponibilidad del grupo tiol libre correspondiente al residuo de cisteína 34 de la HSA ofrece un sitio de unión covalente; el cual es utilizado para el diseño y asociación de fármacos.[76]

La conjugación del grupo tiol inicia a través de un ataque nucleofílico del anión tiolato, por lo tanto, una fracción suficiente de tiol desprotonado debe estar disponible para que el residuo de Cys34 sea reactivo. Se informa que el pKa para el grupo tiol de cisteína libre es aproximadamente 8.1-8.5, sin embargo, en la albúmina humana, el valor del pKa informado está en el rango de 5-8.5.[77] Además, se ha comprobado que aproximadamente el 70% de la HSA en la sangre tiene el residuo de Cys34 accesible; el 30% restante del residuo de Cys34 suele estar bloqueado debido a la formación de enlaces disulfuros

con glutatión, homocisteína, interacción con metales (Au⁺, Pt²⁺), óxido nítrico, entre otros endógenos.[78, 79] Kratz y colaboradores han reportado la aplicación de la unión covalente de fármacos derivados de maleimida con el residuo de Cys34 de la HSA para ser utilizados como pro-drogas.[76] La maleimida hace parte de las plantillas utilizadas para el diseño de fármacos para hacer conjugaciones con péptidos y proteína, esta ha sido conjugada en investigaciones anteriores con el grupo tiolato de la Cys34 de la HSA debido a su alta especificidad y reactividad. Este enfoque se ha utilizado para la unión *in situ* a la HSA con un fármaco después de la administración intravenosa de doxorrubicina activada con maleimida.[66, 80]

La FDA ha aprobado 39 fármacos unidos de manera covalente a diferentes proteínas entre esos se presentan: afatanib[81], ibrutinib[82] y osimetirnib[83] estos fueron modificados de manera covalente con la reacción de adición de Michael reaccionando con diversos grupos nucleófilos como lo son los residuos de serina, treonina y cisteína de las proteínas. De los fármacos aprobados el 20% son para el tratamiento de cáncer.[84, 85] Al realizar conjugaciones covalentes de los fármacos con las proteínas aumenta el tiempo de vida de estos, se puede administrar dosis más bajas y por lo tanto se podría minimizar efectos secundarios.[86]

En la terapia fotodinámica, los PS de primera generación presentan la formación de agregados y debido a esto se incrementó el interés de diversos investigadores en el uso de diversos vehículos. Los PS como lo son hematoporfirina, ftalocianina tetrasulfonada de aluminio y ftalocianina de zinc se han presentado estudios de estos utilizando como vehículo una proteína como lo es la albúmina de suero bovino (BSA-Bovine Serum Albumin); todo esto fue realizado con interacciones no covalentes entre Proteína-PS, pero al realizar las pruebas *in vivo* se presentó un intercambio o redistribución del PS de la BSA con LDLs. Por otro lado, en la literatura se encuentra reportada la conjugación de manera covalente para evitar un intercambio o redistribución

del PS; un ejemplo se presenta en el trabajo de Sharman y colaboradores, en el cual se realizó la conjugación de la ftalocianina de zinc con la BSA, a pesar de ver una disminución en la fluorescencia debido a la desactivación por parte de la proteína en los conjugados PS-BSA, el rendimiento cuántico del oxígeno singlete era comparable al PS libre.[60]

Entre el uso de proteínas como vehículos en la terapia fotodinámica se han reportado diversos conjugados entre Proteína-PS, Jeong[87] y colaboradores presentaron un trabajo sobre el conjugado del PS-Clorina (Ce6) con la HSA en el cual se realizaron pruebas *in vivo* demostrando un aumento de biodistribución y en la generación de oxígeno singlete, aumentando a su vez la eficacia terapéutica. Por otro lado, Abramova y colaboradores reportaron la conjugación de un derivado de BODIPY con los residuos de cisteína y lisina de la HSA presentando un incremento en la toxicidad del conjugados en los estudios *in-vitro* con la línea celular de cáncer de mama. [6, 88]

Los estudios reportados en la literatura acerca de los conjugados covalentes Proteína-PS, presentan resultados como aumento en acumulación selectiva en celulas cancerígenas y aumento en la toxicidad celular del conjugado con respecto al PS libre.[6, 88, 89] En la presente investigación se propuso la conjugación covalente de los derivados del TBO con la HSA.

1.8. Cucurbiturilos

Los Cucurbiturilos (CB[*n*]s) son una serie de compuestos macrocíclicos formados por unidades de glicourilo de diferentes tamaños (5-8,10), unidos por puentes de metileno de manera cíclica, formando cavidades hidrofóbicas.[90] Los CB[*n*]s presentan diversas aplicaciones como: catálisis, control de formación de agregados, estabilización de fármacos o sistemas de transporte de fármacos y se ha demostrado que pueden penetrar la membrana celular. Los CB[*n*]s presentan características interesantes como baja toxicidad, alta

afinidad de unión con fármacos y buena solubilidad en fluidos biológicos.[91] Los complejos de inclusión de fármacos con CB[*n*]s han presentado alto interés debido a los cambios que presenta el fármaco en bioactividad y biodistribución. Entre los CB[*n*]s uno de los que despiertan más interés es el CB[7] debido a su alta solubilidad en agua y el tamaño de su cavidad que permite la inclusión de diversos fármacos en relación 1:1.[92, 93]



Figura 5. Estructura general de los CB[*n*]s (n=5-8,10), Estructura CB[*n*]s cíclicos como CB[7] y CB[8]s.

En la literatura se han reportado diversos complejos con CB[*n*]s y los cambios que presentan con los fármacos o PS.[94] Se ha demostrado que los diversos sistemas de PS unidos a macrocíclos son una buena opción para controlar las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de los cromóforos y sus interacciones con biomoléculas.[95-97] Se han presentado reportes en los que se utilizan CB[*n*]s para encapsular cromóforos catiónicos fluorescentes lo que ha mostrado ventajas en el PS como: incremento en la fluorescencia, incremento en la fotoestabilidad, incremento en la generación de oxígeno singlete y prevención de formación de agregados.[16, 93, 97-99] En esta investigación se realizó el estudio de la formación del complejo de inclusión de los derivados de azul de toluidina con CB[7] (PS@CB[7]); en la literatura se ha reportado una disminución de las propiedades fotofisicas y fotoquímicas del PS cuando es conjugado con proteinas, asi que esto será de interés para el estudio del

efecto del CB[7] en la preservación de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los derivados de TBO.

1.9. Complejos Biosupramoleculares

Las ventajas presentadas tanto por las proteínas séricas como la HSA, y el macrociclo CB[7] mencionado anteriormente, se puede llegar a considerar el beneficio de la combinación de los CB[n]s con proteínas séricas en un ensamblaje biosupramolecular o complejo ternario. Este tipo de complejo permitiría combinar las propiedades de los CB[n]s como la protección y control de los fotosensibilizadores con las ventajas de la HSA como lo son los tiempos de circulación prolongados y el incremento de su selectividad. Los complejos biosupramoleculares entre CB[n]s con proteínas son de potencial interés para probar el transporte y liberación de fármacos.[100] Se han reportado en la literatura diversas investigaciones en las cuales se presenta un complejo biosupramolecular o complejo ternario Proteína: PS@CB[n].[91, 98-102] Todos los reportes de estos complejos biosupramoleculares son de carácter no covalente, es decir el PS interaccionando con la proteína de manera nocovalente. En nuestro grupo de investigación se realizó el estudio de complejos biosupramoleculares del TBO y dos derivados hidrofóbicos de TBO (HSA:TBO@CB[7]), determinando un incremento en la incorporación de complejo TBO:HSA a las células cancerigenas, sin embargo se presentó una competencia entre la formación del complejo TBO:HSA y TBO@CB[7].[28, 103] En esta investigación se planteo la conjugación covalente del PS a la HSA para evitar así la competencia entre ambos complejos, favoreciendo la formación del complejo biosupramolecular.

Debido a las posibles aplicaciones y beneficios de estos complejos biosupramoleculares, el presente trabajo se enfoco en el estudio de la fotoactividad de derivados del TBO conjugados de manera covalente con la HSA y formando un complejo biosupramolecular con el CB[7].

22

Capítulo II. Hipótesis de Trabajo

Los derivados del azul de toluidina que son conjugados de manera covalente a la albúmina, junto con la formación de los complejos biosupramoleculares de HSA-PS@CB[7] permitirá mejorar el transporte, incorporación y potenciar la fotoactividad de los derivados. La formación de este complejo biosupramolecular aumentará la fototoxicidad en células tumorales cultivadas *in vitro*.

Capítulo III. Objetivos

3.1. Objetivo general

Sintetizar los derivados de azul de toluidina y unirlos de manera covalente a la HSA, seguido de la preparación del complejo con CB[7] para la formación del complejo biosupramolecular HSA-PS@CB[7] y evaluar la fototoxicidad de cada derivado y complejo en células tumorales cultivadas *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

- 1. Sintetizar y caracterizar los derivados del azul de toluidina.
- 2. Unir de manera covalente los derivados del azul de toluidina a la HSA.
- **3.** Formar complejo biosupramolecular HSA-PS@CB[7] y estudiar la asociación de la formación del complejo
- 4. Caracterizar de manera fotofísica y fotoquímica los derivados de TBO, conjugados HSA-PS, complejos PS@CB[7] y complejos biosupramoleculares HSA-PS@CB[7].
- **5.** Determinar la fototoxicidad de los complejos biosupramoleculares en células tumorales cultivadas *in vitro*.

Capítulo IV. Parte Experimental

4.1. Reactivos

Los reactivos *N*-succinimidil 3-(2-piridiltio)propionato (SPDP), *N*-succinimidil 6maleimidocaproato (EMCS), *N*, *N*-diisopropiletilenamina (DIPEA), dimetilformamida (DMF), Albúmina de suero humana (HSA ≥97%), ditiotreitol (DTT), Rosa de Bengala (RB), Azul de Metileno (MB), dimetilformamida (DMF) fueron obtenidos de Sigma Aldrich. El azul de toluidina (TBO) fue obtenido de Sigma Aldrich y es purificado por cromatografía de columna en vacío utilizando como fase móvil Etanol/HCI (99:1).[104] El TBO fue caracterizado por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H en metanol deuterado (CD₃OH).

4.2. Síntesis y Caracterización de los derivados del azul de toluidina

4.2.1. Síntesis del derivado del *N*-succinimidil 3-(2-piridiltio)propionato (TBOPDP)

El éster SPDP (46.8 mg, 0.15 mmol) fue disuelto y agitado en 2 mL de DMF bajo atmósfera inerte de nitrógeno; luego el TBO (30.6 mg, 0.10 mmol) fue disuelto en 5 mL de DMF y DIPEA (34 μ L, 0.2 mmol), estos fueron adicionados a la reacción la cual fue agitada por 24 horas bajo N₂ a temperatura ambiente. El solvente es extraído a presión reducida hasta sequedad utilizando hexano para generar una mezcla azeotrópica. Los productos fueron extraídos utilizando acetato de etilo y agua. La fracción orgánica fue evaporada a presión reducida hasta sequedad. La purificación de los productos fue realizada por cromatografía de columna de silica gel, utilizando como fase móvil acetonitrilo (CH₃CN) al 100%, luego CH₃CN:H₂O (99:1) para obtener 20 mg del compuesto como un sólido violeta con un rendimiento de reacción de 43%. El compuesto fue caracterizado por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría

de masa de alta resolución (HRMS). ¹H RMN (400 MH, metanol-d₃) δ 8.50 – 7.10 (m, 9H), 3.14 (m, 2H), 3.04 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.68 (s, 3H). ¹³C RMN (100 MHz, metanol-d₃) δ 17.9, 35.7, 37.6, 40.5, 113.1, 117.0, 121.2, 122.4, 125.1, 125.9, 126.8, 127.2, 127.4, 131.3, 134.4, 137.9, 138.3, 139.2, 143.5, 150.4, 161.2, 173.1. Masa calculada: 467.1028 m/z, detectada 467.1014 m/z, espectroscopia UV-VIS: (CH₃CN) λ_{max} 550 nm, (Buffer Fosfato 10 mM pH 7.0) λ_{max} 609 nm, y emisión de fluorescencia: (CH₃CN) λ_{max} 623 nm, (Buffer Fosfato 10 mM pH 7.0) λ_{max} 651 nm.

4.2.2. Síntesis del derivado del *N*-succinimidil 6-maleimidocaproato (TBOEMC)

El éster EMCS (46.2 mg, 0.15 mmol) fue disuelto y agitado en 2 mL de DMF bajo atmósfera inerte de nitrógeno; luego TBO (30.6 mg, 0.10 mmol) disuelto en 5 mL de DMF y DIPEA (34 µL, 0.2 mmol), estos fueron adicionados a la reacción, la cual fue agitada por 24 horas bajo N₂ a 60°C. El solvente es extraído a presión reducida hasta sequedad utilizando hexano para generar una mezcla azeotrópica. Los productos fueron extraídos utilizando acetato de etilo y agua. La fracción orgánica fue evaporada a presión reducida hasta sequedad. La purificación de los productos fue realizada por cromatografía de columna de silica gel, utilizando como fase móvil acetonitrilo (CH₃CN) al 100%, luego CH₃CN:H₂O (99:1) para obtener 19 mg del compuesto como un sólido violeta con un rendimiento de reacción de 41%. El compuesto fue caracterizado por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectrometría de masa de alta resolución (HRMS). ¹H RMN (400 MHz, metanol- d_3) δ 6.80 (s, 2H), 3.50 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.29 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.62 (m, 6H). ¹³C RMN (100 MHz, metanol-d₃) δ 17.41, 25.42,27.45, 29.18, 34.68, 38.44, 41.50, 106.89, 108.43, 119.93, 122.47, 127.62, 131.45, 135.44, 136.48, 137.50, 139.52, 155.57, 158.09, 172.57, 177.36.Masa calculada, 463.1798,

detectada 463.1804, espectroscopia UV-VIS: (CH₃CN) λ_{max} 544 nm, (Buffer Fosfato 10 mM pH 7.0) λ_{max} 610 nm, y emisión de fluorescencia: (CH₃CN) λ_{max} 626 nm, (Buffer Fosfato 10 mM pH 7.0) λ_{max} 656 nm.

4.2.3. Caracterización mediante Espectrometría de masas

4.2.3.1. Espectrometria de masas de alta resolucion HRMS

Los análisis fueron realizados empleando un espectrómetro de masas Thermo Scientific Exactive Plus Orbitrap con una temperatura de nebulización constante a 250 °C. Las mediciones fueron llevadas a cabo en modo ion positivo. Las muestras fueron preparadas en acetonitrilo y fueron inyectadas de manera directa a la fuente ESI.

4.2.3.2. Espectrometria de masas de UHPLC-MS/MS

Los análisis fueron realizados mediante un sistema de Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) Ultimate 3000 RSLC acoplado a un Espectrómetro de Trampa de Iones Lineal LTQ XL (Thermo Scientific). Se utilizó como fase estacionaria una columna HP Inertsil®ODS-4 (3 µm, 2.1 X 100 mm, GL Sciences) mantenida a 25 °C y un sistema de elución isocrático de metanol 100% que contenía 0.1% de ácido fórmico a un flujo de 0.3 mL/min como fase móvil. La detección de masas fue realizada a través de ionización por electrospray (ESI-Electrospray Ionization) y el voltaje del espray fue programada a 3 kV a 350°C. La detección fue realizada en modo de escaneado completo en el rango de 100-1000 m/z en modo ion positivo. Los resultados de MS² fueron realizados utilizando He como gas de colisión para la disociación inducida por colisión (CID-Collision-Induced Dissociation) con una energía de colisión normalizada a 35 unidades y la detección de los fragmentos en modo de escaneado completo para todas las muestras.

4.3. Determinación de la formación de los complejos de inclusión de los derivados del TBO y CB[7]

La solución de trabajo del CB[7] fue titulada para determinar su concentración exacta utilizando una solución de hexafluorofosfato de cobaltaceno (Cob⁺) por medio de espectroscopia UV-Vis. La concentración de Cob⁺ fue determinada utilizando su coeficiente de absorción molar 34200 M⁻¹ cm⁻¹ a 261 nm.[105] La solución inicial de los derivados TBOPDP y TBOEMC estaban disueltas en metanol a una concentración de 1 mM y luego estas fueron llevadas a la concentración de la solución de trabajo disolviéndolas en buffer fosfato 10 mM pH 7.0.

4.3.1. Determinación de las constantes de asociación con el CB[7]

Las constantes de asociación de los compuestos TBOPDP y TBOEMC con el CB[7] fueron determinadas mediante una curva de unión. Para realizar la titulación se prepararon dos soluciones, una con el determinado derivado (TBOPDP o TBOEMC) a una concentración de 2 μ M y la otra solución tenía tanto el PS con una concentración de 2 µM como el CB[7] a una concentración de 100 µM; ambas soluciones fueron preparadas en buffer fosfato 10 mM pH 7.0. La titulación se realizó manteniendo constante la concentración del derivado y variando la concentración del CB[7] entre 0-100 µM. Para el procesamiento de datos se analizaron los cambios en la intensidad de fluorescencia (I) y se realizó el ajuste no lineal utilizando la Ecuación 12 para determinar la constante de asociación; donde IPS y IPS@CB7 corresponden a la intensidad de fluorescencia del derivado solo y en formación del complejo de inclusión con el CB[7], el termino [PS] corresponde a la concentración conocida y fijada del TBOPDP o TBOEMC al iniciar el experimento, [CB7] corresponde a las diferentes concentraciones utilizadas del macrociclo y Ka corresponde a la constante de asociación.[106]

$$I = I_{PS}[PS] + (I_{PS@CB7} - I_{PS}) \left(\frac{1}{2} \left\{ \left([PS] + [CB7] + \frac{1}{K_a} \right) - \sqrt{([PS] + [CB7] + \frac{1}{K_a})^2 - 4[CB7][PS]} \right\} \right\}$$

Ecuación 12. Ecuación utilizada para el ajuste de los datos de las isotermas de unión para la determinación de la constante de asociación.

4.3.2. Estudios computacionales de los complejos de inclusión de los derivados del TBO y CB[7]

Las estructuras de los compuestos TBOPDP y TBOEMC fueron optimizados geométricamente utilizando el programa Spartan 10 y las cargas parciales de todos los compuestos fueron corregidas usando la metodología ESP.[107] La estructura del macrociclo CB[7] fue optimizada utilizando el programa Gaussian09.[108] Los cálculos fueron realizados utilizando la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT-Density Functional Theory), usando la funcional hibrida B3LYP y el conjunto de base 6-311G^{*}.

Los estudios de acoplamiento molecular o docking fueron realizados utilizando los programas AutoDock 4.2 y AutoDock Tools.[109, 110] Los mapas de cuadrícula fueron calculados utilizando la opción autogrid4, con un espacio entre puntos de 0.375 Å. Los volúmenes de las cuadrículas utilizadas se pueden observar en el Anexo 1. Las coordenadas del centro de la caja se fijaron en el centro del CB[7], la opción autotors fue utilizada para determinar los enlaces rotables del ligando. En el acoplamiento molecular se empleó los siguientes parámetros para el algoritmo genético Lamarckiano (LGA-Lamarckian Genetic Alghorithm), una población de 150 individuos aleatorios, 100 ciclos de evaluaciones, un número máximo de 2.5x10⁶ de evaluaciones energéticas, un número máximo de generaciones de 27000, una tasa de mutación de 0.02 y una velocidad de cruce de 0.80. Las mejores poses obtenidas fueron escogidas con respecto a una menor energía de acoplamiento y un numero alto de representaciones conformacionales. El programa PyMol[™] fue empleado para visualización de estructuras, análisis de datos y generación de imágenes.[111]

4.4. Unión covalente de los derivados del azul de toluidina a la HSA

4.4.1. Liberación del residuo de Cys34 de la HSA

Se realizó la liberación del residuo de cisteína 34 de la HSA comercial ya que esta posee menos del 40% de este residuo en su forma libre o no oxidada.[112] Se disuelve HSA (100 mg, 1.5 mmol) en 20 mL de solución buffer fosfato 0.1 M pH 6.8, posteriormente se adiciona 400 µL de DTT 0.03 M y se deja reaccionar por una hora a temperatura ambiente. Al finalizar la reacción, el producto se dializó utilizando una membrana MEMBRA-CEL[®] MD de 14 KDa durante 24 horas en solución buffer fosfato 0.1 M pH 6.8. Finalmente, el producto dializado se liofilizó.[113]

4.4.2. Cuantificación del residuo de Cys34 libre de la HSA

Se determinó la cantidad de grupos tiol libres disponibles presentes en la HSA utilizando el reactivo de Ellman.[114] Se toman 2.5 mL de Buffer pirofosfato 0.1 M pH 9.0 y se adiciona 250 µL de HSA 2.5 µM y posteriormente se adiciona 250 µL del reactivo de Ellman 10 µM. Luego se continúa con la medición del cambio de absorbancia a 412 nm y tomando en cuenta el coeficiente de absorción molar del producto (ξ =14150 M⁻¹ cm⁻¹) se determinó la concentración de grupos tiol libres por proteína.[115] La reacción de cuantificación de los grupos tiol libres se muestra en la Figura 6.



Figura 6. Reacción del reactivo de Ellman para determinación de grupos tioles libres.

4.4.3. Determinación del pKa del residuo de Cys34 de la HSA

La determinación del pKa del residuo de Cys34 de la HSA se determinó con la metodología descrita en la literatura utilizando el equipo de Calorimetría de titulación isotérmica (ITC-Isothermal Titration Calorimetry).[116] Todos los experimentos de ITC fueron realizados en el microcalorímetro MicroCal PEAQ-ITC de Malvern Panalytical. Las titulaciones se realizaron con buffer triple (50 mM AMPSO, 50 mM NaP, 50 mM NaPP) con pH entre 6.5-9.5. Se realizó la titulación con una inyección única de 1 µL de yodoacetamida 300 mM en una solución de HSA 250 µM a 30°C. Los datos obtenidos(dQ/dt) fueron ajustados usando OriginPro8 y con un ajuste no lineal siguiendo la Ecuación 13, donde (dQ/dt)_{max,high} y (dQ/dt)_{max,low} son el máximo y mínimo valor absoluto de (dQ/dt) medido en cada pH, respectivamente.

$$\left(\frac{dQ}{dt}\right)_{max,obs} = \left(\frac{dQ}{dt}\right)_{max,low} + \frac{\left(\frac{dQ}{dt}\right)_{max,high} + \left(\frac{dQ}{dt}\right)_{max,low}}{1 - 10^{(pKa - pH)}}$$

Ecuación 13. Ecuación utilizada para el ajuste en base a la ecuación de Henderson-Hasselbach.

4.4.4. Unión covalente de los derivados de TBO con el residuo de Cys34 de la HSA

Los derivados del azul de toluidina TBOPDP y TBOEMC fueron unidos de manera covalente al residuo de cisteína 34 de la HSA. La reacción se llevó a cabo utilizando de manera equimolar la concentración de la HSA y el respectivo derivado en una solución de buffer fosfato 10 mM pH 7.0 durante 5 horas a 37°C. La reacción para la obtención del conjugado entre la HSA y el derivado TBOPDP se siguió por espectroscopia UV-Vis a 37°C durante 1 hora viendo los cambios en la absorbancia a 343 nm.[117, 118]

4.5. Caracterización por Espectrometria de masas de MALDI-TOF

Los conjugado con la HSA fueron analizados mediante un espectrómetro de masas Bruker Autoflex III Smartbeam MALDI-TOF (Na:YAG laser 355 nm). Las mediciones fueron llevadas a cabo en modo ion positivo. Las muestras fueron preparadas en solución acuosa. La adquisición y procesamiento de los datos fue llevada a cabo con el software FlexAnalysis.

4.6. Caracterización por Dicroismo Circular

La estructura secundaria de la HSA antes y después de la conjugación con los derivados TBOPDP y TBOEMC fue caracterizada mediante la técnica de Dicroísmo Circular (CD). Los espectros de dicroísmo circular fueron colectados entre 210 y 260 nm, mediante un espectrómetro JASCO 660 utilizando celdas con un paso óptico de 1 mm, una velocidad de 20 nm por minuto y un filtro de ancho de banda de 1 nm. Se emplearon

300 μ L de las muestras, la cuales fueron preparadas en buffer de fosfato 50 mM pH 7.0 y posteriormente fueron filtradas empleando filtros de jeringa (MCE-Esteres de celulosa) de 0.22 μ m.

4.7. Caracterización Fotofísica y Fotoquímica

Se determinaron los espectros de absorción de los derivados (TBOPDP-TBOEMC) utilizando el Espectrofotómetro Hewlett Packard 8453 y usando como solventes buffer fosfato 10 mM pH 7.0 y acetonitrilo. Por otro lado, los espectros de emisión de los derivados TBOPDP y TBOEMC fueron obtenidos utilizando el Fluorímetro PerkinElmer LS55; excitando a 609 nm, 610 nm los derivados TBOPDP y TBOEMC respectivamente utilizando como solvente buffer fosfato 10 mM pH 7.0. Los espectros de emisión de los derivados TBOPDP y TBOEMC en acetonitrilo fueron adquiridos excitando las muestras a 544 nm y 550 nm respectivamente.

4.7.1. Determinación de la fotoestabilidad de los Derivados de Azul de Toluidina

Se realizó el estudio de fotodegradación de los derivados de azul de toluidina (TBOPDP y TBOEMC), solubilizando cada derivado en solución buffer fosfato 10 mM pH 7.0. Las muestras fueron irradiadas durante 60 minutos con un proyector con espectro de luz de 350 a 850 nm como fuente de luz. La longitud de onda de irradiación fue seleccionada con un filtro a 618 nm con una intensidad de luz de 38 W/m², medida con un foto-radiómetro Delta OHM modelo HD 2302.0; las muestras fueron agitadas constantemente con un agitador magnético y equilibradas al aire. Los espectros de absorción fueron medidos cada 5 minutos.

4.7.2. Determinación del tiempo de vida de Fluorescencia

Los tiempos de vida se determinaron mediante la técnica TCSPC utilizando un fluorímetro resuelto en el tiempo LifeSpecII de Edinburgh Instruments provisto de un detector PMT Hamamatsu, doble monocromador para evitar la dispersión temporal. Las muestras en acetonitrilo fueron excitadas utilizando un diodo láser de 506 nm y las muestras en solución buffer fosfato 10 mM pH 7.0 fueron excitadas utilizando un diodo láser de 638 nm; la emisión fue colectada en el máximo hasta 5000 cuentas.[100, 119] Se ajustaron los decaimientos de fluorescencia a la Ecuación 14 la cual es una ecuación exponencial, donde τ_i corresponde a los tiempos de vida de fluorescencia de las especies i y A_i corresponde a los factores pre-exponenciales. La respuesta del instrumento (IRF) se midió utilizando una solución de Ludox (silica gel) diluida en agua. Se verificó que el ajuste sea el adecuado si los valores del χ^2 están entre 0.9 y 1.2.[120]

$$I(t) = I_0 \times \sum_{l}^{i} (A_i \times e^{\frac{-t}{\tau_i}})$$

Ecuación 14. Ajuste del decaimiento de fluorescencia.

El tiempo de vida de fluorescencia promediado por la amplitud < τ_F >, fue calculado tomando en cuenta el tiempo de vida de fluorescencia de cada especie y su contribución correspondiente a los factores pre-exponenciales.

4.7.3. Determinación de oxígeno singlete y rendimiento cuántico

La generación de oxígeno singlete de los derivados (TBOPDP y TBOEMC), los conjugados (HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC) y complejos biosupramoleculares (HSA-TBOPDP@CB[7] y HSA-TBOEMC@CB[7]) fueron determinados de manera directa midiendo los decaimientos de la fosforescencia a 1270 nm usando un sistema personalizado.[121, 122] Las muestras fueron excitadas a 532 nm utilizando un láser FTSS355-Q3 (Crystal Láser, Berlin, Germany) trabajando a 1 kHz de periodo de repetición. La detección de la fosforescencia del ¹O₂ a 1270 nm en un ángulo de 90° utilizando un detector NIR Hamamatsu (H10330A-45, operando a -908 V) acoplado con un monocromador (CM110-1/8m, Spectral Products, Digikröm). En la entrada del monocromador hay un filtro eliminador de banda (Edmund Optics, York, U.K) a 1064 nm y un filtro paso alto (FEL1150, ThorLabs, Newton, NJ) a 1150 nm para remover cualquier componente residual de la emisión del láser en la región del infrarrojo cercano (NIR- Near-Infrarred Region). El recuento de fotones se realizó con un escalador multicanal (TimeHarp 260-NANO, PicoQuant GmbH, Germany). Las señales fueron colectadas utilizando las muestras disueltas en acetonitrilo y buffer fosfato deuterado equilibrado con el aire por 500 segundos con una resolución de 256 ns.

La cinética fue ajustada a el clásico modelo de incremento y decaimiento biexponencial para el ¹O₂ (Ecuación 15),donde la señal de la fosforescencia en el tiempo (S_(t)) es función de la señal de la intensidad de la fosforescencia del ¹O₂ a tiempo cero (S₀), el tiempo de vida del ¹O₂ (τ_{Δ}), el tiempo de vida del triplete (τ_T) y Y⁰ es añadido para contar la distancia con la línea base.[123] El ajuste fue realizado con el programa GraphPad Prism 9 , utilizando τ_{Δ} , τ_T y S₀ como parámetros libres.

$$S_{(t)} = S_0 \frac{\tau_{\Delta}}{(\tau_{\Delta} - \tau_T)} \left(e^{\left(\frac{-t}{\tau_{\Delta}}\right)} - e^{\left(\frac{-t}{\tau_T}\right)} \right) + Y_0$$

Ecuación 15. Modelo bi-exponencial de la formación y decaimiento del oxígeno singlete.

Los rendimientos cuánticos relativos de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) fueron calculados utilizando la Ecuación 16 y usando como reactivo de referencia el Rosa de Bengala en acetonitrilo (Φ^R_Δ =0.54) y en buffer fosfato deuterado $(\Phi_{\Lambda}^{R}=0.76)$.[124] Los Φ_{Δ} fueron determinados a diferentes concentraciones del PS, y la intensidad de la fosforescencia del oxígeno singlete en el tiempo cero (S_0) fue graficada con respecto a la intensidad de luz absorbida a la longitud de onda de excitación de la muestra (1-10^{-Abs532nm})^S y del PS de referencia (1-10^{-Abs532nm})^R. Las gráficas resultantes fueron ajustadas a una ecuación lineal donde la pendiente es utilizada para la determinación del Φ_{Δ} .[123] Los Φ_{Δ} de los conjugados (HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC) y los complejos biosupramoleculares (HSA-TBOPDP@CB[7] V HSA-TBOEMC@CB[7]) fueron determinados evaluando los términos S₀ para las señales a 1270 nm ajustada a la misma densidad óptica. Se utilizó como referencia el azul de toluidina. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

$$\Phi_{\Delta}{}^{S} = \Phi_{\Delta}{}^{R} \frac{S_{0}{}^{S}}{S_{0}{}^{R}} \frac{(1 - 10^{-Abs\,532\,nm})^{R}}{(1 - 10^{-Abs\,532\,nm})^{S}}$$

Ecuación 16. Ecuación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete.

4.7.4. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia

El rendimiento cuántico de fluorescencia relativo (Φ_F) de los diferentes derivados, conjugados y complejos fueron determinados en acetonitrilo y buffer fosfato 10 mM pH 7.0 utilizando como referencia el azul de metileno (MB) en agua ($\Phi_F = 0.02$) y el rosa de bengala (RB) en etanol ($\Phi_F = 0.05$).[125, 126] Se empleo la Ecuación 3 donde las medidas de fluorescencia fueron realizadas utilizando las muestras y el PS de referencia con una absorción menor a 0.1 a la longitud de onda de excitación. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

4.8. Estudios *in-vitro*

Todos los estudios *in-vitro* fueron realizados empleando la línea celular de cáncer cérvico-uterino HeLa. Las células HeLa fueron cultivadas medio modificado DMEM (Dubbelco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS- Fetal Bovine Serum), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 0.25 µg//mL de antimicótico anfotericina b a 37°C, 5% CO₂ y 100% de humedad; este medio suplementado se le denominara MC10%. Las células HeLa son células adherentes que crecen en monocapas, las cuales para obtener una solución y permitir el conteo y sembrado de estas se emplea la tripsinización. El conteo celular se realiza empleando una cámara de Neubauer utilizando azul de tripan y empleando el microscopio invertido con contraste de fase Carl Zeiss Axiovert 25.

4.8.1. Ensayos de viabilidad celular

El ensayo cuantitativo colorímetro usando el bromuro de 3-(4,5-dimetil-2tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT o azul de tiazol) es utilizado para determinar la viabilidad celular. Se emplearon placas de 96 pocillos con 100 μ L de la muestra celular se le adicionan 10 μ L de MTT con una concentración de 5mg/mL disuelto en PBS; se deja incubando durante 4 horas a 37°C y se le adiciona 100 μ L de SDS al 10% en HCl 0.01M. La placa se deja durante la noche a temperatura ambiente y finalmente se homogeniza para medir la absorbancia de las muestras a 570 nm en un lector de placa Biotek synergy HT. [28, 127]

4.8.2. Determinación de citotoxicidad en oscuro

Para la determinación de la citotoxicidad de los derivados TBOPDP y TBOEMC en las células HeLa se utilizó una concentración de los derivados de 0.4-40 µM. Se colocaron 100 µL de células HeLa con una concentración de 1.5 X 10⁵ células/mL en MC10% en una placa de 96 pocillos. Las células se dejaron creciendo durante la noche. Se prepararon cada uno de los derivados a las diferentes concentraciones en medio DMEM suplementado al 3% (MC3%). Luego de tener la monocapa de células HeLa en las placas de 96 pocillos se pasó a adicionar los derivados de TBO en las diferentes concentraciones manteniendo un control de las células sin exposición de los PS. Las placas fueron dejadas en la incubadora (37 °C, 5% CO₂, 100% humedad) durante 24 horas para luego realizar el ensayo de viabilidad celular.

4.8.3. Determinación de fototoxicidad de los derivados de TBO y los diferentes sistemas

Se realizo los experimentos de fototoxicidad de los diferentes derivados TBOPDP y TBOEMC con los diferentes sistemas en placas de 96 pocillos. Los cultivos celulares fueron irradiados con el fotoreactor Luzchem LED (LED-L16; la fuente de luz del fotoreactor es un arreglo de 16 lámparas LED de 630 nm y con una intensidad de luz de 2.93 mW / cm². La temperatura en la cámara fue de 37 °C y se empleó la función de carrusel para que la irradiación fuera homogénea. Se sembraron seis placas (tres placas para irradiación y tres placas control en oscuro) de 96 pocillos con 100 µL de células HeLa con una concentración de 1.5 X 10⁵ células/mL en MC10%. Las placas fueron incubadas durante la noche para que se formara la monocapa. Los diferentes PS solos o con sus sistemas de transporte (PS, PS@CB[7], HSA-PS, HSA-PS@CB[7]) fueron preparados a las concentraciones de 3µM el PS, 3µM de los PS y 50 µM de CB[7], 3µM de los conjugados HSA-PS, 3µM de los conjugados HSA-PS y 50 µM de CB[7] en medio de cultivo sin suplementar (MC); adicionalmente se preparó los controles de los sistemas de transporte HSA (6 y 7 µM) y CB[7] (50 µM) en MC para ser probados en las células. El

MC10% presente en las placas fue removido y lavado dos veces con 100 μ L de PBS; luego fue agregado 100 μ L de los diferentes sistemas con 12 repeticiones, esto se realiza por duplicado en la placa para irradiación y la placa de control en oscuro. Se deja incubando durante 90 minutos los diferentes sistemas y luego se lava con PBS por duplicado para remover el PS que no se incorporó en las células y se reemplaza por MC sin suplementar. La irradiación de las placas se realizó durante 90 minutos y luego fue reemplazado el MC por 100 μ L de MC10% . Las placas se dejaron en la incubadora durante 24 horas para realizar el ensayo de viabilidad celular con MTT.

4.8.4. Estudios de incorporación de los derivados de TBO y los diferentes sistemas

Se utilizaron placas de seis pocillos y se adicionaron 2 mL de células HeLa suspendidas en MC10% por pocillo, sembrando 200000 células por pocillo. Las placas fueron incubadas por 24 horas hasta lograr una confluencia del 70-80%. El medio de cultivo fue removido de cada pocillo y lavado con 1 mL de medio sin suplementar y sin rojo de fenol, esto se realizó por triplicado. Se adicionaron 2mL de medio sin suplementar que contenía los diferentes sistemas: 3µM de los PS, 3µM de los PS y 50 µM de CB[7], 3µM de los conjugados HSA-PS, 3µM de los conjugados HSA-PS y 50 µM de CB[7]. Las placas fueron incubadas (37 °C, 5% CO₂, 100% humedad) durante 90 minutos y luego fueron lavadas tres veces con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). Se continuo con la adición de 1 mL de tripsina a cada pocillo y las células fueron incubadas durante 10 minutos, luego de estar ya las células en suspensión fue desactivada la tripsina adicionando 1 mL de MC10% y fueron colectadas en un falcón de 15 mL para ser centrifugadas durante 10 minutos a 1000 rpm. El sobrenadante fue desechado y el sedimento o pellet celular fue resuspendido en 2 mL de HBSS y centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm. El pellet celular se le adiciono 500 µL de SDS al 2% y se dejaron incubando a 37°C durante toda la noche. La solución fue centrifugada durante 10 minutos a 1000 rpm y al sobrenadante se le midió su respectivo espectro de fluorescencia y con la intensidad obtenida se determinó la concentración de picomoles/ 10⁶ células de PS que se incorporó con respecto a cada sistema. La concentración de PS fue determinada empleando sus respectivas curvas de calibración (Intensidad vs. Concentración PS) realizadas previamente.

Capítulo V. Resultados y Discusión

5.1. Síntesis y Caracterización de los derivados

En esta sección se abordará el objetivo 1 que corresponde a la síntesis y caracterización de los derivados del azul de toluidina TBOPDP y TBOEMC. La caracterización se realizó utilizando métodos como resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas de alta resolución (HR-MS) y espectrometría de masas acoplada a UHPLC (UHPLC-MS/MS). Finalmente, en el caso del derivado TBOPDP se realizó una prueba de la presencia de su enlace disulfuro por espectroscopia UV-Vis.

5.1.1. Síntesis y Caracterización de TBOPDP

La reacción para la formación de la amida se llevó a cabo mediante la reacción entre el éster SPDP y la amina correspondiente al azul de toluidina, se realizó en las condiciones descritas en el Esquema 3; esta reacción permitió obtener el derivado TBOPDP. La reacción se obtuvo con un rendimiento de 43%.



Esquema 3. Reacción del TBO con éster SPDP para preparar el derivado TBOPDP.

Luego del proceso de purificación del producto de interés, este fue identificado por medio de Espectrometría de masa de alta resolución. El TBOPDP (C₂₃H₂₃N₄OS₃⁺) presenta una masa exacta calculada de 467.1028 m/z la cual

fue detectada (467.1015 m/z) como se puede observar en la Figura 7. Complementando los análisis de Espectrometría de masas se realizó un estudio por medio del método de masas UHPLC-MS/MS donde se estudió la fragmentación del respectivo derivado; se pudo detectar la masa del derivado ([M]⁺= 467.18) como se muestra en el Anexo 2. Luego sometiendo el compuesto a una disociación inducida por colisión (CID) en la masa detectada, se pudo detectar dos fragmentos como se muestra en los anexos 3 y 4. El primer fragmento, ha sido reportado anteriormente en la literatura como la fragmentación del enlace disulfuro[128, 129] en el cual se generó una pérdida del 2-mercaptopiridina y dejando como fragmento resultante el derivado con una masa de 356.25 m/z como se puede ver en el Anexo 3. Finalmente, luego de la colisión también se detectó la masa del fragmento correspondiente a el anillo de fenotiazina del TBO de 270.22 m/z (Anexo 4). Este tipo de fragmento detectado ha sido reportado en la literatura como la fragmentación de amidas aromáticas, la cual es ocasionada por transferencia de un protón del grupo acilo al fragmento de amina.[130] Realizando la comparación de los tiempos de retención del TBO y el TBOPDP en el UHPLC se puede ver que estos difieren siendo de 1.22 y 1.67 minutos, respectivamente (Anexos 5 y 6).

Para la caracterización estructural del derivado TBOPDP se utilizó la técnica de resonancia magnética nuclear. Para la determinación del solvente deuterado a utilizar, primero se realizaron pruebas de solubilidad en solventes como acetonitrilo, dimetilsulfóxido, cloroformo, metanol y agua. Por otro lado, también se realizó la comparación de la resolución de las señales tanto alifáticas como aromáticas en los diferentes solventes deuterado es la mejor elección como solvente por lo cual fue empleado para realizar la caracterización por resonancia magnética nuclear. En cuanto al uso del metanol como solvente se puede ver las señales características en el espectro

de RMN a 3.31 ppm correspondiente al metanol residual y a 4.80 ppm correspondiente al agua presente en el solvente.

En la Figura 8 se puede observar la caracterización del derivado TBOPDP el cual fue analizado por ¹H RMN, la asignación de las señales aromáticas se pueden observar en un rango de desplazamiento entre 7.10-8.50 ppm; por otro lado, la señal a 3.31 ppm correspondiente al solvente (CD₃OH) y este enmascara la señal correspondiente a los 6 protones del grupo dimetilamino del TBO la cual se presenta a 3.36 ppm como se puede ver en el Anexo 7y la cual no se observa en el espectro del TBOPDP. Cabe destacar que se sabe que el grupo dimetilamino está presente en la molécula debido a que la pérdida de uno o ambos grupos metilos es fácilmente detectable en el espectro de masas y además produce un corrimiento del espectro de absorción hacia el azul.[55] En la Figura 9 se puede realizar una comparación del derivado TBOPDP con sus dos precursores TBO y SPDP para realizar la correlación de las señales que aparecen en su respectivo derivado. En el Anexo 10 se puede observar la ampliación de la comparación de la región alifática del TBOPDP con respecto a sus precursores, en donde se puede determinar la presencia de las señales correspondiente a la cadena alifática con un desplazamiento de 3.14 y 3.04 ppm, también se puede observar la aparición de la señal con un desplazamiento de 2.68 ppm la cual corresponde al grupo metilo del anillo de fenotiazina del TBO. En el Anexo 11 se puede observar la ampliación de la comparación de la región aromática del TBOPDP con respecto a sus precursores en donde se ve señales correspondientes a los protones del anillo de fenotiazina del TBO y del anillo de piridina. El espectro de RMN de ¹³C se presenta en el Anexo 12.



Figura 7. Espectro de masa de alta resolución del derivado TBOPDP en modo de ionización positivo.



Figura 8. Espectro de ¹H RMN del derivado TBOPDP en CD₃OH.



8.6 8.4 8.2 8.0 7.8 7.6 7.4 7.2 7.0 6.8 6.6 6.4 6.2 6.0 5.8 5.6 5.4 5.2 5.0 4.8 4.6 4.4 4.2 4.0 3.8 3.6 3.4 3.2 3.0 2.8 2.6 2.4 2.; ppm

Figura 9. Comparación de espectros de 1H RMN de los reactivos TBO y SPDP con el derivado TBOPDP en CD₃OH.

También se realizó una prueba espectrofotométrica para la detección del derivado TBOPDP con el uso de ditiotreitol (DTT). El DTT es empleado para realizar una reducción del enlace disulfuro y a su vez la generación del 2-mercaptopiridina, el cual puede detectarse por espectroscopia UV-Vis a 343 nm como se encuentra reportado en la literatura.[117, 118] En la Figura 10 se puede ver la aparición de la banda de absorción característica del 2-mercaptopiridina luego de la reacción con DTT.



Figura 10. Prueba de DTT para la detección del 2-mercaptopiridina. Espectro de absorción: a) TBOPDP (rojo) , b) TBOPDP con DTT (azul).

Los análisis anteriores permiten concluir que se logró la síntesis del derivado TBOPDP; los estudios de espectrometría de masas nos indica la presencia del derivado sin la pérdida de los grupos metilo en la amina del anillo de TBO como se ha reportado en la literatura[55] obteniendo la masa exacta de este y sus fragmentaciones coherentes con respecto a los aductos que puede formar este derivado. Finalmente, el ensayo espectrofotométrico permitió corroborar la presencia del enlace disulfuro en el derivado debido a la aparición de la señal característica de la liberación del 2-mercaptopiridina.

5.1.2. Síntesis y caracterización de TBOEMC

La reacción para la formación de la amida se llevó a cabo con la reacción entre el éster EMCS y la amina correspondiente al azul de toluidina, se realizó en las condiciones descritas en el Esquema 4; esta reacción permitió obtener el derivado TBOEMC. La reacción se obtuvo con un rendimiento de 41%.



Esquema 4. Reacción del TBO con éster EMCS para preparar el derivado TBOEMC.

Posterior al proceso de purificación del producto de interés, este fue identificado por medio de Espectrometría de masa de alta resolución. El TBOEMC ($C_{25}H_{27}N_4O_3S^+$) presenta una masa exacta calculada de 463.1798 m/z la cual fue detectada (463.1804 m/z) como se puede observar en la Figura 11. Complementando los análisis de Espectrometría de masas se realizó un estudio por medio del método de masas UHPLC-MS/MS donde se determinó la fragmentación del respectivo derivado; se pudo detectar la masa del derivado ([M]⁺= 463.34) como se muestra en el Anexo 13. Al igual que con el derivado TBOPDP, la disociación muestra la formación de un fragmento con la masa del precursor TBO ([M]⁺= 270.11) (Anexo 14). Realizando la comparación de los tiempos de retención del TBO y TBOEMC se puede ver que estos difieren siendo de 1.22 y 1.52 minutos, respectivamente (Anexos 5 y 15).

En la Figura 12 se puede observar la caracterización de la parte alifática del derivado TBOEMC el cual fue analizado por ¹H RMN, no se logró realizar la debida integración de las señales aromáticas debido a su baja intensidad en correlación con las señales alifáticas. Este fenómeno se le puede atribuir a la agregación del anillo de fenotiazina debido a su baja solubilidad, lo que no permite resolver bien las señales aromáticas como ha sido reportado anteriormente.[103, 131] Cabe resaltar, que hay presencia de señales aromáticas que se pueden observar en un rango de desplazamiento entre 7.50-8.11 ppm; por otro lado, al igual que el derivado anterior la señal del

solvente enmascara la señal correspondiente del grupo dimetilamino del TBO. En la Figura 13 se puede realizar una comparación del derivado TBOEMC con sus dos precursores TBO y EMCS para realizar la correlación de las señales que aparecen en su respectivo derivado, por otro lado, en el Anexo 16 se puede observar la ampliación de la comparación de la región alifática del TBOEMC con respecto a sus precursores, en donde se puede determinar la presencia de las señales correspondiente a la cadena alifática con desplazamientos de 3.50, 2.29 y 1.62 ppm, también se puede observar la aparición de la señal con un desplazamiento de 2.68 ppm la cual corresponde al grupo metilo del anillo de fenotiazina del TBO. En el Anexo 17 se puede observar la ampliación de la comparación de la región aromática del TBOEMC con respecto a sus precursores en donde se puede ver la señal característica de los protones del anillo de maleimida con un desplazamiento de 6.80 ppm. Siguiendo con el análisis de las señales presentes en la región aromática en el rango de desplazamiento entre 7.50-8.11 ppm se atribuyen a las señales provenientes de los protones aromáticos correspondientes a el anillo del TBO. El espectro de RMN de ¹³C se presenta en el Anexo 18.



Figura 11. Espectro de masa exacta del derivado TBOEMC en modo de ionización positivo.



Figura 12. Espectro de ¹H RMN del derivado TBOEMC en CD₃OH.


Figura 13. Comparación de espectros de 1H RMN de los reactivos TBO y EMCS con el derivado TBOEMC en CD₃OH.

Al igual que el derivado anterior, se puede concluir que se logró la síntesis del derivado TBOEMC, en este caso se tuvieron mayores problemas de solubilidad y agregación del derivado lo cual se le puede atribuir al largo de su cadena alifática lo que impidió la asignación e integración de las señales en la caracterización por RMN; por otro lado, los estudios de espectrometría de masas indican la presencia del derivado obteniendo su masa exacta y fragmentaciones coherentes con su estructura.

5.1.3. Caracterización Fotofísica de los derivados de azul de toluidina

La caracterización fotofísica de los derivados TBOPDP y TBOEMC aborda el objetivo 4 del presente trabajo, esta se llevó a cabo por medio de técnicas como espectroscopia de absorción molecular y fluorescencia en estado

estacionario. En las Figuras 14 y 15 se pueden ver los máximos de absorción y emisión de los derivados TBOPDP y TBOEMC con respecto a los máximos del TBO en acetonitrilo (Figura 14) y en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 (Figura 15).



Figura 14. a) Espectro de absorción normalizada del: TBO (azul, λ_{max} 626 nm), TBOPDP (magenta, λ_{max} 550 nm) y TBOEMC (verde, λ_{max} 544 nm). b) Espectro de emisión normalizada del: TBO (azul, λ_{max} 658 nm), TBOPDP (magenta, λ_{max} 623 nm) y TBOEMC (verde, λ_{max} 626 nm) en acetonitrilo.



Figura 15. a) Espectro de absorción normalizada del: TBO (azul, λ_{max} 636 nm), TBOPDP (magenta, λ_{max} 609 nm) y TBOEMC (verde, λ_{max} 610 nm). b) Espectro de emisión normalizada del: TBO (azul, λ_{max} 664 nm), TBOPDP (magenta, λ_{max} 651 nm) y TBOEMC (verde, λ_{max} 656 nm) en buffer fosfato 10 mM pH 7.0.

En el Anexo 19 se encuentra la recopilación de los máximos de absorción y emisión de los derivados TBOPDP y TBOEMC, se puede observar que hay un efecto solvatocrómico en los espectros de absorción y emisión de los derivados en solventes polares. A su vez, se reporta un corrimiento hipsocrómico de los máximos de absorción y emisión de los derivados en acetonitrilo en comparación con el precursor, esto se ve reflejado también en un cambio en el color del derivado (violeta) con respecto a su precursor (azul).

5.1.4. Fotoestabilidad de los derivados de azul de toluidina

La fotodegradación o fotoblanqueo es el proceso de destrucción irreversible de un fluoróforo perdiendo así sus propiedades de absorción a una longitud de onda característica, esto se debe a la fotodegradación de un PS que conlleva a la formación de fotoproductos o al rompimiento de su anillo lo cual genera la desactivación o destrucción de este mismo. [45, 132] Los experimentos para determinar la fotodegradación de los derivados de TBO se realizaron en solución buffer fosfato 10 mM pH 7.0 y las muestras fueron preparadas a una misma absorbancia (Abs=0.18 a 618 nm) al inicio de los compuestos en el tiempo. En nuestro grupo de investigación se reportó la fotodegradación del TBO, este proceso se debe a la auto-fotoxidación (tipo I) del PS genera una serie de fotoproductos de los cuales los principales productos son la pérdida secuencial de los grupos metilo del grupo imino del TBO.[55]

El proceso de fotodegradación del fotosensibilizador se mide como el proceso de decrecimiento de la concentración del PS con respecto al tiempo de irradiación a 618 nm. El TBO en estado excitado se puede considerar constante al ser la solución constantemente irradiada, por lo que la cinética depende de la concentración de TBO durante la fotodegradación siguiendo

una cinética de pseudo-primer orden. Las contantes de velocidad de la fotodegradación (k_{pd}) fueron determinadas y reportadas como se pueden observar en la Tabla 2 y la Figura 16. La cinética se obtuvo graficando a 650 nm, esta longitud es escogida para evitar interferentes de los fotoproductos que se están generando, los cuales absorben a una longitud de onda menor.[55] En el Anexo 20 se muestra la fotodegradación de los derivados TBOPDP y TBOEMC con respecto al TBO.



Figura 16. Ajuste a una cinética de pseudo-primer orden del TBO(Azul), TBOPDP(Violeta), TBOEMC (Magenta) en solución buffer fosfato. Irradiado a 618 nm.

El rendimiento cuántico de fotodegradación fue calculado con los datos experimentales obtenidos, calculando la razón de cambio de la concentración de PS en el tiempo como se indica en la Ecuación 4.[133] La intensidad de luz absorbida (Ecuación 5) es calculada con la información de la intensidad de luz incidente (I_0) medida previamente con el radiómetro y la absorbancia inicial del compuesto a 618 nm.

En base a las ecuaciones 4 y 5 se determinó la fotoestabilidad del TBO y sus derivados TBOPDP y TBOEMC; por medio de la obtención del rendimiento cuántico de fotodegradación o fotoblanqueo (Φ_{pd}). El Φ_{pd} fue calculado de manera exacta para el TBO utilizando su coeficiente de absorción molar (ϵ =40000 M⁻¹cm⁻¹) y su concentración exacta, los derivados fueron determinados con relación al TBO utilizando el valor coeficiente de absorción molar del TBO y así mismo su rendimiento cuántico de fotodegradación. Los datos de rendimiento cuántico se pueden apreciar en la Tabla 2.

Tabla 2. Rendimiento cuántico de fotodegradación (Φ_{pd}) y constante de velocidad de pseudo-primer orden (k_{pd}) en solución buffer del TBO y sus derivados.

Fotosensibilizador	k _{pd} / s ⁻¹	Φ_{pd}^{*}	
ТВО	(5.45 ± 0.22) x10 ⁻⁵	3.96x10 ⁻⁴	
TBOPDP	(2.64± 0.25) x10 ⁻⁵	2.01x10 ⁻⁴	
TBOEMC	(1.86± 0.06) x10 ⁻⁵	1.45x10 ⁻⁴	

*El error reportado representa una desviación estándar \leq 0.5%.

El rendimiento cuántico de fotodegradación del TBO nos indica que su descomposición es baja, lo cual es un factor importante dentro de su aplicación en la PDT. La diferencia en el Φ_{pb} de los derivados con respecto a su precursor se puede ver que es la mitad con respecto al Φ_{pb} del precursor, mientras que se presenta una diferencia leve entre el rendimiento cuántico de fotodegradación de los dos derivados, lo que indicaría que este es afectado por el cambio del grupo amino (electrodonor) a un grupo amida (electroaceptor) en el PS. En la literatura[134] se encuentra reportes que el grupo electroaceptor incrementa el potencial de ionización y a su vez aumenta la barrera energética para que se dé la oxidación del PS lo que podría explicar la disminución en el rendimiento cuántico de fotodegradación. Con estos

estudios, se puede concluir que los derivados TBOPDP y TBOEMC presentan mayor fotoestabilidad con respecto a su precursor, lo que optimiza sus propiedades como PS y los hace interesantes para su estudio y aplicación en la PDT.

5.2. Determinación de la formación de los complejos de inclusión de los derivados del TBO y el CB[7]

En esta sección se estudió la formación de complejos de inclusión entre los derivados TBOPDP y TBOEMC con el macrociclo CB[7] y su caracterización por medio de espectroscopia UV-Vis y fluorescencia en estado estacionario, abordando así los objetivos 3 y 4. Primero se realizó la formación de los complejos de inclusión entre los derivados y el CB[7], estos serán denominados TBOPDP@CB[7] y TBOEMC@CB[7]. Luego de la formación de los complejos, se realizó la caracterización de estos como se puede ver en la Figura 17 y Figura 18 donde se presentan los espectros de absorción y emisión para los derivados TBOPDP y TBOEMC en ausencia y presencia de CB[7]. Los máximos de absorción y emisión para el TBOPDP en ausencia de CB[7] son de 609 nm y 651 nm mientras que en presencia de CB[7] son de 608 nm y 646 nm, respectivamente. Por otro lado, los máximos de absorción y emisión para el TBOEMC en ausencia de CB[7] son de 610 nm y 656 nm mientras que en presencia de CB[7] son de 609 nm y 648 nm, respectivamente. Para realizar un estudio de la comparación de los derivados con respecto al TBO se utilizaron datos obtenidos previamente en nuestro grupo de investigación, donde el TBO presenta un máximo de absorción y emisión en ausencia de CB[7] de 636 nm y 664 nm mientras que en presencia de CB[7] son de 631 nm y 655 nm respectivamente.[28, 103]



Figura 17. a) Espectro de absorción normalizada de: TBOPDP (2 µM) en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 en ausencia (magenta, λ_{max} 609 nm) y presencia de CB[7] 50 µM (azul, λ_{max} 608 nm). b) Espectro de emisión de: TBOPDP (2 µM) en ausencia (magenta, λ_{max} 651 nm) y presencia de CB[7] 50 µM (azul, λ_{max} 646 nm).



Figura 18. a) Espectro de absorción normalizada de: TBOEMC (2 μ M) en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 en ausencia (magenta, λ_{max} 610 nm) y presencia de CB[7] 50 μ M (azul, λ_{max} 609 nm). b) Espectro de emisión normalizada de: TBOEMC (2 μ M) en ausencia (magenta, λ_{max} 656 nm) y presencia de CB[7] 50 μ M (azul, λ_{max} 648 nm).

Los complejos de inclusión del TBO, TBOPDP y TBOEMC con el CB[7] presentaron un corrimiento hipsocrómico en sus máximos de emisión con

respecto a los PS en ausencia del CB[7]. El desplazamiento hipsocrómico ha reportado ampliamente en la literatura y este se debe al cambio electrónico y magnético del ambiente de la cavidad del CB[7], presentando esta cavidad una polaridad similar al *n*-octanol y una baja polarizabilidad. [92, 135-138] Por otro lado, cabe resaltar que los complejos de inclusión del TBO, TBOPDP y TBOEMC con el CB[7] presentan un incremento en la intensidad de fluorescencia con respecto a los PS libres, esto se discutirá a mayor detalle en la determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia. La propiedad de la fluorescencia de un PS presenta un impacto positivo para sus aplicaciones en la PDT, ya que la fluorescencia es empleada en la PDT para el diagnóstico como en el caso de toma de muestra e biopsia dirigida tanto en estudios *in-vivo*.[100, 139, 140]

5.2.1. Determinación de la constante de asociación con el CB[7]

En esta sección se abordará el objetivo 3, se realizó un seguimiento de los cambios en la intensidad de fluorescencia de los derivados al incrementar la concentración de CB[7] y manteniendo constante la concentración de los derivados, para este estudio se empleó fluorescencia en estado estacionario . Conociendo los valores de los máximos de absorción y emisión se determinó la longitud de onda de excitación para seguir los cambios de fluorescencia de los complejos de inclusión y así poder calcular las diferentes constantes de asociación de los complejos. La determinación de las constantes de asociación (K_a) de los complejos TBOPDP@CB[7] y TBOEMC@CB[7] se calcularon construyendo las curvas de asociación (Figura 19 y Figura 20) y por medio de un ajuste numérico como se puede ver en la Ecuación 12. En el análisis se determinó que los derivados forman complejos de inclusión de estequiometria 1:1 con el CB[7], este tipo de estequiometria ya ha sido reportada previamente en la literatura tanto para el TBO como otros PS similares. [28, 92, 93, 141]

La constante de asociación del TBO con el CB[7] esta reportada en la literatura y es de (5.5 ± 0.6) × 10⁶ M⁻¹,[93] mientras que la K_a de los derivados determinada fue de (6.8 ± 2.4) × 10⁵ M⁻¹ y (7.5 ± 3.0) × 10⁴ M⁻¹ para el complejo TBOPDP@CB[7] y TBOEMC@CB[7], respectivamente.



Figura 19. Isoterma de unión del TBOPDP 2 μ M en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a CB[7] (0-30 μ M), excitando a 610 nm y recolectando los datos a 646 nm.



Figura 20. Isoterma de unión del TBOEMC 2 μ M en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a CB[7] (0-100 μ M), excitando a 610 nm y recolectando los datos a 648 nm.

Comparando las constantes de asociación, la K_a del TBO es de uno y dos órdenes de magnitud mayor con respecto a los derivados TBOPDP y TBOEMC, respectivamente. En el caso de comparar estas asociaciones con visión en su aplicación en la PDT, cabe resaltar que se encuentran reportes en la literatura del TBO con otro macrociclo cuyo tamaño de cavidad es comparable con el CB[7] y este es la beta-ciclodextrina (β -CD). Actualmente, la 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina se encuentra aprobada por la FDA y es utilizada desde la aplicación alimenticia a farmacéutica[142]; en el caso de la β -CD en la literatura se presenta una K_a de 442 ± 10% M⁻¹ con el TBO.[143] Comparando las constantes de asociación de los derivados y el TBO con el CB[7] y la magnitud de la K_a del TBO con la β -CD se puede concluir que la interacción es más fuerte y estable con el CB[7] lo que resultaría en resultados prometedores para su aplicación farmacéutica. El tipo de interacciones que se dan entre el TBO, TBOPDP y TBOEMC con el macrociclo serán discutidas en la siguiente sección con ayuda de estudios computacionales.

5.2.2. Estudios computaciones de los complejos de inclusión de los derivados del TBO y CB[7]

Los estudios computacionales de acoplamiento molecular o docking molecular fueron utilizados para predecir y analizar las interacciones teóricas que se pueden dar entre el TBO, TBOPDP y TBOEMC con el macrociclo CB[7]. En la literatura se presenta que las interacciones del CB[7] con diversos huéspedes pueden ser tipo enlace de hidrógeno, interacción ion-dipolo, dipolo-dipolo e hidrofóbicas.[92, 144] Las conformaciones resultantes del análisis de docking molecular se presentan en la Figura 21, cabe resaltar que en todas las conformaciones obtenidas el anillo de TBO se presentaba encapsulado en la cavidad del CB[7]. Las energías de interacción entre el CB[7] y el TBO, TBOPDP y TBOEMC fueron de -4.32 kcal/mol, -4.30 kcal/mol, -4.11 kcal/mol, respectivamente. La energía de interacción o energía libre (ΔE) está compuesta por parámetros termodinámicos como energía intermolecular y energía torsional. La energía intermolecular incluye interacciones de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, potencial electrostático y energía de desolvatación. Por otro lado, la energía torsional incorpora la energía libre generada por la rotación de los enlaces en el ligando. El número de enlaces rotables de los ligandos fueron determinados con la herramienta Autotors, los grados de libertad torsional del TBO, TBOPDP y TBOEMC son 1, 6 y 7 respectivamente. La energía torsional (ΔG_T) del TBO, TBOPDP y TBOEMC obtenida fue de 0.6, 1.8 y 2.1 kcal/mol. En la literatura se ha reportado una relación entre la ΔG_T y el número de enlaces rotables es directamente proporcional, por lo que al incrementar el número de enlaces rotables incrementa la ΔG_T y conduce a una subestimación de la energía de enlace para el ligando con un número mayor de enlaces rotables; lo que se vio reflejado en las energía de interacción obtenidas.[110, 145] En cuanto a las interacciones, cada uno de los complejos de inclusión mostraron una interacción tipo enlace de hidrógeno; en el caso del complejo TBO@CB[7] se

presenta un enlace de hidrógeno donde el átomo de N del grupo amino del TBO actúa como donor y el átomo de O del grupo carbonilo del CB[7] como aceptor, este enlace (N-H···O) tiene una longitud de 2.2 Å y un ángulo de 124.8°. Los derivados TBOPDP y TBOEMC presentan un enlace de hidrógeno entre el átomo de N del enlace amida actuando como donor y el átomo de O del grupo carbonilo de los portales del CB[7] como aceptor, estos enlaces (N-H···O) presentan una longitud de 2.2 Å y 2.1 Å y un ángulo de 128.3°, respectivamente.





Figura 21. Acople molecular de los complejos de inclusión: a) TBO@CB[7], b) TBOPDP@CB[7], c) TBOEMC@CB[7].

Por otro lado, en todos los complejos se presenta el anillo de fenotiazina correspondiente al TBO dentro de la cavidad del CB[7], este tipo de interacción hidrofóbica de colorantes catiónicos con el CB[7] ha sido reportada en la literatura. [28, 93, 135, 137, 146] La encapsulación del anillo de fenotiazina al interior de la cavidad posee un efecto de estabilización favoreciendo interacciones de Van der Waals y desolvatación tanto de la molécula como de la cavidad. Además, el CB[7] presenta encapsuladas moléculas de agua altamente energéticas como consecuencia de su limitación en formar enlaces de hidrógeno y débiles interacciones de dispersión en la cavidad, la liberación de

un complejo de inclusión como lo es en nuestro caso con los derivados TBOPDP y TBOEMC.[92, 144] Todas estas contribuciones energéticas, se pueden ver reflejadas en la energía de asociación entre el macrociclo y los diferentes derivados como se mencionó en la sección anterior con sus altas constantes de asociación (10⁴-10⁶ M⁻¹).

5.3. Unión covalente de los derivados del azul de toluidina a la HSA

En esta sección se abordarán los objetivos 2 y 4, que consistieron en la unión covalente de los derivados TBOPDP y TBOEMC con el residuo de Cys34 de la HSA y su caracterización utilizando técnicas como espectrometría de masas MALDI-TOF, dicroísmo circular, espectroscopia UV-Vis y fluorescencia en estado estacionario.

5.3.1. Determinación del pKa del residuo de Cys34 de la HSA

En la literatura se presenta un amplio rango del valor de pKa del residuo de Cys34 (pKa=5-8.5),[77] por lo cual se realizó el estudio y determinación del pKa correspondiente al residuo de Cys34 de la HSA. Se realizó el seguimiento de la reacción de alquilación del residuo de cisteína con el reactivo de yodoacetamida y llevando a cabo el uso de la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) con respecto a las variaciones presentadas en el pH (6.5-9.5) adaptado de un método reportado en la literatura.[116] En la Figura 22 se puede observar los datos obtenidos y ajustados a la Ecuación 13; se presenta un incremento del valor máximo del cambio de calor en el tiempo ((dQ/dt)_{max,high}) al aumentar el pH, esto indica el incremento del ion tiolato con respecto a la cantidad del grupo tiol presente correspondiente al residuo de cisteína libre.[77] Finalmente, el ajuste de los datos obtenidos a la Ecuación 13 permite la determinación del pKa (representado con la letra K en la

ecuación) del residuo de Cys34 de la HSA el cual es de 9.2 ± 0.12 . Esto quiere decir que a pH 7.0 solo un 0.6% del residuo Cys34 se encuentra desprotonado, disminuyendo su reactividad a enlaces disulfuro como en el caso del TBOPDP o a enlaces dobles como el caso del anillo de maleimida del TBOEMC. Sin embargo, se realizaron las conjugaciones de los derivados con la HSA a pH 7.0 para recrear condiciones fisiológicas del plasma.[147-149]



Figura 22. Determinación del pKa del residuo de cisteína34 de la albúmina de suero humana.

5.3.2. Unión covalente de TBOPDP y TBOEMC con el residuo de Cys34 de la HSA

La conjugación covalente de los derivados TBOPDP y TBOEMC con el residuo de Cys34 de la HSA serán denominados a lo largo del escrito como HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC, respectivamente. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 5 horas utilizando como solvente el buffer fosfato 10 mM pH 7.0; la conjugación entre la HSA y el derivado TBOPDP fue seguida por espectroscopia UV-Vis durante 1 hora a 343 nm, observando así la liberación 64 del grupo 2-mercaptopiridina (Ver Anexo 21). Al finalizar la reacción se realizó una diálisis para la separar el derivado que no se haya unido de manera covalente a la HSA. La unión covalente de los derivados al residuo de Cys34 fue cuantificado utilizando el reactivo de Ellman.[150] El porcentaje de reacción para los conjugados HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC fueron de 45% y 40%, respectivamente. Estos bajos valores del porcentaje de reacción se pueden atribuir al alto pKa que presenta el residuo de Cys34 de 9.2; ya que al pH en el cual se llevó a cabo las reacciones este residuo se encontrara protonado lo cual se vería afectado en su reactividad. Luego de la reacción y purificación, los conjugados HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC fueron caracterizados midiendo sus espectros de absorción y fluorescencia (Figura 23). La proteína no presenta absorción o emisión en el rango visible, sin embargo, los conjugados presentan la aparición de una banda de absorción a 595 nm y 600 nm para el HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC, respectivamente. Adicionalmente estos conjugados presentan también máximos de emisión en 645 nm y 646 nm para el HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC, respectivamente.



Figura 23. Espectros de absorción en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 de: a) HSA-TBOPDP (λ_{max} 595 nm) y b) HSA-TBOEMC (λ_{max} 600 nm). Los recuadros muestran una ampliación de la banda de absorción entre 500-700 nm. Espectros de emisión normalizada de: c) TBOPDP (rojo, λ_{max} 651 nm) y HSA-TBOPDP (azul, λ_{max} 645 nm), d) TBOEMC (rojo, λ_{max} 656 nm) y HSA-TBOEMC (azul, λ_{max} 646 nm).

Los conjugados HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC fueron analizados por medio de espectrometría de masas MALDI-TOF. El espectro de masa de la HSA se puede observar en la Figura 24c. La relación masa/carga de la HSA bajo nuestras condiciones experimentales fue de 66511 Da y 33255 Da para las especies monoprotonadas [M+H]⁺ y diprotonadas [M+H]⁺². Los conjugados mostraron una masa molecular mayor de 66869 y 33434 Da para el HSA-TBOPDP y 66976 y 33488 Da para el HSA-TBOEMC (Figura 24). La diferencia

de masas obtenida entre el HSA antes y después de la conjugación fueron de 358 Da y 465 Da, las cuales corresponden a las masas de los compuestos TBOPDP (luego de perder el grupo 2-mercaptopiridina) y TBOEMC, respectivamente. Finalmente, se realizó el estudio de dicroísmo circular para determinar si se presenta algún cambio en la estructura secundaria de la HSA luego de la conjugación, como se puede ver en el Anexo 22 la conjugación de la HSA con el TBOPDP y el TBOEMC no afecta su estructura secundaria.



Figura 24. Espectros MALDI-TOF de: a) HSA-TBOEMC., b) HSA-TBOPDP, c) HSA en modo de ionización positivo.

5.4. Complejos Biosupramoleculares

Los complejos biosupramoleculares HSA-TBOPDP@CB[7] y HSA-TBOEMC@CB[7] fueron formados utilizando un exceso de 50 µM de CB[7]. La caracterización fotofísica de estos complejos fue realizada midiendo sus espectros de absorción y emisión como se puede ver en la Figura 25. La caracterización espectroscópica de los complejos biosupramoleculares mostraron sus máximos de absorción y emisión similares a los conjugados HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC. Los complejos biosupramoleculares HSA-TBOPDP@CB[7] y HSA-TBOEMC@CB[7] presentan un máximo de absorción de 595 nm y 600 nm, respectivamente. Adicionalmente estos complejos presentan máximos de emisión en 643 nm y 645 nm para el HSA-TBOPDP@CB[7] y HSA-TBOEMC@CB[7], respectivamente.



Figura 25. Espectros de absorción en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 de: a) HSA-TBOPDP@CB[7] (λ_{max} 595 nm) y b) HSA-TBOEMC@CB[7] (λ_{max} 600 nm). Los recuadros muestran una ampliación de la banda de absorción entre 500-700 nm. Espectros de emisión normalizada de: c) TBOPDP (rojo, λ_{max} 651 nm) y HSA-TBOPDP@CB[7] (azul, λ_{max} 643 nm), d) TBOEMC (rojo, λ_{max} 656 nm) y HSA-TBOEMC@CB[7] (azul, λ_{max} 645 nm).

5.5. Estudio del tiempo de vida de fluorescencia

Los tiempos de vida de fluorescencia del TBO y los derivados TBOPDP y TBOEMC fueron determinados en acetonitrilo y solución buffer fosfato 10 mM pH 7.0 como se muestra en la Tabla 3. Los mismos experimentos fueron adquiridos en atmósfera inerte de nitrógeno sin presentar diferencia con los valores obtenidos en presencia de oxígeno y los resultados se pueden ver en el Anexo 23. Los porcentajes reportados en las tablas corresponden a las contribuciones de los tiempos de vida de fluorescencia, estos son calculados en función de la intensidad del factor pre-exponencial del PS correspondiente. En la Tabla 3 y Anexo 23 se puede apreciar que no hay diferencia significativa en los tiempos de vida de fluorescencia de ninguno de los PS en ausencia o presencia de oxígeno, lo que indicaría que el estado excitado singlete de los PS no es desactivado significativamente por el oxígeno. La relación de los tiempos de vida de fluorescencia del TBO con respecto a sus derivados TBOPDP y TBOEMC es menor en acetonitrilo y en solución buffer son similares. Los derivados en acetonitrilo presentan un primer tiempo de vida de fluorescencia mayor al TBO con un alto porcentaje de contribución, pero a su vez se presenta un segundo tiempo de vida más largo con porcentajes de contribución de 6.7% y 7.6% para el TBOPDP y TBOEMC respectivamente. Los complejos de inclusión TBOPDP@CB[7] y TBOEMC@CB[7] presentan un primer tiempo de vida similar a los derivados en solución buffer fosfato, al igual que el TBO se le podría atribuir el primer tiempo de vida de fluorescencia a una transferencia de carga interna en el estado excitado de las moléculas como se ha reportado en la literatura;[151] sin embargo, los complejos presentan un segundo tiempo de vida de fluorescencia de 0.76 ns y 0.73 ns con una contribución del 11% y 16%, respectivamente. Por otro lado, los conjugados HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC presentaron un primer tiempo de vida de fluorescencia similar al de los derivados, pero a su vez tienen un segundo tiempo de vida más largo con una contribución del 21% y 20%.

Finalmente, los complejos biosupramoleculares HSA-TBOPDP@CB[7] y HSA-TBOEMC@CB[7] al igual que los conjugados y complejos de inclusión presentaron dos tiempos de vida, sin embargo, en el caso de estos complejos biosupramoleculares se presentó también un tiempo de vida corto de 54 ps v 68 ps, estos no fueron considerados dentro de los tiempos de vida de fluorescencia ya que podrían ser efecto de dispersión de luz conociendo que la longitud de onda de excitación es cercana a la longitud de onda de emisión. Estos dos tiempos de vida fluorescencia que presentan estos complejos de inclusión, conjugados y complejos biosupramoleculares se podría atribuir a dos estados excitados que pueden presentar el TBO y sus derivados, estos estados corresponden a un estado localmente excitado y una transferencia de carga interna en el estado excitado; todo esto se puede ver reflejado en el comportamiento solvatocrómico de los PS en solventes de diferente polaridad.[28] Al comparar los tiempos de vida de fluorescencia promedios < τ_F >, el τ_F de los complejos de inclusión, conjugados y complejos biosupramoleculares son mayores con respecto a los derivados en solución buffer fosfato. Este incremento en el $\tau_{\rm F}$ al igual que se ha reportado en la literatura[93, 144] se puede atribuir a la restricción de movilidad tanto en la cavidad del CB[7] como en el bolsillo donde se encuentra el residuo de Cys34, disminuyendo así su desactivación no radiativa; por otro lado, al estar los derivados encapsulados en una cavidad sea del macrociclo o proteína disminuye la interacción y a su vez la transferencia de energía con el solvente.

Fotosensibilizador	τ ₁ (ns) / A ₁	τ ₂ (ns) / A ₂	$< \tau_{\rm F} >$	χ2
		Acetonitrilo		
ТВО	0.48	0.69	0.60	1.097
	(40%)	(60%)		
TBOPDP	0.56	3.56	0.76	1.010
	(93.3%)	(6.7%)		
TBOEMC	0.94	1.74	0.99	1.202
	(92.2%)	(7.6%)		
		Buffor		
TBO	0.26	Builei	0.26	1 211
186	(100%)		0.20	1.211
TROPDP	0.30		0.30	1 1 3 2
	(100%)		0.00	1.102
TBOFMC	0.29		0 29	1 068
	(100%)		0.20	1.000
TBOPDP@CB7	0.42	0.76	0.46	1.159
	(89%)	(11%)		
TBOEMC@CB7	0.30	0.73	0.37	0.945
	(84%)	(16%)		
HSA-TBOPDP	0.35	` 1.25 [´]	0.54	1.157
	(79%)	(21%)		
HSA-TBOEMC	0.32	1.21	0.50	1.182
	(80%)	(20%)		
HSA-TBOPDP@CB[7]	0.36	1.23	0.46	1.042
	(88%)	(12%)		
HSA-TBOEMC@CB[7]	0.38	1.29	0.52	1.006
	(85%)	(15%)		

Tabla 3. Tiempos de vida de fluorescencia para el TBO, TBOPDP y TBOEMC.

5.6. Determinación de oxígeno singlete

Se realizó la comparación de la capacidad de generar oxígeno singlete de los PS (TBO, TBOPDP y TBOEMC), complejos de inclusión (TBO@CB[7], TBOPDP@CB[7] y TBOEMC@CB[7]), conjugados (HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC), complejos biosupramoleculares (HSA-TBOPDP@CB[7] y HSA-TBOEMC@CB[7]). El rendimiento cuántico de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) de cada PS y sistema se realizó mediante la determinación directa. La determinación

directa de oxígeno singlete consiste en la medición de la fosforescencia del ${}^{1}O_{2}$ a 1270 nm la cual corresponde a la transición de ${}^{1}\Delta_{g} \leftrightarrow {}^{3}\Sigma_{g}^{-}$. Las muestras fueron excitadas a 532 nm y se midió la fosforescencia del ${}^{1}O_{2}$ generado a 1270 nm. El PS de referencia utilizado para el TBO, TBOPDP, TBOEMC, tanto en acetonitrilo como buffer fosfato 10 mM pH 7.0 fue el rosa de bengala (RB-Rose Bengal). En el caso de los conjugados y complejos biosupramoleculares el PS de referencia fue el TBO.

Los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) y tiempo de vida de oxígeno singlete (τ_{Δ}) fueron reportados en la Tabla 4. En el caso de las mediciones en buffer fosfato para el TBOPDP, TBOEMC y TBO presentaron Φ_{Δ} un de 0.12 , 0.17 y 0.14, respectivamente. Además, el τ_{Δ} del ¹O₂ en presencia de los PS están en un rango de 59-63 µs, los cuales son cercanos al valor reportado en la literatura del ¹O₂ en dióxido de deuterio (D₂O).[152]

Por otro lado, las mediciones en acetonitrilo presentaron un Φ_{Δ} de 0.56, 0.58 y 0.32 para el TBOPDP, TBOEMC y TBO, respectivamente. En acetonitrilo si se presenta una diferencia significativa entre los Φ_{Δ} de los derivados con respecto a su precursor; comparando con los reportes de la literatura acerca de unos derivados hidrofóbicos con cadenas alifática de 6 y 14 carbonos del TBO, los derivados TBOPDP y TBOEMC presentaron un incremento en el Φ_{Δ} mientras que los derivados hidrofóbicos del TBO presentaron una disminución del Φ_{Δ} .[151] Esta disparidad entre los derivados (TBOPDP y TBOEMC) y los reportados en la literatura a pesar de todos ser amidas pudieran estar relacionadas con la diferencia de polaridad entre los derivados TBOPDP y TBOEMC con respecto a los derivados de los ácidos grasos al ser estos primeros más polares y tener menor agregación. Ahora bien, a pesar de presentar un incremento en el Φ_{Δ} se presentó una disminución en el tiempo de vida del oxígeno singlete (τ_{Δ}) en presencia de cada derivado.

Tabla 4. Determinación del tiempo de vida del oxígeno singlete y rendimiento cuántico de oxígeno singlete para los derivados, conjugados, complejos y complejos biosupramoleculares en acetonitrilo y en buffer fosfato 10 mM pH 7.0. Equilibrado a la atmósfera.

Acetonitrilo			
	Φ_{Δ}	$ au_{\Delta}$ (µs)	$1/k_{ m A}$ (µs)
ТВО	0.32 ± 0.01 ^a	80 ± 1	1.4 ± 0.5
TBOPDP	0.56 ± 0.01 ^a	64 ± 4	1.6 ± 0.4
TBOEMC	0.58 ± 0.01 ^a	63 ± 5	1.2 ± 0.2
Buffer Fosfato (Deuterado)			
ТВО	0.14 ± 0.01 ^a (0.18)	63 ± 1	1.2 (2.2)
TBOPDP	0.12 ± 0.01 ^a	59 ± 2	2.1
TBOEMC	0.17 ± 0.01 ^a	61 ± 3	1.9
TBO@CB7	0.17 ± 0.01 ^a (0.27)	72 ± 1	7.2 (10.5)
TBOPDP@CB7	0.21 ± 0.01 ^a	65 ± 1	1.6
TBOEMC@CB7	0.19 ± 0.01 ^a	65 ± 4	4.0
HSA-TBOPDP	0.020 ± 0.003 ^b	27 ± 8	3.8
HSA-TBOEMC	0.022 ± 0.003 ^b	23 ± 7	8.1
HSA-TBOPDP@CB7	0.021 ± 0.003 ^b	27 ± 8	2.4
HSA-TBOEMC@CB7	0.026 ± 0.006 ^b	32 ± 2	3.0

^a El reactivo de referencia fue el rosa de bengala con $\Phi_{\Delta} = 0.54$ en acetonitrilo y $\Phi_{\Delta} = 0.76$ en buffer fosfato.[124] ^b El reactivo de referencia fue el TBO en buffer fosfato 10 mM pH 7.0. En los paréntesis se presentan los valores reportados en la literatura. [93]

El oxígeno singlete en presencia de los derivados TBOPDP y TBOEMC tienen un tiempo de vida de 64 µs y 63 µs en acetonitrilo respectivamente, estos τ_{Δ} son menores al reportado en la literatura (τ_{Δ} =77 ns) lo que indicaría se está presentando una auto-desactivación del ¹O₂ generado con los derivados.[36] El ¹O₂ es un agente electrófilo fuerte y oxida especies las cuales posean grupos sulfuros, grupos amino y otros grupos electrodonores, los cuales están presentes en ambos derivados. En el caso del TBOPDP presenta un enlace disulfuro. el cual se ha reportado reacciones de este con oxígeno singlete para la formación de tiosulfinato.[153]

Por otro lado, al comparar los derivados con los complejos de inclusión (TBOPDP@CB[7] y TBOEMC@CB[7]) se presenta un incremento del Φ_{Λ} debido a que al formarse el complejo de inclusión el PS queda restringido y esto a su vez disminuye los procesos de relajación o desactivación no radiativo o desactivación por interacción con el solvente potenciando así sus propiedades fotofísicas. [16, 92] En el caso de los conjugados HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC se presenta una notable disminución del Φ_{Δ} y el τ_{Δ} , esto se encuentra relacionado a la accesibilidad del oxígeno molecular al bolsillo de la HSA y el τ_{Δ} se ve afectado ya que en el bolsillo donde se encuentra el residuo de CYS34 posee residuos reactivos con el ¹O₂ como lo son los residuos de Histidina-39 y Tirosina-84. [74, 154-156] Finalmente, los complejos biosupramoleculares HSA-TBOPDP@CB[7] HSA-TBOEMC@CB[7] У presentaron también un bajo Φ_{Δ} de 0.021 y 0.026 respectivamente, pero al compararlos con los conjugados el complejo HSA-TBOEMC@CB[7] presentó un incremento de su Φ_{Δ} con respecto al conjugado HSA-TBOEMC (Φ_{Δ} =0.022). Este incremento presentado en el complejo HSA-TBOEMC@CB[7] y que no se presente en el complejo HSA-TBOPDP@CB[7] se puede relacionar con el tamaño de la cadena alifática de los derivados. El derivado TBOEMC posee una cadena alifática de 6 carbonos y con un anillo de maleimida al final de la cadena, su unión al residuo de CYS34 es mediante una reacción de tio-Michael lo que no implica pérdida de grupos funcionales y conlleva a que este derivado se encuentre más expuesto en el bolsillo de la proteína facilitando la formación del complejo ternario con el CB[7]; en el caso contrario el derivado TBOPDP posee una cadena alifática de 3 carbonos, un enlace disulfuro y un anillo de piridina y al darse la unión al residuo de CYS34 mediante un intercambio tiol-disulfuro se presenta una pérdida del grupo 2-mercaptopiridina lo que conlleva a que este derivado se encuentre más incorporado en el bolsillo de la HSA y dificulte la interacción del TBOPDP con el CB[7].

Los valores de 1/k_Δ presentados en la Tabla 4 describen el tiempo de vida del estado excitado triplete en presencia de oxígeno, como ha sido reportado previamente para el TBO.[93] En resumen, los derivados presentan un Φ_{Δ} similar o mayor a su precursor TBO, los complejos de inclusión presentan un incremento en la generación de oxígeno singlete. Por otro lado, los conjugados y complejos biosupramoleculares presentan una disminución de la generación de ¹O₂, pero su impacto en su aplicación para la PDT será evaluado en la sección de estudios *in-vitro* ya que se determinará la importancia de la incorporación de la HSA como vehículo de transporte con respecto a su efecto fototóxico.

5.7. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia

El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f) es la relación entre el número de fotones emitidos con respecto al número de fotones absorbidos.[157] Se realizó la determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia relativo (Φ_f) del precursor TBO, los derivados, complejos de inclusión y conjugados en acetonitrilo y buffer fosfato 10 mM pH 7.0. El PS de referencia utilizado para el TBOPDP y TBOEMC en acetonitrilo fue el rosa de bengala y para el TBO fue el azul de metileno (MB-Methylene Blue). En el caso de los derivados, complejos de inclusión en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 fue el MB. Los conjugados y complejos biosupramoleculares fueron determinados utilizando el TBO como PS de referencia. El Φ_{f} es menor a la unidad debido al desplazamiento de Stokes. Factores como la polaridad del solvente, la capacidad de formar enlaces de hidrógeno, transferencia de carga interna en el estado excitado, etc, pueden afectar el espectro de emisión y el rendimiento cuántico de fluorescencia;[45] el efecto del solvente se vio reflejado en los datos obtenidos en la Tabla 5 comparando el rendimiento cuántico de fluorescencia en un solvente polar aprótico y un solvente polar prótico como lo son acetonitrilo y solución buffer fosfato.

En la Tabla 5 el $\Phi_{\rm f}$ de los derivados en acetonitrilo disminuye con respecto al TBO lo que es consecuente con su incremento en el Φ_{Δ} reportado en la Tabla 4. En buffer fosfato el $\Phi_{\rm f}$ de los derivados es similar al del TBO, pero en comparación con sus respectivos complejos de inclusión se presenta un incremento en el $\Phi_{\rm f}$ de 0.015 para el TBO@CB[7] y 0.017 para los complejos TBOPDP@CB[7] y TBOEMC@CB[7]; estos efectos en las propiedades fotofísicas como la emisión en los complejos de inclusión ha sido reportado en la literatura.[136] Los conjugados HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC presentaron un $\Phi_{\rm f}$ de 0.008 y 0.011 los cuales presenta una ligera disminución en relación a los derivados. A pesar de la disminución en el rendimiento cuántico de fluorescencia, los conjugados poseen un tiempo de vida de fluorescencia promedio mayor que los derivados y los complejos de inclusión (Tabla 3).

Acetoniti	rilo		
	Φ_f		
ТВО	0.081 ± 0.007^{b}		
TBOPDP	0.031 ± 0.002^{a}		
TBOEMC	0.036 ± 0.002^{a}		
Buffer Fosfato (p	H 7 10 mM)		
ТВО	0.009 ± 0.001^{b}		
TBOPDP	0.014 ± 0.001^{b}		
ТВОЕМС	0.013 ± 0.002^{b}		
TBO@CB7 0.015 ± 0.002 ^b			
TBOPDP@CB7	0.017 ± 0.002^{b}		
TBOEMC@CB7	0.017 ± 0.004^{b}		
HSATBOPDP	$0.008 \pm 0.002^{\circ}$		
HSATBOEMC	0.011 ± 0.001°		
HSATBOPDP@CB[7]	$0.008 \pm 0.001^{\circ}$		
HSATBOEMC@CB[7]	0.012 ± 0.001°		
^a El reactivo de referencia fue	el rosa de bengala con		

Tabla 5. Rendimiento cuántico de fluorescencia relativo para los derivados, conjugados, complejos en acetonitrilo y en buffer fosfato 10 mM pH 7.0. Equilibrado a la atmósfera.

^a EI reactivo de referencia fue el rosa de bengala con $\Phi_{\rm f} = 0.05$ en etanol.[126] ^b El reactivo de referencia fue el azul de metileno con $\Phi_{\rm f} = 0.02$ en agua.[125] ^c El reactivo de referencia fue el TBO.

5.7. Estudios in-vitro

En esta sección se describen los estudios *in-vitro* utilizando la línea celular HeLa, evaluando cada derivado y diferente sistema de transporte abordando el objetivo 5 del presente trabajo.

5.7.1. Determinación de citotoxicidad en oscuro

Se iniciaron los experimentos *in-vitro* determinando la dosis en la cual los fotosensibilizadores no presentaran una alta toxicidad en oscuro, lo cual es una de los requisitos para poder ser empleados en la PDT.[158] La línea celular de cáncer cérvico-uterino HeLa fue empleada para realizar todos los experimentos *in-vitro*. Este estudio se realizó incubando durante 24 horas diferentes dosis de los PS (TBO, TBOPDP y TBOEMC), los resultados de viabilidad celular se muestran en la Tabla 6. En base a los resultados obtenidos, se determinó probar concentraciones dentro del rango de 0.4-4 μ M para los estudios de fototoxicidad.

Tabla 6. Resultados de citotoxicidad en oscuro a 24 horas de incubación a distintas concentraciones de fotosensibilizador en células HeLa.

Concentración	Viabilidad	Viabilidad	Viabilidad
de PS	Celular	Celular	Celular
(µM)	(TBO)	(TBOPDP)	(TBOEMC)
0.4	98.59 %	99.10 %	112.42 %
4	68.37%	55.10%	51.06%
40	2.34%	0.00%	1.41%

5.7.2. Determinación de fototoxicidad de los derivados de TBO y los diferentes sistemas

Inicialmente se determinó que la dosis óptima para probar los derivados y diferentes sistemas se encontraban en el rango de 0.4-4 µM basándonos en su baja toxicidad en oscuro, luego se realizó estudios exploratorios del efecto del tiempo incubación en la fototoxicidad de los derivados TBOPDP y TBOEMC. En la Figura 26 se puede observar que no se presenta una diferencia significativa en el efecto fototóxico de los derivados al cambiar el

tiempo de incubación entre 1.5 a 6 horas. Por otro lado, al incubar durante 24 horas los derivados, se presenta mayor fototoxicidad del 50.53% \pm 5.04% y 52.76% ± 3.48% para el TBOPDP y TBOEMC, respectivamente. Sin embargo, al comparar la citotoxicidad en oscuro de los derivados, se puede observar que presentan una toxicidad de 72.38% ± 2.71% y 75.59% ± 10.53% para el TBOPDP y TBOEMC, respectivamente. Al comparar la fototoxicidad se puede observar que la viabilidad celular luego de la irradiación es similar entre los derivados. Los experimentos de tiempo de incubación se probaron a distintas concentraciones y todos los resultados obtenidos siguieron el mismo comportamiento con respecto al tiempo de incubación. Realizando una comparación de los tiempos de incubación, se puede concluir que la fototoxicidad de los derivados es similar desde un tiempo de incubación de 1.5 horas hasta un tiempo de 24 horas, mostrando en promedio una fototoxicidad de 22% y 20% para los derivados TBOPDP y TBOEMC respectivamente. En base a estos resultados, se escogió el tiempo de incubación de 1.5 h (90 minutos) para los próximos experimentos.



Figura 26. Estudios del tiempo de incubación de los derivados: a) TBOPDP y b) TBOEMC a una concentración de 2 µM e incubados durante 1.5, 3, 6 y 24 horas. Las barras oscuras corresponden a los controles de cada sistema en oscuro y las barras violetas a las muestras irradiadas.

Luego de haber determinado el tiempo de incubación de 90 minutos, se continuo con la comparación del efecto fototóxico tanto de los derivados TBOPDP y TBOEMC como de los conjugados HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC para ajustar y determinar la concentración a utilizar para la comparación de todos los sistemas. Como se puede observar en la Figura 27, al comparar la viabilidad celular luego de ser sometidas a los derivados solos y sus conjugados a las concentraciones de 2 y 3 µM, se puede observar un incremento en la diferencia significativa de su efecto fototóxico. Los resultados de fototoxicidad obtenidos indican que el derivado TBOPDP a una concentración de 2 µM luego de la irradiación, presenta una viabilidad celular de 85.85% ± 9.32% y una diferencia significativa con respecto a su control en oscuro (**, $p \le 0.01$). Por otro lado, al utilizar una concentración de 3 μ M del TBOPDP se obtuvo una viabilidad celular de 80.31% ± 6.11% y una mayor diferencia significativa con respecto a su control en oscuro (***, $p \le 0.001$). El derivado TBOEMC presenta fototoxicidad a 2 y 3 µM con una diferencia estadísticamente significativa (***, $p \le 0.001$) con respecto a su control en oscuro. En el caso de los conjugados, el conjugado HSA-TBOPDP cuando se estudió a una concentración de 2 µM no presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto a su control; mientras que si se incrementa la concentración a 3 µM este presenta una diferencia estadísticamente significativa (*, $p \le 0.05$). Sin embargo, el conjugado HSATBOEMC no presenta un efecto fototóxico significativo. Finalmente, todos los resultados obtenidos nos conllevan a concluir que el efecto fototóxico depende directamente de la concentración del fotosensibilizador a utilizar, así como se ha reportado en trabajos previos de nuestro grupo de investigación.[103] Por otro lado, se logró determinar que 3 µM es la concentración optima de los derivados y sus conjugados para los experimentos de fototoxicidad e incorporación, utilizando un tiempo de incorporación de 90 minutos.



Figura 27. Estudios de la citotoxicidad de los derivados solos y conjugados a la HSA a concentraciones de: a) $2 \mu M y b$) $3 \mu M$. Cada sistema fue incorporado e irradiado durante 90 minutos. Las barras oscuras corresponden a los controles de cada sistema en oscuro y las barras violetas a las muestras irradiadas.

El siguiente estudio que se realizó fue la comparación de la fototoxicidad de los derivados y de cada sistema. Inicialmente se tenía interés en comparar el efecto fototóxico en células HeLa de los diferentes vehículos empleados, como lo son los complejos de inclusión con el CB[7], los conjugados empleando la HSA y los complejos biosupramoleculares empleando tanto la HSA como el CB[7]. En estos experimentos se emplearon concentraciones de 3 µM de los derivados TBOPDP y TBOEMC, en presencia de 50 µM del CB[7], el equivalente a 3 µM del PS en los conjugados HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC y finalmente en presencia del complejo biosupramolecular con 50 µM del CB[7] y 6-7 µM de HSA. Todos los experimentos fueron realizados incorporando cada sistema durante 90 minutos, luego se siguió con la irradiación de las celulas por 90 minutos para finalmente realizar su respectivo ensayo de viabilidad celular (MTT). En la Figura 28 se puede observar los resultados obtenidos de fototoxicidad del derivado TBOPDP y cada uno de los diferentes sistemas de transporte. Se puede observar que en las condiciones utilizadas no presenta toxicidad en oscuro, además, al comparar el efecto fototóxico de cada sistema se puede determinar que no presenta diferencia significativa entre ellos, es decir la fototoxicidad de todos los sistemas es similar. Por otro lado, al comparar cada sistema con su control en oscuro, se puede observar que todos los sistemas presentan diferencias estadísticamente significativas (****, p≤ 0.0001). Los resultados de viabilidad celular de cada sistema fueron de 70.79% ± 5.74%, 72.03% ± 6.52%, 74.84% ± 6.39% y 75.66% ± 7.74% para el TBOPDP, TBOPDP@CB[7], HSA-TBOPDP y HSA-TBOPDP@CB[7] respectivamente.



Figura 28. Estudios de fototoxicidad del TBOPDP solo y con diferentes sistemas de transporte como HSA y CB[7]. Cada sistema fue incorporado e irradiado durante 90 minutos. Las barras oscuras corresponden a los controles de cada sistema en oscuro y las barras violetas a las muestras irradiadas. El TBOPDP 3 μ M solo, en presencia de CB[7] 50 μ M (TBOPDP@CB[7]), conjugado con la HSA donde la HSA tenía una concentración de 6 μ M (HSA-TBOPDP) y el complejo biosupramolecular en presencia de HSA 6 μ M y CB[7] 50 μ M (HSA-TBOPDP@CB[7]).

En la Figura 29 se puede observar los resultados obtenidos de fototoxicidad del derivado TBOEMC y cada uno de los diferentes sistemas de transporte. Se puede observar que en las condiciones utilizadas al igual que el derivado TBOPDP, no presenta toxicidad en oscuro y al comparar cada sistema se puede determinar que no se presenta diferencia significativa en el efecto fototóxico. Al comparar cada sistema con su control en oscuro, se puede observar que todos los sistemas presentan diferencias estadísticamente significativas (****, $p \le 0.0001$). Los resultados de viabilidad celular de cada sistema fueron de 69.36% ± 5.35%, 75.52% ± 8.02%, 76.96% ± 6.32% y 79.41% ± 8.70% para el TBOEMC, TBOEMC@CB[7], HSA-TBOEMC y HSA-TBOEMC@CB[7] respectivamente. Cabe resaltar, que se realizó un control de la toxicidad tanto en oscuro como irradiado de los diferentes vehículos (Anexo 32). Cada vehículo se probó a las concentraciones empleadas en los experimentos de fototoxicidad, como en el caso de la HSA se probó a una concentración de 6 µM y 7 µM con respecto al TBOPDP y TBOEMC, concluyendo que como se ha reportado en la literatura y trabajos anteriores no presentan un efecto fototóxico.[103, 159-161]



Figura 29. Estudios de fototoxicidad del TBOEMC solo y con diferentes sistemas de transporte como HSA y CB[7]. Cada sistema fue incorporado e irradiado durante 90 minutos. Las barras oscuras corresponden a los controles de cada sistema en oscuro y las barras violetas a las muestras irradiadas. El TBOEMC 3 μ M solo, en presencia de CB[7] 50 μ M (TBOEMC@CB[7]), conjugado con la HSA donde la HSA tenía una concentración de 7 μ M (HSA-TBOEMC) y el complejo biosupramolecuar en presencia de HSA 7 μ M y CB[7] 50 μ M (HSA-TBOEMC@CB[7]).

5.7.3. Estudios de incorporación de los derivados de TBO y los diferentes sistemas

Los resultados obtenidos de fototoxicidad anteriormente indican que ambos derivados y sus diferentes sistemas presentan una fototoxicidad celular similar, así que se decidió explorar si se presentaba alguna diferencia en la incorporación de cada sistema. Primero se realizaron los estudios de incorporación utilizando las concentraciones anteriormente mencionadas de cada sistema y con una incubación para la incorporación de 90 minutos. Para

determinar la concentración de PS incorporado por cada sistema que se probó se realizó las respectivas curvas de calibración del TBOPDP y TBOEMC. Las curvas de calibración fueron realizadas utilizando sus respectivos espectros de emisión a concentraciones conocidas de los PS y con estas curvas se logró determinar la concentración de PS incorporado en cada sistema por millón de células (picomoles/10⁶ células).

El la Figura 30 se pueden observar los datos obtenidos de la incorporación de los derivados y los diferentes sistemas. Los derivados TBOPDP y TBOEMC no presentan una diferencia estadísticamente significativa en la incorporación respecto inclusión TBOPDP@CB[7] y con а sus complejos de TBOEMC@CB[7]. EI TBOPDP presento una incorporación de 24.71 ± 8.13 picomoles/10⁶ células mientras que el complejo de inclusión TBOPDP@CB[7] incorporo 8.95 ± 2.74 picomoles/10⁶ células. En el caso del derivado TBOEMC este incorporo 19.55 ± 5.46 picomoles/10⁶ células mientras que el TBOEMC@CB[7] incorporo 7.45 ± 2.94 picomoles/10⁶ células. Los conjugados HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC presentaron diferencias significativas con respecto a los derivados y a los complejos de inclusión. La HSA se propuso en este proyecto con la visión de incrementar la incorporación en células cancerígenas ya que en la literatura se encuentra reportado que tanto las células epiteliales como diferentes líneas celulares entre estas la células HeLa, presentan receptores gp60, neonatales Fc (FcRn- The Neonatal Fc Receptor) y SPARC (Secreted Protein Acid and Rich in Cysteine) en sus membranas externas incrementando su afinidad con las proteínas séricas y ayudando a potenciar su incorporación por medio de endocitosis.[162, 163] El conjugado HSA-TBOPDP presenta una incorporación de 135.64 ± 5.01 picomoles/10⁶ células, lo cual equivale a un aproximado de 5 veces más que el derivado TBOPDP y presenta una diferencia estadística extremadamente significativa con respecto al TBOPDP y al complejo TBOPDP@CB[7]. En el caso del conjugado HSA-TBOEMC presenta una incorporación de 32.32 ± 1.34

picomoles/10⁶ células, inicialmente se puede ver que hay una menor incorporación si se compara con el conjugado HSA-TBOPDP y a su vez no presenta una diferencia estadística significativa con derivado TBOEMC, pero si con el complejo TBOEMC@CB[7]. Estos resultados con los conjugados HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC se pueden relacionar con dos eventos la estabilidad de los enlaces formados con el residuo de Cys34 y el reciclaje de la HSA.[164] Primero los enlaces presentes en los conjugados HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC son tipo enlace disulfuro y tioéter respectivamente; los enlaces disulfuro son enlaces lábiles al momento de entrar en las células, ya que estas poseen actividad antioxidante y están presentes agentes reductores como el glutatión.[165] El glutatión se encuentra sobre expresado en células cancerígenas y una de sus funciones es mantener los grupos tiol de las proteínas en su forma reducida, esto podría generar la reducción del enlace disulfuro en el complejo HSA-TBOPDP y la liberación del PS.[166, 167] Por otro lado, el enlace tioéter en el conjugado HSA-TBOEMC es más estable con respecto al enlace disulfuro, pero este enlace puede desconjugarse por un intercambio con un tiol o hidrolizarse y descomponerse via retro-Michael lo que generaría la apertura del anillo de maleimida formando un tiomaleato; este último conjugado con el anillo de maleimida abierto es más estable y se mantendría la conjugación covalente con la HSA.[168-171] Además de la estabilidad de los enlaces, en la literatura hay reportes que indican que así como la albúmina se incorpora mediante receptores también estos receptores se encargan de la exocitosis que da como resultado la reubicación de la HSA en el área extracelular, favoreciendo un reciclaje y degradación posterior de la HSA.[164] Tomando en cuenta tanto la estabilidad del enlace como el reciclaje de la HSA reportada en la literatura, se podría inferir que el complejo HSA-TBOEMC al poseer un enlace más estable el PS se mantiene conjugado con la HSA y puede sufrir la exocitosis lo cual influiría en la cantidad de PS incorporada, ya que parte del conjugado incorporado va a ser expulsado por la célula. Finalmente, los complejos biosupramoleculares HSA-
TBOPDP@CB[7] HSA-TBOEMC@CB[7] у presentaron diferencias significativas con los derivados y complejos de inclusión. El complejo biosupramolecular HSA-TBOPDP@CB[7] presentó una incorporación de 79.50 ± 5.03 picomoles/10⁶ células y presento diferencias estadísticamente significativas con el TBOPDP y TBOPDP@CB[7] indicando un incremento en la incorporación de PS, pero ocurrió un caso contrario con respecto al conjugado HSA-TBOPDP en el cual hay una diferencia estadísticamente significativa y hubo una disminución de la incorporación en presencia de CB[7]. Por otro lado, el complejo biosupramolecular HSA-TBOEMC@CB[7] presentó una incorporación de 51.03 ± 9.08 picomoles/10⁶ células y presentó diferencias estadísticamente significativas el TBOEMC con У TBOEMC@CB[7] indicando un incremento en la incorporación de PS; en este caso no se presentó una diferencia estadísticamente significativa con el conjugado HSA-TBOEMC.



Figura 30. Estudios de incorporación de: a) El TBOPDP 3 μ M solo, en presencia de CB[7] 50 μ M (TBOPDP@CB[7]), conjugado con la HSA donde la HSA tenía una concentración de 6 μ M (HSA-TBOPDP) y el complejo biosupramolecuar en presencia de HSA 6 μ M y CB[7] 50 μ M (HSA-TBOPDP@CB[7]). b) El TBOEMC 3 μ M solo, en presencia de CB[7] 50 μ M (TBOEMC@CB[7]), conjugado con la HSA donde la HSA tenía una concentración de 7 μ M (HSA-TBOEMC) y el complejo biosupramolecuar en presencia de HSA 7 μ M y CB[7] 50 μ M (HSA-TBOEMC@CB[7]) incubados durante 90 minutos.

Los resultados obtenidos de fototoxicidad indicaron que todos los sistemas presentan una fototoxicidad similar independientemente del sistema de transporte que se utilice; esto contradice a los resultados obtenidos del rendimiento cuántico de oxígeno singlete, ya que se vio una importante disminución de este en los sistemas en presencia de la HSA pero al comparar los resultados de incorporación se corrobora que hay un incremento en la incorporación del PS utilizando la HSA como vehículo, así que esto compensa el efecto en el Φ_{Δ} y se ve reflejado en los resultados de fototoxicidad. Los complejos biosupramoleculares presentaron una fototoxicidad similar con respecto a los otros sistemas, pero en relación con su incorporación se ve un incremento con respecto a los PS solos o a los complejos de inclusión con el CB[7]. Finalmente, a pesar el que el efecto fototóxico entre el TBOPDP y TBOEMC no difiere significativamente entre ellos, si se diferencian en que no siguen la misma tendencia con respecto al efecto de cada vehículo utilizado, si no que sus efectos depende específicamente de cada derivado.

Capítulo VI. Conclusiones

La derivatización del TBO fue llevada a cabo para realizar una unión covalente con la HSA. Las estructuras químicas de los derivados obtenidos fueron determinadas utilizando técnicas de espectrometría de masas de alta resolución, disociación inducida por colisión y espectroscopia de resonancia magnética nuclear. La conjugación covalente de los derivados con el residuo de CYS34 de la HSA se realizó mediante reacciones de intercambio tioldisulfuro y adición de tio-Michael; los conjugados fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas, espectrometría de masas MALDI-TOF y dicroísmo circular de lo que se puede concluir que se obtuvieron los conjugados y no se altera la estructura secundaria de la HSA luego de la conjugación. Por otro lado, los derivados presentaron cambios en sus máximos de absorción y emisión los cuales presentan un corrimiento hipsocrómico en comparación con el TBO. El TBO presenta problemas de fotoestabilidad como ha sido reportado anteriormente: debido a esto se analizó la fotoestabilidad de los derivados, determinando que el rendimiento cuántico de fotodegradación de los derivados es la mitad del valor de rendimiento cuántico del precursor; esto es una importante mejora ya que ese es uno de los requisitos para que el fotosensibilizador sea considerado óptimo para su aplicación en la PDT. El tiempo de vida de fluorescencia de los derivados TBOPDP y TBOEMC es mayor que el del TBO en acetonitrilo mientras que en buffer fosfato son similares. Los complejos de inclusión con el CB[7], conjugados con la HSA y complejos biosupramoleculares presentaron un tiempo de vida de fluorescencia promedio mayor que los derivados solos. El rendimiento cuántico de fluorescencia de los derivados es mayor con respecto al TBO en acetonitrilo, pero en solución buffer es similar; todos los complejos de inclusión presentan un incremento en el rendimiento cuántico de fluorescencia y los conjugados presentaron una ligera disminución. El rendimiento cuántico de oxígeno singlete de los derivados en acetonitrilo incrementa con respecto al TBO, pero su tiempo de vida presenta disminución en presencia de los derivados, esto es debido a que su estructura química posee grupos funcionales que son desactivadores de oxígeno singlete. En el caso de los complejos de inclusión todos presentan un incremento en su rendimiento cuántico de oxígeno singlete en comparación al PS solo; caso contrario con los conjugados que se puede ver una disminución del 83% y 87% para el HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC respectivamente; esto se debe a la accesibilidad del oxígeno molecular al bolsillo donde se sitúa el residuo de CYS34 y los aminoácidos vecinales altamente reactivos. Los complejos biosupramoleculares siguieron la tendencia de los conjugados con excepción de leve incremento en el rendimiento cuántico del complejo HSA-TBOEMC@CB[7] con respecto a su respectivo conjugado, lo cual se podría atribuir como resultado de su accesibilidad para el CB[7] debido al largo de la cadena de conjugación con el residuo de CYS34. Finalmente, los estudios de fototoxicidad mostraron que tanto los derivados solos como con los diferentes vehículos presentan resultados similares a pesar de los bajos rendimientos de oxígeno singlete de los conjugados y complejos biosupramoleculares; la explicación para esta tendencia se vio reflejada en los estudios de incorporación los cuales presentaron una mayor incorporación de los conjugados y complejos biosupramoleculares con respecto a los derivados solos o a los complejos de inclusión con CB[7].

Bibliografía

- [1] W. H. Organization. "World Health Organization," 21 de julio, 2021; https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.
- [2] H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA: A Cancer Journal for Clinicians,* vol. 71, no. 3, pp. 209-249, 2021/05/01, 2021.
- [3] S. Parra-Soto, F. Petermann-Rocha, M. A. Martínez-Sanguinetti, A. M. Leiva-Ordeñez, C. Troncoso-Pantoja, N. Ulloa, X. Diaz-Martínez, and C. Celis-Morales, "Cáncer en Chile y en el mundo: una mirada actual y su futuro escenario epidemiológico," *Revista médica de Chile,* vol. 148, pp. 1489-1495, 2020.
- [4] M. d. S. d. Chile. "Ministerio de Salud de Chile," 21 de julio, 2021; <u>https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2019/01/2019.01.23_PLAN-NACIONAL-DE-CANCER_web.pdf</u>.
- [5] H. Abrahamse, and Michael R. Hamblin, "New photosensitizers for photodynamic therapy," *Biochemical Journal*, vol. 473, no. 4, pp. 347-364, 2016.
- [6] H. Michael, and M. Pawel, *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical*: Artech, 2008.
- [7] L. Shi, P. Liu, J. Liu, Y. Yang, Q. Chen, Y. Zhang, H. Zhang, and X. Wang, "Application of 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy in common skin diseases," *Translational Biophotonics*, vol. 2, no. 1-2, pp. e201900028, 2020/05/01, 2020.
- [8] K. Wojewoda, M. Gillstedt, J. Tovi, L. Salah, A.-M. Wennberg Larkö, A. Sjöholm, and C. Sandberg, "Optimizing treatment of acne with photodynamic therapy (PDT) to achieve long-term remission and reduce side effects. A prospective randomized controlled trial," *Journal of*

Photochemistry and Photobiology B: Biology, vol. 223, pp. 112299, 2021/10/01/, 2021.

- [9] Y. Zhang, P. Huang, D. Wang, J. Chen, W. Liu, P. Hu, M. Huang, X. Chen, and Z. Chen, "Near-infrared-triggered antibacterial and antifungal photodynamic therapy based on lanthanide-doped upconversion nanoparticles," *Nanoscale*, vol. 10, no. 33, pp. 15485-15495, 2018.
- [10] N. Moslemi, N. Rouzmeh, F. Shakerinia, A. Bahador, P. Soleimanzadeh Azar, M. J. Kharazifard, M. Paknejad, and R. Fekrazad, "Photodynamic Inactivation of Porphyromonas gingivalis utilizing Radachlorin and Toluidine Blue O as Photosensitizers: An In Vitro Study," *Journal of Iasers in medical sciences*, vol. 9, no. 2, pp. 107-112, Spring, 2018.
- [11] L. A. Valle, M. M. R. Lopes, M. S. R. Zangrando, A. C. P. Sant'Ana, S. L. A. Greghi, M. L. R. de Rezende, and C. A. Damante, "Blue photosensitizers for aPDT eliminate Aggregatibacter actinomycetemcomitans in the absence of light: An in vitro study," *J Photochem Photobiol B*, vol. 194, pp. 56-60, May, 2019.
- [12] M. A. Lopez, P. C. Passarelli, M. Marra, A. Lopez, A. Moffa, M. Casale, and A. D'Addona, "Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy (PDT) in periodontitis and peri-implantitis: A systematic review," *Journal of biological regulators and homeostatic agents,* vol. 34, no. 5 Suppl. 3, pp. 59-65. Technology in Medicine, 2020 Sep-Oct, 2020.
- [13] L. Dibona-Villanueva, and D. Fuentealba, "Novel Chitosan–Riboflavin Conjugate with Visible Light-Enhanced Antifungal Properties against Penicillium digitatum," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 69, no. 3, pp. 945-954, 2021/01/27, 2021.
- [14] Y. Chen, J. Liu, M. Song, L. Jiang, L. Liu, Y. Liu, G. Fu, J. Xue, J.-y. Liu, M. Huang, and J. Li, "Insights into the binding mechanism of BODIPYbased photosensitizers to human serum albumin: A combined experimental and computational study," *Spectrochimica Acta Part A:*

Molecular and Biomolecular Spectroscopy, vol. 203, pp. 158-165, 2018/10/05/, 2018.

- [15] X. Li, S. Lee, and J. Yoon, "Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy," *Chemical Society Reviews*, vol. 47, no. 4, pp. 1174-1188, 2018.
- [16] J. Robinson-Duggon, F. Pérez-Mora, L. Dibona-Villanueva, and D. Fuentealba, "Potential Applications of Cucurbit[n]urils Inclusion Complexes in Photodynamic Therapy," *Israel Journal of Chemistry*, vol. 58, no. 3-4, pp. 199-214, 2018.
- [17] D. E. Dolmans, D. Fukumura, and R. K. Jain, "Photodynamic therapy for cancer," *Nat Rev Cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 380-7, May, 2003.
- [18] R. R. Allison, and K. Moghissi, "Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms," *Clinical endoscopy*, vol. 46, no. 1, pp. 24-29, 2013.
- [19] A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, "Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 2, no. 2, pp. 91-106, 2005/06/01/, 2005.
- [20] J. Soriano, A. Villanueva, J. C. Stockert, and M. Cañete, "Regulated necrosis in HeLa cells induced by ZnPc photodynamic treatment: a new nuclear morphology," *Int J Mol Sci*, vol. 15, no. 12, pp. 22772-85, Dec 9, 2014.
- [21] H. S. Nalwa, Handbook of Photochemistry and Photobiology, 2003.
- [22] X. Li, S. Kolemen, J. Yoon, and E. U. Akkaya, "Activatable Photosensitizers: Agents for Selective Photodynamic Therapy," *Advanced Functional Materials*, vol. 27, no. 5, pp. 1604053, 2017/02/01, 2017.
- [23] T. A. Debele, S. Peng, and H.-C. Tsai, "Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy," *International journal of molecular sciences*, vol. 16, no. 9, pp. 22094-22136, 2015.

- [24] M. Dichiara, O. Prezzavento, A. Marrazzo, V. Pittalà, L. Salerno, A. Rescifina, and E. Amata, "Recent advances in drug discovery of phototherapeutic non-porphyrinic anticancer agents," *European Journal* of Medicinal Chemistry, vol. 142, pp. 459-485, 2017/12/15/, 2017.
- [25] I. S. Mfouo-Tynga, L. D. Dias, N. M. Inada, and C. Kurachi, "Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 34, pp. 102091, 2021/06/01/, 2021.
- [26] V. P. S. Jesus, L. Raniero, G. M. Lemes, T. T. Bhattacharjee, P. C. Caetano Júnior, and M. L. Castilho, "Nanoparticles of methylene blue enhance photodynamic therapy," *Photodiagnosis Photodyn Ther,* vol. 23, pp. 212-217, Sep, 2018.
- [27] A. Selva Sharma, S. Anandakumar, and M. Ilanchelian, "A combined spectroscopic and molecular docking study on site selective binding interaction of Toluidine blue O with Human and Bovine serum albumins," *Journal of Luminescence*, vol. 151, pp. 206-218, 2014/07/01/, 2014.
- [28] J. Robinson-Duggon, C. D. McTiernan, M. Muñoz, D. Guerra, E. Escobar Álvarez, F. Andrade-Villalobos, A. Fierro, A. M. Edwards, E. I. Alarcon, and D. Fuentealba, "Biosupramolecular complexes of amphiphilic photosensitizers with human serum albumin and cucurbit[7]uril as carriers for photodynamic therapy," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,* vol. 223, pp. 112284, 2021/10/01/, 2021.
- [29] E. Pourbasheer, S. Riahi, M. R. Ganjali, and P. Norouzi, "Application of genetic algorithm-support vector machine (GA-SVM) for prediction of BK-channels activity," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 44, no. 12, pp. 5023-5028, 2009/12/01/, 2009.
- [30] N. Mehraban, and H. S. Freeman, "Developments in PDT Sensitizers for Increased Selectivity and Singlet Oxygen Production," *Materials* (*Basel, Switzerland*), vol. 8, no. 7, pp. 4421-4456, 2015.

- [31] A. B. Ormond, and H. S. Freeman, "Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy," *Materials,* vol. 6, no. 3, 2013.
- [32] J. Moan, "Properties for optimal PDT sensitizers," Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, vol. 5, no. 3, pp. 521-524, 1990/05/01/, 1990.
- [33] R. Baskaran, J. Lee, and S.-G. Yang, "Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications," *Biomaterials Research*, vol. 22, no. 1, pp. 25, 2018/09/26, 2018.
- [34] E. Boix-Garriga, B. Rodríguez-Amigo, O. Planas, and S. Nonell, "Chapter 2 Properties of Singlet Oxygen," *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, Volume 1*, pp. 23-46: The Royal Society of Chemistry, 2016.
- [35] M. C. DeRosa, and R. J. Crutchley, "Photosensitized singlet oxygen and its applications," *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 233-234, pp. 351-371, 2002/11/01/, 2002.
- [36] C. Schweitzer, and R. Schmidt, "Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen," *Chemical Reviews*, vol. 103, no. 5, pp. 1685-1758, 2003/05/01, 2003.
- [37] C. S. Foote, S. Wexler, W. Ando, and R. Higgins, "Chemistry of singlet oxygen. IV. Oxygenations with hypochlorite-hydrogen peroxide," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 90, no. 4, pp. 975-981, 1968/02/14, 1968.
- [38] A. P. Schaap, and P. D. Bartlett, "Direct reaction of triphenyl phosphite ozonide with cis- and trans-diethoxyethylenes," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 92, no. 20, pp. 6055-6057, 1970/10/01, 1970.
- [39] J. M. Aubry, B. Cazin, and F. Duprat, "Chemical sources of singlet oxygen. 3. Peroxidation of water-soluble singlet oxygen carriers with the hydrogen peroxide-molybdate system," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 54, no. 3, pp. 726-728, 1989/02/01, 1989.

- [40] C. Pierlot, V. Rataj, and J.-M. Aubry, "Chapter 3 Water-Soluble Carriers of Singlet Oxygen for Biological Media," *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, Volume 1*, pp. 47-73: The Royal Society of Chemistry, 2016.
- [41] E. L. Clennan, "Chapter 18 Overview of the Chemical Reactions of Singlet Oxygen," Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, Volume 1, pp. 351-367: The Royal Society of Chemistry, 2016.
- [42] P. Di Mascio, G. R. Martinez, S. Miyamoto, G. E. Ronsein, M. H. G. Medeiros, and J. Cadet, "Singlet Molecular Oxygen Reactions with Nucleic Acids, Lipids, and Proteins," *Chemical Reviews*, vol. 119, no. 3, pp. 2043-2086, 2019/02/13, 2019.
- [43] N. J. R. V. S. J. C. Turro, Principles of molecular photochemistry : an introduction, Sausalito, Calif.: University Science Books, 2009.
- [44] V. J. A. Balzani, *Photochemistry and photophysics : concepts, research, applications*, [S.I.: Wiley-Vch Verlag Gmbh, 2014.
- [45] J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Boston: Springer US, 2006.
- [46] D. F. Eaton, "International union of pure and applied chemistry organic chemistry division commission on photochemistry: Reference materials for fluorescence measurement," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 2, no. 4, pp. 523-531, 1988/12/01/, 1988.
- [47] S. F. Nonell, Cristina Flors, *Singlet oxygen. Applications in Biosciences and Nanosciences*, 2016.
- [48] A. M. Almeida, O. N. Oliveira, and P. H. B. Aoki, "Role of Toluidine Blue-O Binding Mechanism for Photooxidation in Bioinspired Bacterial Membranes," *Langmuir*, vol. 35, no. 51, pp. 16745-16751, 2019/12/24, 2019.
- [49] S. P. Tseng, W. C. Hung, H. J. Chen, Y. T. Lin, H. S. Jiang, H. C. Chiu,P. R. Hsueh, L. J. Teng, and J. C. Tsai, "Effects of toluidine blue O

(TBO)-photodynamic inactivation on community-associated methicillinresistant Staphylococcus aureus isolates," *J Microbiol Immunol Infect,* vol. 50, no. 1, pp. 46-54, Feb, 2017.

- [50] W.-S. Kuo, C.-N. Chang, Y.-T. Chang, and C.-S. Yeh, "Antimicrobial gold nanorods with dual-modality photodynamic inactivation and hyperthermia," *Chemical Communications*, no. 32, pp. 4853-4855, 2009.
- [51] G. Sridharan, and A. A. Shankar, "Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility," *J Oral Maxillofac Pathol*, vol. 16, no. 2, pp. 251-5, May, 2012.
- [52] P. Herlin, J. Marnay, J. H. Jacob, J. M. Ollivier, and A. M. Mandard, "A study of the mechanism of the toluidine blue dye test," *Endoscopy*, vol. 15, no. 1, pp. 4-7, Jan, 1983.
- [53] D. Singh, and R. K. Shukla, "Utility of toluidine blue test in accessing and detecting intra-oral malignancies," *Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery : official publication of the Association of Otolaryngologists of India,* vol. 67, no. Suppl 1, pp. 47-50, 2015.
- [54] M. Ilanchelian, and R. Ramaraj, "Binding interactions of Toluidine Blue O with Escherichia coli DNA: formation of bridged structure," *J Fluoresc,* vol. 21, no. 4, pp. 1439-53, Jul, 2011.
- [55] J. Robinson-Duggon, N. Mariño-Ocampo, P. Barrias, D. Zúñiga-Núñez,
 G. Günther, A. M. Edwards, A. Greer, and D. Fuentealba, "Mechanism of Visible-Light Photooxidative Demethylation of Toluidine Blue O," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 123, no. 23, pp. 4863-4872, 2019/06/13, 2019.
- [56] R. Bonneau, R. Pottier, O. Bagno, and J. Joussot-Dubien, "pH dependence of singlet oxygen production in aqueous solutions using thiazine dyes as photosensitizers," *Photochem Photobiol*, vol. 21, no. 3, pp. 159-63, Mar, 1975.

- [57] M. Karimian Amroabadi, A. Taheri-Kafrani, L. Heidarpoor Saremi, and A. A. Rastegari, "Spectroscopic studies of the interaction between alprazolam and apo-human serum transferrin as a drug carrier protein," *Int J Biol Macromol*, vol. 108, pp. 263-271, Mar, 2018.
- [58] Z. Liu, and X. Chen, "Simple bioconjugate chemistry serves great clinical advances: albumin as a versatile platform for diagnosis and precision therapy," *Chemical Society Reviews*, vol. 45, no. 5, pp. 1432-1456, 2016.
- [59] S. Absar, K. Nahar, S. Choi, F. Ahsan, V. C. Yang, and Y. M. Kwon, "Serum albumin-protamine conjugate for biocompatible platform for targeted delivery of therapeutic macromolecules," *J Biomed Mater Res A*, vol. 102, no. 8, pp. 2481-90, Aug, 2014.
- [60] W. M. Sharman, J. E. van Lier, and C. M. Allen, "Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems," *Adv Drug Deliv Rev,* vol. 56, no. 1, pp. 53-76, Jan 13, 2004.
- [61] H. Maeda, "Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects," *Bioconjug Chem*, vol. 21, no. 5, pp. 797-802, May 19, 2010.
- [62] H. K. Dewangan, "Albumin as Natural Versatile Drug Carrier for Various Diseases Treatment," Sustainable Agriculture Reviews 43: Pharmaceutical Technology for Natural Products Delivery Vol. 1 Fundamentals and Applications, A. Saneja, A. K. Panda and E. Lichtfouse, eds., pp. 239-268, Cham: Springer International Publishing, 2020.
- [63] C. Bertucci, and E. Domenici, "Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance," *Curr Med Chem*, vol. 9, no. 15, pp. 1463-81, Aug, 2002.
- [64] P. Zhao, G. Gao, L. Zhang, Q. Cai, N. Lu, L. Cheng, S. Li, and X. Hou,
 "Drug-protein binding mechanism of juglone for early pharmacokinetic profiling: Insights from ultrafiltration, multi-spectroscopic and molecular

docking methods," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* vol. 141, pp. 262-269, 2017/07/15/, 2017.

- [65] T. Peters, All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications., 1996.
- [66] F. Kratz, "A clinical update of using albumin as a drug vehicle a commentary," *J Control Release*, vol. 190, pp. 331-6, Sep 28, 2014.
- [67] J. L. Beck, S. Ambahera, S. R. Yong, M. M. Sheil, J. de Jersey, and S. F. Ralph, "Direct observation of covalent adducts with Cys34 of human serum albumin using mass spectrometry," *Anal Biochem*, vol. 325, no. 2, pp. 326-36, Feb 15, 2004.
- [68] D. C. Carter, and J. X. Ho, "Structure of Serum Albumin," *Advances in Protein Chemistry*, C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, F. M. Richards and D. S. Eisenberg, eds., pp. 153-203: Academic Press, 1994.
- [69] F. Kratz, and B. Elsadek, "Clinical impact of serum proteins on drug delivery," *J Control Release*, vol. 161, no. 2, pp. 429-45, Jul 20, 2012.
- [70] H. Zhang, Z. Sun, K. Wang, N. Li, H. Chen, X. Tan, L. Li, Z. He, and J. Sun, "Multifunctional Tumor-Targeting Cathepsin B-Sensitive Gemcitabine Prodrug Covalently Targets Albumin in Situ and Improves Cancer Therapy," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 29, no. 6, pp. 1852-1858, 2018/06/20, 2018.
- [71] D. Sleep, "Albumin and its application in drug delivery," *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 12, no. 5, pp. 793-812, May, 2015.
- [72] D. O. Oluwole, E. Prinsloo, and T. Nyokong, "Photophysical behavior and photodynamic therapy activity of conjugates of zinc monocarboxyphenoxy phthalocyanine with human serum albumin and chitosan," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 173, pp. 292-300, 2017/02/15/, 2017.
- [73] M. Durmuş, H. Yaman, C. Göl, V. Ahsen, and T. Nyokong, "Watersoluble quaternized mercaptopyridine-substituted zincphthalocyanines: Synthesis, photophysical, photochemical and bovine

serum albumin binding properties," *Dyes and Pigments,* vol. 91, no. 2, pp. 153-163, 2011/11/01/, 2011.

- [74] I. Vayá, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Jiménez, and M. A. Miranda,
 "Photoactive assemblies of organic compounds and biomolecules: drug–protein supramolecular systems," *Chemical Society Reviews*, vol. 43, no. 12, pp. 4102-4122, 2014.
- [75] M. J. Webber, and R. Langer, "Drug delivery by supramolecular design," *Chemical Society Reviews*, vol. 46, no. 21, pp. 6600-6620, 2017.
- [76] F. Kratz, A. Warnecke, K. Scheuermann, C. Stockmar, J. Schwab, P. Lazar, P. Drückes, N. Esser, J. Drevs, D. Rognan, C. Bissantz, C. Hinderling, G. Folkers, I. Fichtner, and C. Unger, "Probing the cysteine-34 position of endogenous serum albumin with thiol-binding doxorubicin derivatives. Improved efficacy of an acid-sensitive doxorubicin derivative with specific albumin-binding properties compared to that of the parent compound," *J Med Chem,* vol. 45, no. 25, pp. 5523-33, Dec 5, 2002.
- [77] M. B. Caspersen, M. Kuhlmann, K. Nicholls, M. J. Saxton, B. Andersen, K. Bunting, J. Cameron, and K. A. Howard, "Albumin-based drug delivery using cysteine 34 chemical conjugates - important considerations and requirements," *Ther Deliv*, vol. 8, no. 7, pp. 511-519, Jul, 2017.
- [78] F. Kratz, "Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles," *J Control Release*, vol. 132, no. 3, pp. 171-83, Dec 18, 2008.
- [79] A. J. Stewart, C. A. Blindauer, S. Berezenko, D. Sleep, D. Tooth, and P. J. Sadler, "Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin," *The FEBS Journal*, vol. 272, no. 2, pp. 353-362, 2005/01/01, 2005.
- [80] F. Kratz, R. Müller-Driver, I. Hofmann, J. Drevs, and C. Unger, "A Novel Macromolecular Prodrug Concept Exploiting Endogenous Serum

Albumin as a Drug Carrier for Cancer Chemotherapy," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 43, no. 7, pp. 1253-1256, 2000/04/06, 2000.

- [81] D. Li, L. Ambrogio, T. Shimamura, S. Kubo, M. Takahashi, L. R. Chirieac, R. F. Padera, G. I. Shapiro, A. Baum, F. Himmelsbach, W. J. Rettig, M. Meyerson, F. Solca, H. Greulich, and K. K. Wong, "BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models," *Oncogene*, vol. 27, no. 34, pp. 4702-11, Aug 7, 2008.
- [82] R. A. de Claro, K. M. McGinn, N. Verdun, S. L. Lee, H. J. Chiu, H. Saber, M. E. Brower, C. J. Chang, E. Pfuma, B. Habtemariam, J. Bullock, Y. Wang, L. Nie, X. H. Chen, D. R. Lu, A. Al-Hakim, R. C. Kane, E. Kaminskas, R. Justice, A. T. Farrell, and R. Pazdur, "FDA Approval: Ibrutinib for Patients with Previously Treated Mantle Cell Lymphoma and Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia," *Clin Cancer Res,* vol. 21, no. 16, pp. 3586-90, Aug 15, 2015.
- [83] D. Cross, S. Ashton, C. Nebhan, C. Eberlein, M. R. V. Finlay, G. Hughes, V. Jacobs, M. Mellor, M. Red Brewer, C. Meador, J. Orme, P. Spitzler, S. Powell, A. Rahi, P. Taylor, R. A. Ward, P. Daunt, A. Galer, T. Klinowska, G. Richmond, and W. Pao, "Abstract A109: AZD9291: an irreversible, potent and selective third generation tyrosine kinase inhibitor (TKI) targeting EGFR activating (EGFRm+) and resistance (T790M) mutations in advanced lung adenocarcinoma," *Molecular Cancer Therapeutics,* vol. 12, no. 11 Supplement, pp. A109, 2013.
- [84] L. Wang, J. Zhao, Y. Yao, C. Wang, J. Zhang, X. Shu, X. Sun, Y. Li, K. Liu, H. Yuan, and X. Ma, "Covalent binding design strategy: A prospective method for discovery of potent targeted anticancer agents," *Eur J Med Chem*, vol. 142, pp. 493-505, Dec 15, 2017.
- [85] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, and A. Whitty, "The resurgence of covalent drugs," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 10, no. 4, pp. 307-317, 2011/04/01, 2011.

- [86] T. A. Baillie, "Targeted Covalent Inhibitors for Drug Design," *Angew Chem Int Ed Engl,* vol. 55, no. 43, pp. 13408-13421, Oct 17, 2016.
- [87] H. Jeong, M. Huh, S. J. Lee, H. Koo, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, and K. Kim, "Photosensitizer-conjugated human serum albumin nanoparticles for effective photodynamic therapy," *Theranostics*, vol. 1, pp. 230-239, 2011.
- [88] V. I. Raskolupova, T. V. Popova, O. D. Zakharova, A. E. Nikotina, T. V. Abramova, and V. N. Silnikov, "Human Serum Albumin Labelling with a New BODIPY Dye Having a Large Stokes Shift," *Molecules,* vol. 26, no. 9, 2021.
- [89] y. yue, t. zhao, Y. Wang, K. Ma, X. Wu, F. Huo, F. Cheng, and C. Yin,
 "HSA-Lys-161 Covalent Bound Fluorescent Dye for In Vivo Blood Drug Dynamic Imaging and Tumor Mapping," *Chemical Science*, 2021.
- [90] J. Kim, I.-S. Jung, S.-Y. Kim, E. Lee, J.-K. Kang, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, and K. Kim, "New Cucurbituril Homologues: Syntheses, Isolation, Characterization, and X-ray Crystal Structures of Cucurbit[n]uril (n = 5, 7, and 8)," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 122, no. 3, pp. 540-541, 2000/01/01, 2000.
- [91] A. C. Bhasikuttan, J. Mohanty, W. M. Nau, and H. Pal, "Efficient Fluorescence Enhancement and Cooperative Binding of an Organic Dye in a Supra-biomolecular Host–Protein Assembly," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, no. 22, pp. 4120-4122, 2007/05/25, 2007.
- [92] K. I. Assaf, and W. M. Nau, "Cucurbiturils: from synthesis to high-affinity binding and catalysis," *Chemical Society Reviews*, vol. 44, no. 2, pp. 394-418, 2015.
- [93] J. Robinson-Duggon, F. Pérez-Mora, L. Valverde-Vásquez, D. Cortés-Arriagada, J. R. De la Fuente, G. Günther, and D. Fuentealba, "Supramolecular Reversible On–Off Switch for Singlet Oxygen Using

Cucurbit[n]uril Inclusion Complexes," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 121, no. 39, pp. 21782-21789, 2017/10/05, 2017.

- [94] G. Villarroel-Lecourt, J. Carrasco-Carvajal, F. Andrade-Villalobos, F. Solís-Egaña, I. Merino-San Martín, J. Robinson-Duggon, and D. Fuentealba, "Encapsulation of Chemotherapeutic Drug Melphalan in Cucurbit[7]uril: Effects on Its Alkylating Activity, Hydrolysis, and Cytotoxicity," ACS Omega, vol. 3, no. 7, pp. 8337-8343, 2018/07/31, 2018.
- [95] D. A. Uhlenheuer, K. Petkau, and L. Brunsveld, "Combining supramolecular chemistry with biology," *Chem Soc Rev*, vol. 39, no. 8, pp. 2817-26, Aug, 2010.
- [96] H. D. Nguyen, D. T. Dang, J. L. J. van Dongen, and L. Brunsveld, "Protein Dimerization Induced by Supramolecular Interactions with Cucurbit[8]uril," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 49, no. 5, pp. 895-898, 2010/01/25, 2010.
- [97] M. E. Aliaga, L. García-Río, M. Pessêgo, R. Montecinos, D. Fuentealba, I. Uribe, M. Martín-Pastor, and O. García-Beltrán, "Host–guest interaction of coumarin-derivative dyes and cucurbit[7]uril: leading to the formation of supramolecular ternary complexes with mercuric ions," *New Journal of Chemistry*, vol. 39, no. 4, pp. 3084-3092, 2015.
- [98] J. Cáceres, J. Robinson-Duggon, A. Tapia, C. Paiva, M. Gómez, C. Bohne, and D. Fuentealba, "Photochemical behavior of biosupramolecular assemblies of photosensitizers, cucurbit[n]urils and albumins," *Phys Chem Chem Phys*, vol. 19, no. 3, pp. 2574-2582, Jan 18, 2017.
- [99] G. Chakraborty, M. K. Choudhary, M. Sundararajan, A. K. Ray, S. Mula, and H. Pal, "Stimuli Responsive Confinement of a Molecular Rotor Based BODIPY Dye inside a Cucurbit[7]uril Nanocavity," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 125, no. 29, pp. 7946-7957, 2021/07/29, 2021.

- [100] K. Scholtbach, İ. Venegas, C. Bohne, and D. Fuentealba, "Timeresolved fluorescence anisotropy as a tool to study guest-cucurbit[n]urilprotein ternary supramolecular interactions," *Photochem Photobiol Sci,* vol. 14, no. 4, pp. 842-52, Apr, 2015.
- [101] W. Lei, G. Jiang, Q. Zhou, B. Zhang, and X. Wang, "Greatly enhanced binding of a cationic porphyrin towards bovine serum albumin by cucurbit[8]uril," *Phys Chem Chem Phys*, vol. 12, no. 40, pp. 13255-60, Oct 28, 2010.
- [102] S. Pandit, A. Bapli, R. K. Gautam, R. Jana, and D. Seth, "Spectroscopic investigation of a red emitting dye in the companionship of serum albumins and cucurbit[7]uril," *Journal of Molecular Liquids*, vol. 332, pp. 115885, 2021/06/15/, 2021.
- [103] J. Robinson-Duggon, "Complejos Biosupramoleculares de Derivados Hidrofóbicos de Azul de Toluidina con Cucurbit[7]urilo y Albúmina de Suero Humano y su Efecto Fototóxico en Células Tumorales Cultivadas In Vitro.," Pontificia Universidad Católica de Chile, 2018.
- M. R. McKamey, and L. A. Spitznagle, "Chromatographic, Mass Spectral, and Visible Light Absorption Characteristics of Toluidine Blue O and Related Dyes," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 64, no. 9, pp. 1456-1462, 1975/09/01/, 1975.
- [105] S. Yi, and A. E. Kaifer, "Determination of the Purity of Cucurbit[n]uril (n = 7, 8) Host Samples," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 76, no. 24, pp. 10275-10278, 2011/12/16, 2011.
- [106] P. Thordarson, "Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry," *Chemical Society Reviews*, vol. 40, no. 3, pp. 1305-1323, 2011.
- [107] Y. Shao, L. F. Molnar, Y. Jung, J. Kussmann, C. Ochsenfeld, S. T. Brown, A. T. B. Gilbert, L. V. Slipchenko, S. V. Levchenko, D. P. O'Neill, R. A. DiStasio Jr, R. C. Lochan, T. Wang, G. J. O. Beran, N. A. Besley, J. M. Herbert, C. Yeh Lin, T. Van Voorhis, S. Hung Chien, A. Sodt, R. P.

Steele, V. A. Rassolov, P. E. Maslen, P. P. Korambath, R. D. Adamson,
B. Austin, J. Baker, E. F. C. Byrd, H. Dachsel, R. J. Doerksen, A. Dreuw,
B. D. Dunietz, A. D. Dutoi, T. R. Furlani, S. R. Gwaltney, A. Heyden, S.
Hirata, C.-P. Hsu, G. Kedziora, R. Z. Khalliulin, P. Klunzinger, A. M. Lee,
M. S. Lee, W. Liang, I. Lotan, N. Nair, B. Peters, E. I. Proynov, P. A.
Pieniazek, Y. Min Rhee, J. Ritchie, E. Rosta, C. David Sherrill, A. C.
Simmonett, J. E. Subotnik, H. Lee Woodcock Iii, W. Zhang, A. T. Bell,
A. K. Chakraborty, D. M. Chipman, F. J. Keil, A. Warshel, W. J. Hehre,
H. F. Schaefer Iii, J. Kong, A. I. Krylov, P. M. W. Gill, and M. Head-Gordon, "Advances in methods and algorithms in a modern quantum chemistry program package," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 8, no. 27, pp. 3172-3191, 2006.

- [108] M. J. Frisch, G. Trucks, H. B. schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, and a. et, "Gaussian 09," 2009.
- [109] D. S. Goodsell, G. M. Morris, and A. J. Olson, "Automated docking of flexible ligands: Applications of autodock," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 9, no. 1, pp. 1-5, 1996/01/01, 1996.
- [110] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, and A. J. Olson, "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 30, no. 16, pp. 2785-2791, 2009/12/01, 2009.
- [111] Schrodinger, LLC, "The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8," 2015.
- [112] S. Miyamura, T. Imafuku, M. Anraku, K. Taguchi, K. Yamasaki, Y. Tominaga, H. Maeda, Y. Ishima, H. Watanabe, M. Otagiri, and T. Maruyama, "Comparison of Posttranslational Modification and the Functional Impairment of Human Serum Albumin in Commercial Preparations," no. 1520-6017 (Electronic), 2016.

- [113] Z. Liu, C. Dong, X. Wang, H. Wang, W. Li, J. Tan, and J. Chang, "Self-Assembled Biodegradable Protein–Polymer Vesicle as a Tumor-Targeted Nanocarrier," ACS Applied Materials & Interfaces, vol. 6, no. 4, pp. 2393-2400, 2014/02/26, 2014.
- [114] A. F. S. A. Habeeb, "[37] Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent," *Methods in Enzymology*, pp. 457-464: Academic Press, 1972.
- [115] C. K. Riener, G. Kada, and H. J. Gruber, "Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine," *Anal Bioanal Chem*, vol. 373, no. 4-5, pp. 266-76, Jul, 2002.
- [116] S. G. Tajc, B. S. Tolbert, R. Basavappa, and B. L. Miller, "Direct Determination of Thiol pKa by Isothermal Titration Microcalorimetry," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, no. 34, pp. 10508-10509, 2004/09/01, 2004.
- [117] A. O. Pedersen, and J. Jacobsen, "Reactivity of the thiol group in human and bovine albumin at pH 3--9, as measured by exchange with 2,2'dithiodipyridine," *Eur J Biochem*, vol. 106, no. 1, pp. 291-5, May, 1980.
- [118] H. Mutlu, E. B. Ceper, X. Li, J. Yang, W. Dong, M. M. Ozmen, and P. Theato, "Sulfur Chemistry in Polymer and Materials Science," *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 40, no. 1, pp. 1800650, 2019.
- [119] D. Fuentealba, H. Kato, M. Nishijima, G. Fukuhara, T. Mori, Y. Inoue, and C. Bohne, "Explaining the Highly Enantiomeric Photocyclodimerization of 2-Anthracenecarboxylate Bound to Human Serum Albumin Using Time-Resolved Anisotropy Studies," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 135, no. 1, pp. 203-209, 2013/01/09, 2013.
- [120] H. Tang, D. Fuentealba, Y. H. Ko, N. Selvapalam, K. Kim, and C. Bohne, "Guest Binding Dynamics with Cucurbit[7]uril in the Presence of

Cations," *Journal of the American Chemical Society,* vol. 133, no. 50, pp. 20623-20633, 2011/12/21, 2011.

- [121] S. Nonell, and S. E. Braslavsky, "[4] Time-resolved singlet oxygen detection," *Methods in Enzymology*, pp. 37-49: Academic Press, 2000.
- [122] N. Macia, V. Kabanov, M. Côté-Cyr, and B. Heyne, "Roles of Near and Far Fields in Plasmon-Enhanced Singlet Oxygen Production," *The Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 10, no. 13, pp. 3654-3660, 2019/07/05, 2019.
- [123] V. Kabanov, S. Ghosh, J. F. Lovell, and B. Heyne, "Singlet oxygen partition between the outer-, inner- and membrane-phases of photo/chemotherapeutic liposomes," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 21, no. 45, pp. 25054-25064, 2019.
- [124] F. Wilkinson, W. P. Helman, and A. B. Ross, "Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution," *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 22, no. 1, pp. 113-262, 1993/01/01, 1993.
- [125] S. J. Atherton, and A. Harriman, "Photochemistry of intercalated methylene blue: photoinduced hydrogen atom abstraction from guanine and adenine," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 115, no. 5, pp. 1816-1822, 1993/03/01, 1993.
- [126] C.-C. Chang, Y.-T. Yang, J.-C. Yang, H.-D. Wu, and T. Tsai, "Absorption and emission spectral shifts of rose bengal associated with DMPC liposomes," *Dyes and Pigments*, vol. 79, no. 2, pp. 170-175, 2008/11/01/, 2008.
- [127] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1, pp. 55-63, 1983/12/16/, 1983.
- [128] M. F. Bean, and S. A. Carr, "Characterization of disulfide bond position in proteins and sequence analysis of cystine-bridged peptides by

tandem mass spectrometry," *Anal Biochem,* vol. 201, no. 2, pp. 216-26, Mar, 1992.

- [129] C. H. Sohn, J. Gao, D. A. Thomas, T.-Y. Kim, W. A. Goddard Iii, and J.
 L. Beauchamp, "Mechanisms and energetics of free radical initiated disulfide bond cleavage in model peptides and insulin by mass spectrometry," *Chemical Science*, vol. 6, no. 8, pp. 4550-4560, 2015.
- [130] K. G. Das, P. T. Funke, and A. K. Bose, "Mass Spectral Studies. III. Fragmentation of Aromatic Amides," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 86, no. 18, pp. 3729-3732, 1964/09/01, 1964.
- [131] T. D. W. Claridge, "Preface," High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry (Third Edition), T. D. W. Claridge, ed., pp. ix-x, Boston: Elsevier, 2016.
- [132] R. Zondervan, F. Kulzer, M. A. Kol'chenk, and M. Orrit, "Photobleaching of Rhodamine 6G in Poly(vinyl alcohol) at the Ensemble and Single-Molecule Levels," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 108, no. 10, pp. 1657-1665, 2004/03/01, 2004.
- [133] C. Carlsen, and H. Stapelfeldt, "Light sensitivity of elderberry extract. quantum yields for photodegradation in aqueous solution," *Food Chemistry*, vol. 60, no. 3, pp. 383-387, 1997/11/01/, 1997.
- [134] T. T. Tasso, J. C. Schlothauer, H. C. Junqueira, T. A. Matias, K. Araki,
 É. Liandra-Salvador, F. C. T. Antonio, P. Homem-de-Mello, and M. S. Baptista, "Photobleaching Efficiency Parallels the Enhancement of Membrane Damage for Porphyrazine Photosensitizers," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 141, no. 39, pp. 15547-15556, 2019/10/02, 2019.
- [135] R. N. Dsouza, U. Pischel, and W. M. Nau, "Fluorescent Dyes and Their Supramolecular Host/Guest Complexes with Macrocycles in Aqueous Solution," *Chemical Reviews*, vol. 111, no. 12, pp. 7941-7980, 2011/12/14, 2011.

- [136] A. L. Koner, and W. M. Nau, "Cucurbituril Encapsulation of Fluorescent Dyes," *Supramolecular Chemistry*, vol. 19, no. 1-2, pp. 55-66, 2007/03/01, 2007.
- [137] W. M. Nau, and J. Mohanty, "Taming fluorescent dyes with cucurbituril," *International Journal of Photoenergy*, vol. 7, pp. 568352, 1900/01/01, 2005.
- [138] J. Mohanty, N. Barooah, and A. C. Bhasikuttan, "Effect of Confinement on the Physicochemical Properties of Chromophoric Dyes/Drugs with Cucurbit[n]uril: Prospective Applications," *Chemical Reactivity in Confined Systems*, pp. 371-393, 2021/08/23, 2021.
- [139] R. M. Valentine, K. Ibbotson Sh Fau Wood, C. T. A. Wood K Fau -Brown, H. Brown Ct Fau - Moseley, and H. Moseley, "Modelling fluorescence in clinical photodynamic therapy," no. 1474-9092 (Electronic).
- [140] A. Juzeniene, J. Peng Q Fau Moan, and J. Moan, "Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis," no. 1474-905X (Print), 2007.
- [141] E. I. Alarcon, M. González-Béjar, P. Montes-Navajas, H. Garcia, E. A. Lissi, and J. C. Scaiano, "Unexpected solvent isotope effect on the triplet lifetime of methylene blue associated to cucurbit[7]uril," *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 11, no. 2, pp. 269-273, 2012.
- [142] S. S. Braga, "Cyclodextrins: Emerging Medicines of the New Millennium," *Biomolecules,* vol. 9, no. 12, pp. 801, 2019.
- [143] M. Ilanchelian, C. Retna Raj, and R. Ramaraj, "Spectral Studies on the Cyclodextrin Inclusion Complexes of Toluidine Blue O and Meldola's Blue in Aqueous Solution," *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, vol. 36, no. 1, pp. 9-20, 2000/01/01, 2000.
- [144] K. I. Assaf, and W. M. Nau, "Chapter 4 Cucurbituril Properties and the Thermodynamic Basis of Host–Guest Binding," *Cucurbiturils and Related Macrocycles*, pp. 54-85: The Royal Society of Chemistry, 2020.

- [145] D. K. Sriramulu, S. Wu, and S.-G. Lee, "Effect of ligand torsion number on the AutoDock mediated prediction of protein-ligand binding affinity," *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 83, pp. 359-365, 2020/03/25/, 2020.
- [146] C. Márquez, R. R. Hudgins, and W. M. Nau, "Mechanism of Host–Guest Complexation by Cucurbituril," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, no. 18, pp. 5806-5816, 2004/05/01, 2004.
- [147] E. Hopkins, T. Sanvictores, and S. Sharma, "Physiology, Acid Base Balance. BTI StatPearls," 2021.
- [148] M. M. Wu, J. Llopis, S. Adams, J. M. McCaffery, M. S. Kulomaa, T. E. Machen, H.-P. H. Moore, and R. Y. Tsien, "Organelle pH studies using targeted avidin and fluorescein–biotin," *Chemistry & Biology*, vol. 7, no. 3, pp. 197-209, 2000/03/01/, 2000.
- [149] T. Hasegawa, Y. Kondo, Y. Koizumi, T. Sugiyama, A. Takeda, S. Ito, and F. Hamada, "A highly sensitive probe detecting low pH area of HeLa cells based on rhodamine B modified β-cyclodextrins," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 17, no. 16, pp. 6015-6019, 2009/08/15/, 2009.
- [150] J. Bonanata, L. Turell, L. Antmann, G. Ferrer-Sueta, S. Botasini, E. Mendez, B. Alvarez, and E. L. Coitino, "The thiol of human serum albumin: Acidity, microenvironment and mechanistic insights on its oxidation to sulfenic acid," *Free Radic Biol Med*, vol. 108, pp. 952-962, Jul, 2017.
- [151] J. Robinson-Duggon, N. Pizarro, G. Gunther, D. Zúñiga-Núñez, A. M. Edwards, A. Greer, and D. Fuentealba, "Fatty Acid Conjugates of Toluidine Blue O as Amphiphilic Photosensitizers: Synthesis, Solubility, Photophysics and Photochemical Properties[†]," *Photochemistry and Photobiology*, vol. n/a, no. n/a, 2020.
- [152] P. R. Ogilby, and C. S. Foote, "Chemistry of singlet oxygen. 42. Effect of solvent, solvent isotopic substitution, and temperature on the lifetime

of singlet molecular oxygen (1.DELTA.g)," *Journal of the American Chemical Society,* vol. 105, no. 11, pp. 3423-3430, 1983/06/01, 1983.

- [153] I. Kruk, "Detection of Oxygen Species and Singlet Oxygen," *Environmental Toxicology and Chemistry of Oxygen Species*, I. Kruk, ed., pp. 59-86, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998.
- [154] L. Turell, M. Steglich, M. J. Torres, M. Deambrosi, L. Antmann, C. M. Furdui, F. J. Schopfer, and B. Alvarez, "Sulfenic acid in human serum albumin: Reaction with thiols, oxidation and spontaneous decay," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 165, pp. 254-264, 2021/03/01/, 2021.
- [155] M. J. Davies, "Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 305, no. 3, pp. 761-770, 2003/06/06/, 2003.
- [156] S. Carballal, B. Alvarez, L. Turell, H. Botti, B. A. Freeman, and R. Radi,
 "Sulfenic acid in human serum albumin," *Amino Acids*, vol. 32, no. 4, pp. 543-551, 2007/05/01, 2007.
- [157] C. Albrecht, "Joseph R. Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 390, no. 5, pp. 1223-1224, 2008/03/01, 2008.
- [158] M. R. Hamblin, and P. Mróz, "Advances in photodynamic therapy basic, translational, and clinical," 2008.
- [159] Z. Li, S. Sun, Z. Yang, S. Zhang, H. Zhang, M. Hu, J. Cao, J. Wang, F. Liu, F. Song, J. Fan, and X. Peng, "The use of a near-infrared RNA fluorescent probe with a large Stokes shift for imaging living cells assisted by the macrocyclic molecule CB7," *Biomaterials*, vol. 34, no. 27, pp. 6473-6481, 2013/09/01/, 2013.
- [160] G. Hettiarachchi, D. Nguyen, J. Wu, D. Lucas, D. Ma, L. Isaacs, and V. Briken, "Toxicology and Drug Delivery by Cucurbit[n]uril Type Molecular Containers," *PLOS ONE*, vol. 5, no. 5, pp. e10514, 2010.
- [161] V. D. Uzunova, C. Cullinane, K. Brix, W. M. Nau, and A. I. Day, "Toxicity of cucurbit[7]uril and cucurbit[8]uril: an exploratory in vitro and in vivo

study," *Organic & Biomolecular Chemistry,* vol. 8, no. 9, pp. 2037-2042, 2010.

- [162] S. S. Siddiqui, Z. K. Siddiqui, and A. B. Malik, "Albumin endocytosis in endothelial cells induces TGF-β receptor II signaling," *American Journal* of *Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 286, no. 5, pp. L1016-L1026, 2004/05/01, 2004.
- [163] E. N. Hoogenboezem, and C. L. Duvall, "Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 130, pp. 73-89, 2018.
- [164] S. Wang, S. Liu, Y. Zhang, J. He, D. H. Coy, and L. Sun, "Human Serum Albumin (HSA) and Its Applications as a Drug Delivery Vehicle," *Health Science Journal*, vol. 14, no. 2, pp. 1-8, 2020, 2020.
- [165] M.-X. Zhao, J.-L. Wen, L. Wang, X.-P. Wang, and T.-S. Chen, "Intracellular catalase activity instead of glutathione level dominates the resistance of cells to reactive oxygen species," *Cell stress & chaperones*, vol. 24, no. 3, pp. 609-619, 2019.
- [166] H. Xiang, H. Chen, H. P. Tham, S. Z. F. Phua, J.-G. Liu, and Y. Zhao, "Cyclometalated Iridium(III)-Complex-Based Micelles for Glutathione-Responsive Targeted Chemotherapy and Photodynamic Therapy," ACS Applied Materials & Interfaces, vol. 9, no. 33, pp. 27553-27562, 2017/08/23, 2017.
- [167] A. A.-O. Bansal, and M. A.-O. X. Simon, "Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance," no. 1540-8140 (Electronic), 2018.
- [168] P. A. Szijj, C. Bahou, and V. Chudasama, "Minireview: Addressing the retro-Michael instability of maleimide bioconjugates," *Drug Discovery Today: Technologies*, vol. 30, pp. 27-34, 2018/12/01/, 2018.
- [169] Y. Zhang, X. Zhou, Y. Xie, M. M. Greenberg, Z. Xi, and C. Zhou, "Thiol Specific and Tracelessly Removable Bioconjugation via Michael

Addition to 5-Methylene Pyrrolones," *Journal of the American Chemical Society,* vol. 139, no. 17, pp. 6146-6151, 2017/05/03, 2017.

- [170] M. E. B. Smith, M. B. Caspersen, E. Robinson, M. Morais, A. Maruani, J. P. M. Nunes, K. Nicholls, M. J. Saxton, S. Caddick, J. R. Baker, and V. Chudasama, "A platform for efficient, thiol-stable conjugation to albumin's native single accessible cysteine," *Organic & Biomolecular Chemistry*, vol. 13, no. 29, pp. 7946-7949, 2015.
- [171] C. Tao, Y. J. Chuah, C. Xu, and D.-A. Wang, "Albumin conjugates and assemblies as versatile bio-functional additives and carriers for biomedical applications," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 7, no. 3, pp. 357-367, 2019.

ANEXOS

Anexo 1. Volumen de las cajas utilizadas para los cálculos de acoplamiento molecular.

Acoplamiento	Volumen (x,y,z)
TBO@CB[7]	40, 40, 50
TBOPDP@CB[7]	60, 40, 60
TBOEMC@CB[7]	60, 40, 60



Anexo 2. Espectro de masa de derivado TBOPDP tomado en el UHPLC-MS/MS. Se empleó como fase móvil Metanol:Ácido fórmico (100:0.1) y como fase estacionaria una columna fase reversa C18.



Anexo 3. Primer fragmento detectado del derivado TBOPDP. Se empleó como fase móvil Metanol:Ácido fórmico (100:0.1) y como fase estacionaria una columna fase reversa C18.



Anexo 4. Segundo fragmento detectado del derivado TBOPDP. Se empleó como fase móvil Metanol:Ácido fórmico (100:0.1) y como fase estacionaria una columna fase reversa C18.



Anexo 5. Cromatograma obtenido del UHPLC del TBO usando como fase móvil Metanol:Ácido fórmico (100:0.1) y como fase estacionaria una columna fase reversa C18.



Anexo 6. Cromatograma obtenido del UHPLC del TBOPDP usando como fase móvil Metanol:Ácido fórmico (100:0.1) y como fase estacionaria una columna fase reversa C18.



Anexo 7. Espectro ¹H RMN del TBO. ¹H RMN (400 MHz, Metanol-d₃) δ 7.90-7.71 (m, 2H), 7.42 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 3.36 (s, 6H), 2.29 (d, *J* = 30.0 Hz, 3H).



Anexo 8. Espectro ¹H RMN del SPDP. ¹H RMN (400 MHz, Metanol-d₃) δ 8.43 (d, J=4.8 Hz, 1H), 7.86 (m, 2H), 7.23 (t, J=5.7 Hz, 1H), 3.16 (t, J=6.3 Hz, 2H), 3.08 (t, J=6.5 Hz, 2H), 2.85 (s, 4H).


4'

6

Anexo 9. Espectro ¹H RMN del EMCS. ¹H RMN (400 MHz, Metanol-d₃) δ 6.79 (s, 2H), 3.51 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.84 (s, 4H), 2.62 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.41 (m, 2H).



Anexo 10. Ampliación de la comparación de la región alifática del espectro de RMN ¹H del derivado TBOPDP con sus dos precursores TBO y SPDP en CD₃OH.



Anexo 11. Ampliación de la comparación de la región aromática del espectro de RMN ¹H del derivado TBOPDP con sus dos precursores TBO y SPDP en CD₃OH.



Anexo 12. Espectro ¹³C RMN del TBOPDP. ¹³C RMN (100 MHz, metanol-d₃) δ 17.9, 35.7, 37.6, 40.5, 113.1, 117.0, 121.2, 122.4, 125.1, 125.9, 126.8, 127.2, 127.4, 131.3, 134.4, 137.9, 138.3, 139.2, 143.5, 150.4, 161.2, 173.1.



Anexo 13. Espectro de masa del derivado TBOEMC tomado en el UHPLC-MS/MS. Se empleó como fase móvil Metanol:Ácido fórmico (100:0.1) y como fase estacionaria una columna fase reversa C18.



Anexo 14. Fragmento detectado del derivado TBOEMC. Se empleó como fase móvil Metanol:Ácido fórmico (100:0.1) y como fase estacionaria una columna fase reversa C18.



Anexo 15. Cromatograma obtenido del UHPLC del TBOEMC usando como fase móvil Metanol:Ácido fórmico (100:0.1) y como fase estacionaria una columna fase reversa C18.





Anexo 16. Ampliación de la comparación de la región alifática del espectro de RMN ¹H del derivado TBOEMC con sus dos precursores TBO y EMCS en CD₃OH.



Anexo 17. Ampliación de la comparación de la región aromática del espectro de RMN ¹H del derivado TBOEMC con sus dos precursores TBO y EMCS en CD₃OH.



Anexo 18. Espectro ¹³C RMN del TBOEMC. ¹³C RMN (100 MHz, metanol-d₃) δ 17.41, 25.42,27.45, 29.18, 34.68, 38.44, 41.50, 106.89, 108.43, 119.93, 122.47, 127.62, 131.45, 135.44, 136.48, 137.50, 139.52, 155.57, 158.09, 172.57, 177.36.

Anexo 19. Comparación de los máximos de absorción y emisión de los derivados (TBOPDP y TBOEMC), complejos (TBOPDP@CB[7] y TBOEMC@CB[7]), conjugados (HSA-TBOPDP y HSA-TBOEMC), complejos biosupramoleculares (HSA-TBOPDP@CB[7] y HSA-TBOEMC@CB[7]) y su precursor TBO en acetonitrilo y buffer fosfato 10 mM pH 7.0.

Fotosensibilizador	λ _{abs} / nm		λ _{em} / nm	
	Acetonitrilo	Buffer Fosfato	Acetonitrilo	Buffer Fosfato
ТВО	626 nm	636 nm	658 nm	664 nm
TBOPDP	550 nm	609 nm	623 nm	651 nm
TBOEMC	544 nm	610 nm	626 nm	656 nm
TBO@CB7	-	631 nm	-	655 nm
TBOPDP@CB7	-	608 nm	-	646 nm
TBOEMC@CB7	-	609 nm	-	648 nm
HSATBOPDP	-	595 nm	-	645 nm
HSATBOEMC	-	600 nm	-	646 nm
HSA-TBOPDP@CB[7]	-	595 nm	-	643 nm
HSA-TBOEMC@CB[7]	-	600 nm	-	645 nm



Anexo 20. Fotodegradación del TBO(Azul), TBOPDP(Violeta), TBOEMC (Magenta) en solución buffer fosfato. Irradiado a 618 nm.



Anexo 21. Cinética de reacción entre la HSA y el TBOPDP monitoreada por 1 hora a 343 nm.



Anexo 22. Espectro de dicroísmo celular normalizado para la HSA (rojo), HSA-TBOPDP (verde) y HSA-TBOEMC (azul) en solución buffer fosfato 50 mM pH 7.0.

Fotosensibilizador	τ ₁ (ns) / A ₁	τ ₂ (ns) / A ₂	$< \tau_{\rm F} >$	χ ²		
	Acetonitrilo					
TBO	0.56	0.78	0.62	0.983		
	(74.6%)	(25.4%)				
TBOPDP	0.87	3.80	1.57	1.101		
	(76.2%)	(23.8%)				
TBOEMC	0.99	2.46	1.04	1.133		
	(96.4%)	(3.6%)				
	Buffer					
TBO	0.26		0.26	1.211		
	(100%)					
TBOPDP	0.31		0.31	1.048		
	(100%)					
TBOEMC	0.30		0.47	1.132		
	(100%)					
	. ,					

Anexo 23. Tiempos de vida de fluorescencia para el TBO, TBOPDP y TBOEMC obtenidos en atmósfera inerte.



Anexo 24. Señal de fosforescencia resuelta en el tiempo de ¹O₂ obtenida en acetonitrilo a 1270 nm de: a) TBO (negro, izquierda), TBOPDP (negro, centro), TBOEMC (negro, derecha) y su correspondiente ajuste (azul). b) Graficas residuales obtenidas de los ajustes.



Anexo 25. Señal de fosforescencia resuelta en el tiempo de ¹O₂ obtenida en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 a 1270 nm de: a) TBO (negro, izquierda), TBOPDP (negro, centro), TBOEMC (negro, derecha) y su correspondiente ajuste (azul).
b) Graficas residuales obtenidas de los ajustes.



Anexo 26. Señal de fosforescencia resuelta en el tiempo de ¹O₂ obtenida en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 a 1270 nm de: a) TBO@CB[7] (negro, izquierda), TBOPDP@CB[7] (negro, centro), TBOEMC@CB[7] (negro, derecha) y su correspondiente ajuste (azul). b) Graficas residuales obtenidas de los ajustes.



Anexo 27. Señal de fosforescencia resuelta en el tiempo de ¹O₂ obtenida en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 a 1270 nm de: a) HSA-TBOPDP (negro, izquierda), HSA-TBOEMC (negro, derecha) y su correspondiente ajuste (azul). b) Graficas residuales obtenidas de los ajustes.



Anexo 28. Señal de fosforescencia resuelta en el tiempo de ¹O₂ obtenida en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 a 1270 nm de: a) HSA-TBOPDP@CB[7] (negro, izquierda), HSA-TBOEMC@CB[7] (negro, derecha) y su correspondiente ajuste (azul). b) Graficas residuales obtenidas de los ajustes.



Anexo 29. Intensidad de la señal de fosforescencia resuelta en el tiempo de ${}^{1}O_{2}$ a 1270 nm de: a) rosa de bengala (pendiente= 24905 ±352.5), b) TBO (pendiente= 14964 ±282.7), c) TBOPDP (pendiente= 25639 ±343.5), d) TBOEMC (pendiente= 26643 ±208.4), obtenida en acetonitrilo a diferentes concentraciones.



b)

Anexo 30. Intensidad de la señal de fosforescencia resuelta en el tiempo de ${}^{1}O_{2}$ a 1270 nm de: a) rosa de bengala (pendiente= 17405 ± 239), b) TBO (pendiente= 3058 ±144.9), c) TBOPDP (pendiente= 2803 ±81.36), d) TBOEMC (pendiente= 3910 ±190.2), obtenida en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 a diferentes concentraciones.



Anexo 31. Intensidad de la señal de fosforescencia resuelta en el tiempo de ${}^{1}O_{2}$ a 1270 nm de: a) TBO@CB[7] (pendiente= 3917 ±147.6), b) TBOPDP@CB[7] (pendiente= 4359 ±96.78), c) TBOEMC@CB[7] (pendiente= 4363 ±228.9), obtenida en buffer fosfato 10 mM pH 7.0 a diferentes concentraciones.



Anexo 32. Controles de la fototoxicidad de los diferentes vehículos como HSA y CB[7] en las concentraciones utilizadas en este trabajo. Cada sistema fue incorporado e irradiado durante 90 minutos. Las barras oscuras corresponden a los controles de cada sistema en oscuro y las barras violetas a las muestras irradiadas.