



Universidad de Panamá

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

Escuela de Química

**Estudio de la Encapsulación Supramolecular de un
Derivado del Azul de Toluidina en Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo, su Efecto
Fotosensibilizador y Asociación con la Albúmina de Suero Humano.**

Director de tesis:

Dr. José Robinson Duggon

Elaborado por:

Melannie García

8-985-669

Trabajo de Graduación para optar por el título de

Licenciada en Química

Panamá, junio de 2024

Estudio de la Encapsulación Supramolecular de un
Derivado del Azul de Toluidina en Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo, su Efecto
Fotosensibilizador y Asociación con la Albúmina de Suero Humano.

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN QUÍMICA

PRESENTADO POR:

Melannie García

APROBADO POR:

José Luis Robinson Duggon _____

Mario Miranda Montenegro _____

Marcos Salazar _____

Carlos Ríos _____

PANAMÁ

2024

A mi madre, Yamilka Sánchez

A mi abuela, Adela Alvarado

A mi madrina, Ruthy Galástica

Agradecimientos

Extiendo mis mayores agradecimientos a Dios, por acompañarme y permitirme llegar hasta este momento, por todas las bendiciones que me ha dado y la salud que mantengo.

Agradezco a la Universidad de Panamá, la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología y a la Escuela de Química por proporcionar las bases para mi formación científica. Agradezco al Departamento de Bioquímica por brindarme las instalaciones y el café para la realización de esta investigación. Agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado, el laboratorio de Bioorgánica Tropical, al Laboratorio de Calidad de Agua y Aire y al Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos por proporcionar la oportunidad, fondos y equipos a disposición de su utilización.

Agradezco a la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación y al Sistema Nacional de Investigación por el financiamiento al proyecto de investigación número PFID-FID-2021-189 del que forma parte mi tesis.

Agradezco a mi asesor de tesis, el Dr. José Luis Robinson Duggon por guiarme, aconsejarme, animarme en cada paso, consolarme e inspirarme en mi formación como investigadora. Agradezco a Mario Miranda por siempre contar con su apoyo y enseñanzas.

Agradezco a Whitney Querini, Jennifer Otero y Octavio Samudio por sus enseñanzas y compañía en la realización de la tesis.

Agradezco a Cristian Maldonado por su apoyo incondicional, por siempre animarme y creer en mí.

Agradezco a Andrea García por su gran apoyo y fiel compañía desde que tengo memoria.

Agradezco a Yamilka Sánchez, esta tesis es parte de todo su amor, sacrificio, apoyo y consejo hacia mí.

Agradezco a Melannie García por su perseverancia.

Índice general

Índice de tablas-----	IV
Índice de figuras-----	V
Resumen -----	IX
Capítulo I. Introducción-----	1
1.1. El cáncer: Enfermedad e impacto -----	2
1.2. El cáncer en Panamá -----	2
1.3. Terapia Fotodinámica del cáncer-----	3
1.4. El mecanismo fotofísico -----	4
1.5. El oxígeno singulete y las especies reactivas de oxígeno (ERO) -----	6
1.6. Los fotosensibilizadores (PS) -----	6
1.7. El Azul de toluidina (TBO ⁺) -----	8
1.7.1. Derivados desmetilados del Azul de toluidina (TBO ⁺)-----	9
1.8. El cucurbit[7]urilo en el transporte de fármacos y la terapia fotodinámica ----	10
1.9. La Albúmina de suero humano (HSA) y su rol en el desarrollo de la TFD -----	11
1.9.1. El uso de bloqueadores en el estudio asociativo con la HSA-----	12
1.10. Objetivos-----	14
1.10.1. Objetivo general-----	14
1.10.2. Objetivos específicos-----	14
1.11. Hipótesis de trabajo -----	14
Capítulo II. Metodología -----	15
2.1. Síntesis y caracterización fotoquímica del derivado mono desmetilado (d-TBO ⁺) del Azul de toluidina. -----	16
2.1.1. Purificación del Azul de toluidina -----	16

2.1.2.	Síntesis de los derivados desmetilados -----	16
2.1.3.	Purificación de los derivados desmetilados-----	16
2.1.4.	Determinación de la abundancia relativa-----	17
2.1.5.	Determinación del rendimiento cuántico de fotoluminiscencia -----	17
2.2.	Determinación de la asociación del derivado mono desmetilado (d-TBO ⁺) del Azul de toluidina con el CB[7] y CB[8]. -----	18
2.2.1.	Titulación espectrofotométrica del CB[7] y CB[8] -----	18
2.2.2.	Encapsulación supramolecular del fotosensibilizador en CB[7] y CB[8] --	18
2.2.3.	Determinación de la constante de asociación con CB[7] y CB[8] -----	18
2.2.4.	Determinación indirecta de oxígeno singulete -----	19
2.3.	Determinación de la constante y sitio de asociación de los derivados desmetilados del Azul de toluidina con la Albúmina de Suero Humano.-----	19
2.3.1.	Asociación espectrofotométrica de los fotosensibilizadores con la Albúmina de suero humano-----	19
2.3.2.	Determinación de la constante de Stern-Volmer de los fotosensibilizadores con la Albúmina de suero humano -----	19
2.3.3.	Asociación competitiva utilizando marcadores en el sitio de unión con la Albúmina de suero humano -----	20
2.3.4.	Fotooxidación de la Albúmina de suero humano por el d-TBO ⁺ -----	21
2.3.5.	Electroforesis con la Albúmina de suero humano irradiada-----	21
Capítulo III.	Resultados y discusión -----	22
3.1.	Síntesis y caracterización fotoquímica del derivado mono desmetilado (d-TBO ⁺) del Azul de toluidina.-----	23
3.1.1.	Purificación del Azul de toluidina -----	23
3.1.2.	Síntesis de los derivados desmetilados -----	24
3.1.3.	Purificación de los derivados desmetilados-----	28

3.1.4.	Determinación del rendimiento cuántico de fotoluminiscencia -----	36
3.2.	Determinación de la asociación del derivado mono desmetilado (d-TBO ⁺) del Azul de toluidina con el CB[7]. -----	43
3.2.1.	Titulación espectrofotométrica del CB[7] y CB[8] -----	43
3.2.2.	Encapsulación supramolecular del fotosensibilizador en CB[7] y CB[8] --	46
3.2.3.	Determinación de la constante de asociación con CB[7] y CB[8] -----	53
3.2.4.	Determinación indirecta del oxígeno singulete -----	54
3.3.	Determinación de la constante y sitio de asociación de los derivados desmetilados del Azul de toluidina con la Albúmina de Suero Humano.-----	61
3.3.1.	Asociación espectrofotométrica de los fotosensibilizadores con la Albúmina de suero humano-----	61
3.3.2.	Determinación de la constante de Stern-Volmer de los fotosensibilizadores con la Albúmina de Suero Humano -----	65
3.3.3.	Asociación competitiva utilizando marcadores en el sitio de unión con la Albúmina de suero humano -----	68
3.3.4.	Fotooxidación de la Albúmina de suero humano por el d-TBO ⁺ -----	72
3.3.5.	Electroforesis con la Albúmina de suero humano irradiada-----	72
Capítulo IV. Conclusiones -----		77
Recomendaciones-----		79
Bibliografía -----		80

Índice de tablas

Tabla 1. Condiciones de la Espectrometría de Masas (ESI ⁺) -----	17
Tabla 2. Componentes de geles separadores según su concentración. -----	21
Tabla 3. Máximos de absorción del d-TBO ⁺ en diferentes disolventes para la evaluación del efecto solvatocrómico. -----	36
Tabla 4. Resumen de rendimientos cuántico de fotoluminiscencia -----	40
Tabla 5. Máximos de absorción y emisión del d-TBO ⁺ en los complejos de inclusión en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7 -----	47
Tabla 6. Resumen de los iones moleculares de los complejos de inclusión del d-TBO ⁺ con CB[7] y CB[8]. -----	52
Tabla 7. Valores obtenidos con el software <i>Scientist</i> para las constantes de asociación del d-TBO ⁺ con CB[7] y CB[8]. -----	54
Tabla 8. Constantes de asociación de HSA con TBO ⁺ , d-TBO ⁺ y dd-TBO ⁺ -----	68
Tabla 9. Constantes de asociación de HSA con TBO ⁺ , d-TBO ⁺ y dd-TBO ⁺ en presencia de warfarina 10 μM-----	70

Índice de figuras

Figura 1. Terapia fotodinámica. -----	4
Figura 2. Diagrama de Jablonski para procesos fotofísicos relevantes para la terapia fotodinámica (Mariño-Ocampo <i>et al.</i> , 2022).-----	5
Figura 3. El TBO ⁺ y sus derivados-----	9
Figura 4. Acoplamiento molecular inducido del complejo TBOC14:HSA. -----	13
Figura 5. Espectro de absorbancia UV-Vis del TBO ⁺ purificado en acetonitrilo.-----	23
Figura 6. Espectro de masas ESI ⁺ del Azul de toluidina purificado en acetonitrilo.-----	24
Figura 7. Espectro de absorbancia UV-Vis del TBO ⁺ irradiado por 3 horas con lecturas cada 5 min hasta los 60 min y luego a 90, 120 y 180 min. -----	25
Figura 8. Espectro de absorbancia UV-Vis de la fotodegradación del TBO ⁺ irradiado por 3 horas-----	26
Figura 9. Cinética de la fotodegradación del TBO ⁺ irradiado con luz blanca por 1 hora para la síntesis del d-TBO ⁺ en acetonitrilo. -----	26
Figura 10. Espectro de masas ESI ⁺ en acetonitrilo del TBO ⁺ con 1 hora de irradiación. -	27
Figura 11. Cromatografía de capa fina del TBO ⁺ irradiado por 1 hora. -----	29
Figura 12. Cromatografía de capa fina del TBO ⁺ irradiado por 3 horas.-----	30
Figura 13. Espectro de masas ESI ⁺ del derivado mono desmetilado (d-TBO ⁺) en acetonitrilo purificado por cromatografía de capa fina. -----	31
Figura 14. Espectro de MS/MS ESI ⁺ de $m/z = 256$ en acetonitrilo. -----	32
Figura 15. Espectro de masas ESI ⁺ del derivado doblemente desmetilado (dd-TBO ⁺) en acetonitrilo purificado por cromatografía de capa fina. -----	33
Figura 16. Espectro de absorbancia UV-Vis del TBO ⁺ (línea azul), d-TBO ⁺ (línea celeste) y dd-TBO ⁺ (línea morada) purificados en acetonitrilo.-----	34

Figura 17. Espectro de emisión del TBO ⁺ (línea azul), d-TBO ⁺ (línea celeste), dd-TBO ⁺ (línea morada) purificados a 2 μM en disolución amortiguadora en fosfato 10 mM de pH 7. -----	35
Figura 18. Espectro de absorbancia UV-Vis del d-TBO ⁺ en acetonitrilo (línea celeste), disolución amortiguadora en fosfato 10 mM de pH 7 (línea verde) y metanol (línea roja). -----	35
Figura 19. Rendimiento cuántico de fotoluminiscencia del TBO ⁺ determinado con la esfera de integración.-----	37
Figura 20. Rendimiento cuántico de fotoluminiscencia del d-TBO ⁺ determinado con la esfera de integración. -----	38
Figura 21. Rendimiento cuántico de fotoluminiscencia del dd-TBO ⁺ determinado con la esfera de integración. -----	39
Figura 22. Diagrama de cromaticidad del TBO ⁺ .-----	41
Figura 23. Diagrama de cromaticidad del d-TBO ⁺ . -----	41
Figura 24. Diagrama de cromaticidad del dd-TBO ⁺ . -----	42
Figura 25. Diagrama de cromaticidad CIE 1931 con las coordenadas del TBO ⁺ , d-TBO ⁺ y dd-TBO ⁺ obtenido de Hasabeldaim <i>et al.</i> (2023). -----	43
Figura 26. Determinación de la concentración del CB[7] en Cob ⁺ en agua grado LC-MS. Recolección de los datos a la longitud de onda máxima del Cob ⁺ . -----	44
Figura 27. Titulación espectrofotométrica del CB[7] en agua grado LC-MS -----	44
Figura 28. Determinación de la concentración del CB[8] en Cob ⁺ en agua grado LC-MS. Recolección de los datos a la longitud de onda máxima del Cob ⁺ . -----	45
Figura 29. Titulación espectrofotométrica del CB[8] en agua grado LC-MS. -----	45
Figura 30. Espectro de absorbancia UV-Vis normalizada del d-TBO ⁺ y los complejos de inclusión en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7. -----	46
Figura 31. Espectro de emisión de fluorescencia del d-TBO ⁺ y los complejos de inclusión en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7. -----	47

Figura 32. Espectro de masas ESI ⁺ del curcubit[7]urilo en agua grado LC-MS.-----	48
Figura 33. Espectro de masas ESI ⁺ del d-TBO ⁺ encapsulado en curcubit[7]urilo en formando el complejo (d-TBO ⁺ @CB[7]) en agua grado LC-MS.-----	49
Figura 34. Espectro de masas ESI ⁺ del curcubit[8]urilo en agua grado LC-MS.-----	51
Figura 35. Espectro de masas ESI ⁺ del d-TBO ⁺ encapsulado en curcubit[8]urilo en formando el complejo (d-TBO ⁺ @CB[8]) en agua grado LC-MS.-----	52
Figura 36. Curva de unión del complejo d-TBO ⁺ @CB[7] en PB.-----	53
Figura 37. Curva de unión del complejo d-TBO ⁺ @CB[8] en PB.-----	54
Figura 38. Irradiación del TBO ⁺ y sus derivados con ABMA.-----	55
Figura 39. Irradiación del TBO ⁺ y sus derivados con ABMA a 30 y 60 minutos.-----	56
Figura 40. Irradiación del TBO ⁺ y sus derivados con ABMA a 30 y 60 minutos con normalización inicial-----	57
Figura 41. Fluorescencia normalizada de ABMA (1,6 μM) irradiado por 30 min con luz ámbar con d-TBO ⁺ solo y encapsulado-----	58
Figura 42. Fluorescencia normalizada de ABMA irradiado por 30 min con luz ámbar en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7 con d-TBO ⁺ y aditivos.-----	60
Figura 43. Fluorescencia normalizada de ABMA irradiado por 30 min con luz ámbar en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7 con d-TBO ⁺ @CB[7] y aditivos.-----	60
Figura 44. Fluorescencia normalizada de ABMA irradiado por 30 min con luz ámbar en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7 de d-TBO ⁺ @CB[8]-----	61
Figura 45. Espectro de absorción UV-Vis de la HSA (5 μM) con TBO ⁺ de 0 a 10 μM.-----	62
Figura 46. Espectro de absorción UV-Vis de la HSA (5 μM) con d-TBO ⁺ de 0 a 10 μM.---	63
Figura 47. Espectro de absorción UV-Vis de la HSA (5 μM) con dd-TBO ⁺ de 0 a 10 μM.	63
Figura 48. Espectro de emisión de la HSA (5 μM) con TBO ⁺ de 0 a 10 μM.-----	64
Figura 49. Espectro de emisión de la HSA (5 μM) con d-TBO ⁺ de 0 a 10 μM.-----	64
Figura 50. Espectro de emisión de la HSA (5 μM) con dd-TBO ⁺ de 0 a 10 μM.-----	65

Figura 51. Gráfica de Stern-Volmer de la HSA (5 μM) con TBO ⁺ (marcadores azules), d-TBO ⁺ (marcadores celestes) y dd-TBO ⁺ (marcadores morados) de 0 a 10 μM . -----	66
Figura 52. Gráfica de Stern-Volmer corregido de la HSA (5 μM) con TBO ⁺ (marcadores azules), d-TBO ⁺ (marcadores celestes) y dd-TBO ⁺ (marcadores morados) de 0 a 10 μM .-----	67
Figura 53. Desplazamiento de competidores con ibuprofeno. Con fluorescencia de la HSA (5 μM) por el ibuprofeno (5 μM) con TBO ⁺ (marcadores azules), d-TBO ⁺ (marcadores celestes) y dd-TBO ⁺ (marcadores morados) de 0 a 10 μM . -----	69
Figura 54. Desplazamiento de competidores con warfarina. Con fluorescencia de la HSA (5 μM) por la warfarina (5 μM) con TBO ⁺ (marcadores azules), d-TBO ⁺ (marcadores celestes) y dd-TBO ⁺ (marcadores morados) a 10 μM .-----	70
Figura 55. Gráfica de Stern-Volmer por fluorescencia de la HSA (5 μM) con warfarina de 0 a 10 μM .-----	71
Figura 56. Desplazamiento de competidores por fluorescencia de la HSA (5 μM) por la TBO ⁺ (10 μM) con warfarina de 0 a 10 μM excitando a 550 nm.-----	71
Figura 57. Fotooxidación de la HSA (5 μM) por fluorescencia en presencia de d-TBO ⁺ irradiado durante 30 min con luz ámbar.-----	72
Figura 58. Gel de poliacrilamida reductor al 12 % con HSA (5 μM) sin irradiar, HSA (5 μM) con TBO ⁺ (5 μM) a los 0 y 30 min de irradiación.-----	73
Figura 59. Gel de poliacrilamida reductor al 12 % con HSA (1,25 μM) sin irradiar, HSA (1,25 μM) con d-TBO ⁺ (5 μM) a los 0 y 30 min de irradiación. M. P. M. = marcador de peso molecular. -----	74
Figura 60. Gel de poliacrilamida reductor al 10 % con HSA (1,25 μM) sin irradiar, HSA (1,25 μM) con TBO ⁺ (10 μM) a los 0 y 30 min de irradiación. HSA (2,5 μM) sin irradiar, HSA (2,5 μM) y TBO ⁺ (10 μM) a 0 y 30 min de irradiación con luz roja.-----	75
Figura 61. Gel de poliacrilamida reductor al 10 % con HSA (1,25 μM) sin irradiar, HSA (1,25 μM) con d-TBO ⁺ (10 μM) a los 0 y 30 min de irradiación, HSA (1,25 μM) y dd-TBO ⁺ (10 μM) a 0 y 30 min de irradiación con luz ámbar.-----	76

Resumen

El cáncer es una enfermedad crónica que representa uno de los mayores retos para la medicina actual. La terapia fotodinámica (TFD) ha surgido como una estrategia prometedora en el tratamiento de esta enfermedad, combinando la administración de fotosensibilizadores (PS) y la irradiación de luz para generar especies reactivas de oxígeno (ERO) que inducen la muerte selectiva de las células cancerosas. La Albúmina de suero humano (HSA) juega un papel importante en la distribución de fármacos en el sistema circulatorio y tiene actividad antioxidante por lo que es crucial investigar la interacción de fotosensibilizadores con proteínas plasmáticas para comprender y mejorar la eficacia de la TFD.

En esta tesis se busca realizar la purificación y descripción de la fluorescencia del Azul de toluidina (TBO⁺) y sus derivados, mono (d-TBO⁺) y doblemente (dd-TBO⁺) desmetilados utilizando la Fluorescencia de Estado Estacionario, la Espectroscopía UV-Vis, la Espectrometría de Masas y Electroforesis en gel de poliacrilamida para observar sus actividades fotoquímicas al ser irradiados, teniendo como fotosensibilizador principal el d-TBO⁺, así como también, su asociación con la HSA en comparación con fármacos competidores como ibuprofeno y warfarina. Del mismo modo, explorar la encapsulación supramolecular en curcubit[7]urilo y curcubit[8]urilo del d-TBO⁺ para evaluar la generación de oxígeno singulete.

Los resultados describieron el sitio de unión con la HSA como el sitio de Sudlow I por la competitividad con la warfarina. Se determinó que el dd-TBO⁺ genera mayor cantidad de oxígeno singulete y que el d-TBO⁺ tiene mayor actividad fluorescente. El d-TBO⁺ encapsulado generó menor cantidad de oxígeno singulete, pero este confiere protección al fotosensibilizador que tiene predominantemente un mecanismo de desactivación energética tipo II estando solo y encapsulado. También se comprobó que los tres fotosensibilizadores tienen la capacidad de saturar y degradar a la HSA con las ERO generadas. Estos resultados contribuyen al desarrollo de futuras investigaciones en enfoques terapéuticos.

Capítulo I. Introducción

1.1. El cáncer: Enfermedad e impacto

El término 'cáncer' se emplea comúnmente para describir un grupo de enfermedades en las cuales las células anormales proliferan de manera descontrolada en prácticamente cualquier órgano o tejido del cuerpo. Estas células anómalas no solo exceden sus límites normales de crecimiento, sino que también, tienen la capacidad de invadir tejidos adyacentes y diseminarse a otros órganos (World Health Organization: WHO, 2019).

El 'Worldwide cancer data' estima que en el año 2020 se registraron aproximadamente 18,1 millones de casos de cáncer en todo el mundo. Según los datos, hubo 295,3 casos de cáncer por cada 100.000 personas en áreas con un alto índice de desarrollo humano, en comparación con 115,7 casos por cada 100.000 personas en áreas con bajo desarrollo humano. Además, se reportaron alrededor de 98,7 muertes por cáncer por cada 100.000 personas en regiones altamente desarrolladas, en contraste con 82,7 muertes por cada 100.000 personas en áreas menos desarrolladas (WCRF International, 2022).

Según Debela *et al.* (2021), las formas convencionales de tratar el cáncer, más recomendadas, comprenden la extirpación quirúrgica de los tumores seguida de radioterapia con rayos X y/o quimioterapia. La cirugía se considera más efectiva en las etapas iniciales de la enfermedad. Sin embargo, la radioterapia puede ocasionar daño en células, órganos y tejidos sanos. A pesar de que la quimioterapia ha disminuido tanto la morbilidad como la mortalidad, prácticamente todos los agentes quimioterapéuticos afectan a las células sanas, especialmente aquellas que tienen un rápido crecimiento y división. Mejorar los sistemas de administración de fármacos es crucial para mejorar los resultados terapéuticos.

1.2. El cáncer en Panamá

Las estadísticas muestran que el cáncer representa uno de los principales desafíos de salud en la República de Panamá, con el 17 % de todas las defunciones y ocupando el primer lugar como causa de muerte. En el país, se registra un promedio de 14 nuevos casos de cáncer al día y 7 fallecimientos relacionados con la enfermedad. El Instituto Oncológico Nacional Juan Demóstenes Arosemena atiende entre 14.000 y 16.000 pacientes al año y

realiza alrededor de 3.021 cirugías. Los tipos de cáncer más comunes en Panamá incluyen el de mama, próstata, estómago, piel, cervicouterino y colon, según datos de Fundacáncer (2020).

Según el boletín del año 2021 del Departamento de Registros y Estadísticas de Salud del Instituto Oncológico Nacional Dr. Juan Demóstenes Arosemena, se reportaron 4.811 casos de morbilidad y 562 casos de mortalidad relacionados con 26 tipos de tumores malignos.

1.3. Terapia Fotodinámica del cáncer

La terapia fotodinámica (TFD) fue la primera combinación de fármaco y dispositivo en recibir la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA por sus siglas en inglés) hace casi veinte años, sin embargo, sigue siendo poco utilizada en la práctica clínica. La TFD se compone de tres elementos esenciales: un fotosensibilizador (PS), luz y oxígeno, que inician una reacción fotoquímica que culmina en la producción de un producto altamente reactivo conocido como oxígeno singulete (1O_2). Este último puede provocar rápidamente toxicidad, lo que conduce a la muerte celular mediante apoptosis o necrosis.

La TFD se considera un procedimiento de etapa 2. Después de la administración de un fotosensibilizador (PS) sensible a la luz, se irradian los sitios tumorales con luz de una longitud de onda adecuada. La luz puede aplicarse a prácticamente cualquier órgano del cuerpo utilizando dispositivos flexibles de fibra óptica como se establece en la **Figura 1**. Ninguno de los PS aprobados clínicamente se acumula en los núcleos celulares, lo que limita el daño en el ADN que podría ser cancerígeno o dar lugar a clones resistentes (Agostinis *et al.*, 2011).

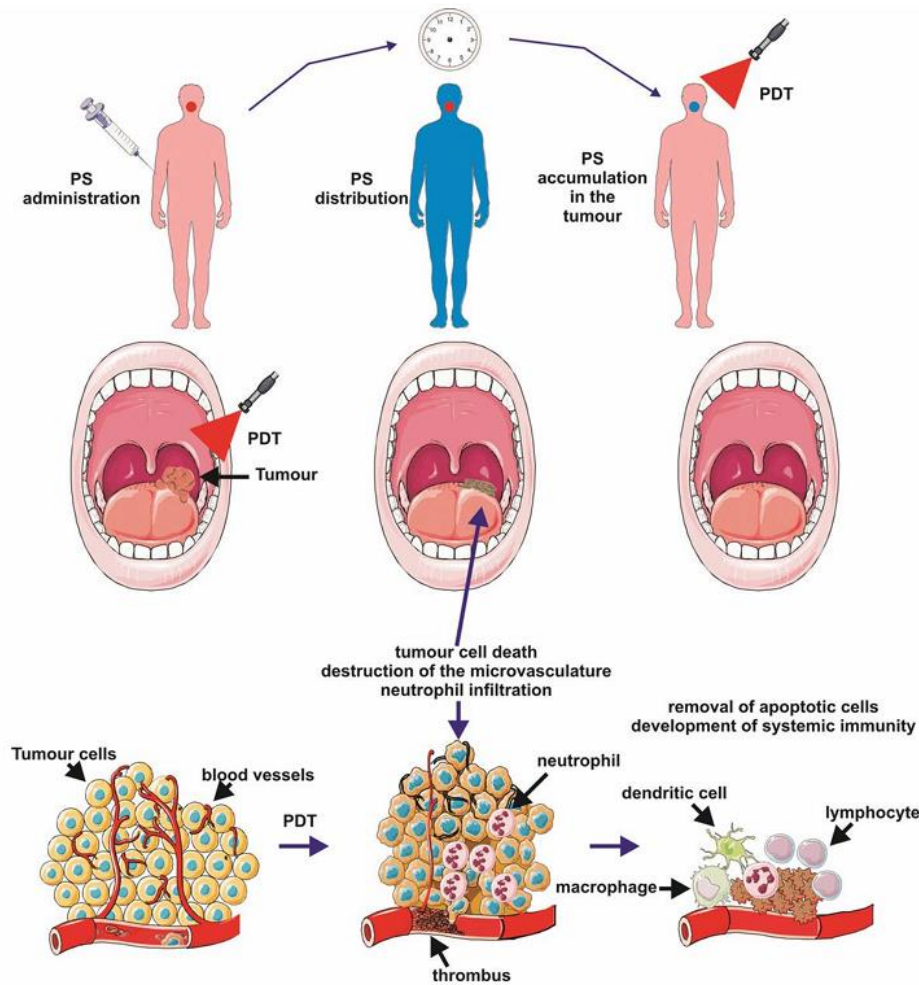


Figura 1. Terapia fotodinámica. Un fotosensibilizador (PS) se administra por vía sistémica o tópica. Después de un período de distribución sistémica, el PS se acumula selectivamente en el tumor. La irradiación activa el PS y, en presencia de oxígeno molecular, desencadena una reacción fotoquímica que culmina con la producción de oxígeno singlete (1O_2). El daño irreparable a las macromoléculas celulares conduce a la muerte de las células tumorales a través de un proceso apoptótico, necrótico o mecanismo autofágico (Agostinis *et al.*, 2011).

1.4. El mecanismo fotofísico

Cuando la luz a una longitud de onda específica incide sobre un PS, este absorbe la energía y se excita a un estado singulete de alta energía S_1 . A partir de este estado, la molécula puede retornar a su estado inicial emitiendo un fotón o fluorescencia, decaer a través de rutas no radiativas, o bien atravesar un cruce entre sistemas (ISC), lo que resulta en la generación de un estado excitado triplete T_1 , es decir, un estado excitado de vida más prolongada.

En este estado, el PS tiene la capacidad de interactuar con otras moléculas. Las reacciones más fundamentales para TFD son aquellas donde el PS interacciona con biomoléculas u oxígeno molecular. En el primer escenario según la **Figura 2**, denominado mecanismo de tipo I, la reacción ocurre principalmente a través de la transferencia de electrones a los sustratos pertinentes en presencia de ERO generadoras de oxígeno, tales como aniones radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxidos de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilos ($\bullet OH$). Por otro lado, en los mecanismos de tipo II, los fotosensibilizadores en estado excitado triplete pueden interactuar directamente con el oxígeno molecular mediante la transferencia de energía para generar oxígeno singulete (1O_2), una forma altamente reactiva de oxígeno (Robinson-Duggon, Pérez-Mora, Dibona-Villanueva, *et al.*, 2017; Hamblin, 2008).

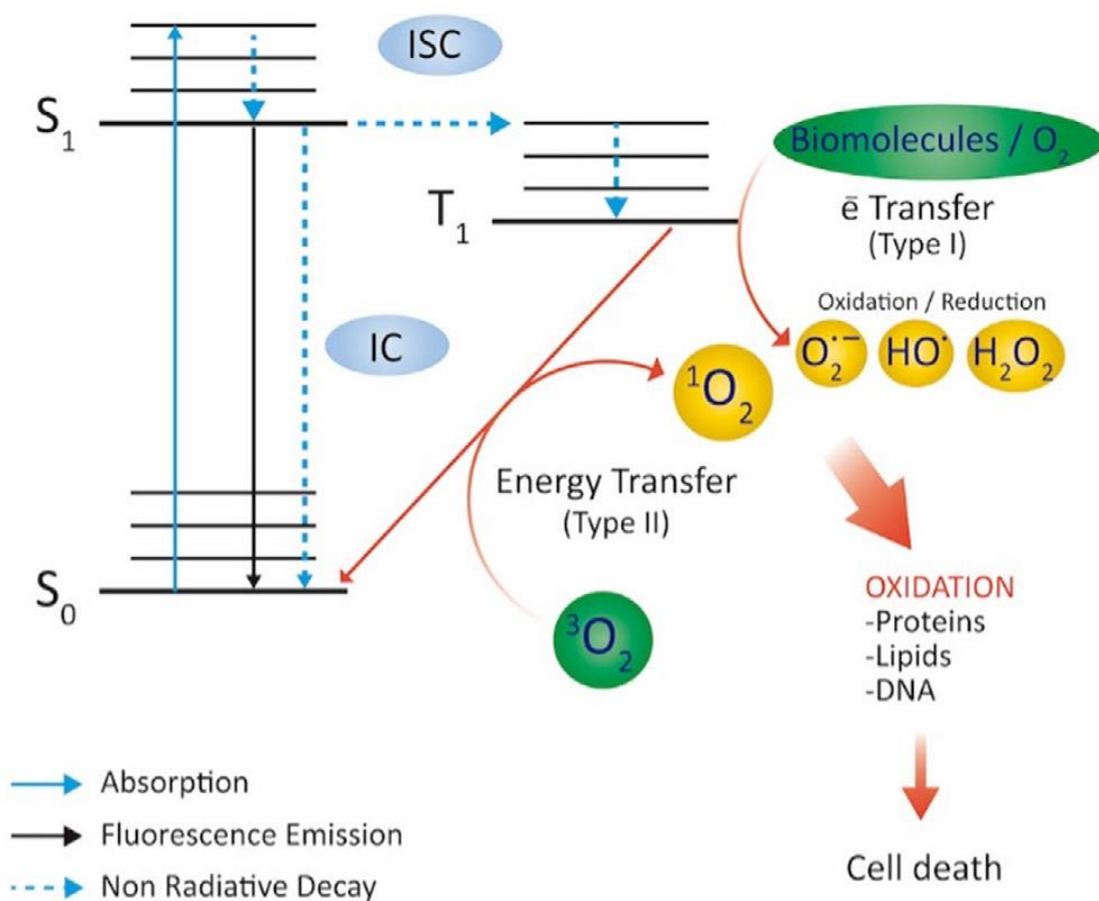


Figura 2. Diagrama de Jablonski para procesos fotofísicos relevantes para la terapia fotodinámica (Mariño-Ocampo *et al.*, 2022).

1.5. El oxígeno singulete y las especies reactivas de oxígeno (ERO)

El oxígeno singulete (1O_2) es la forma excitada del oxígeno molecular, que es menos estable que el oxígeno molecular en su estado basal. El oxígeno en su estado basal tiene dos electrones desapareados debido a dos orbitales degenerados en su orbital molecular más alto ocupado (HOMO). El oxígeno singulete se produce típicamente cuando un PS en estado excitado transfiere energía a la molécula de oxígeno. La excitación fotónica de un PS, que posee una alta tasa de cruce entre sistemas (ISC), resulta en una eficiente transferencia de energía del estado triplete acoplado al espín ($T_{1,PS} \rightarrow S_{0,PS}$) al oxígeno triplete ($T_{1,O_2} \rightarrow S_{1,O_2}$). El oxígeno singulete así generado es una forma altamente reactiva de oxígeno, que participa en reacciones redox o exhibe una débil fosforescencia en la región infrarroja (Kashyap *et al.*, 2021).

Las reacciones de tipo I y II, dependientes del oxígeno, implican la formación inicial de varias ERO. Estas reacciones, tanto de tipo I como de tipo II, incluyen la formación de ERO como; $ROO\cdot$, $RO\cdot$, $\cdot OH$, 1O_2 , $HO_2\cdot$ y $O_2^{\cdot-}$, cuya generación está condicionada por la concentración del sensibilizador, la concentración de oxígeno, así como la reactividad del sustrato y/o del disolvente (Foote, 1991; Greer, 2006; Ghogare & Greer, 2016).

El oxígeno singulete (1O_2) tiene un tiempo de vida corto, aproximadamente de 10 a 320 ns, lo que limita su capacidad de difusión hacia alrededor de 10 nm a 55 nm dentro de las células (Dysart & Patterson, 2005).

1.6. Los fotosensibilizadores (PS)

El elemento fundamental para el avance de la TFD como opción terapéutica contra el cáncer son los fármacos fotoactivos o fotosensibilizadores. La efectividad de la TFD está determinada por diversos factores, como la distribución en el organismo, la acumulación en tejidos, la toxicidad en ausencia de luz del PS y sus propiedades fotofísicas. Durante las últimas décadas, se ha dedicado una considerable atención al desarrollo de nuevos fotosensibilizadores para aplicaciones en TFD, con el objetivo de mejorar estas características fundamentales.

La mayoría de los fotosensibilizadores utilizados en la TFD del cáncer se basan en una estructura de tetrapirrol, similar a la protoporfirina presente en la hemoglobina. Un agente PS ideal debería ser un compuesto puro que permita un análisis de control de calidad con costos bajos y una buena estabilidad en almacenamiento (Agostinis *et al.*, 2011).

Según la literatura revisada, se deduce que la alta fotoestabilidad, una alta capacidad para generar ERO y una buena absorción de longitudes de onda amplias son propiedades deseables para los fotosensibilizadores (Mariño-Ocampo *et al.*, 2022b).

Las implicaciones de estas propiedades fotofísicas para la TFD son:

- Fotoestabilidad: Los fotosensibilizadores con una alta estabilidad frente a la luz son altamente deseables, ya que pueden garantizar una producción eficiente y constante de $^1\text{O}_2$ sin degradarse en productos de oxidación secundarios (Roberts *et al.*, 1989).
- Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO): La capacidad de generar estados excitados tripletes de larga duración y de alta eficiencia cuántica en la producción de $^1\text{O}_2$ contribuye a una mayor eficacia en la eliminación fotodinámica de las células cancerosas.
- Absorción a grandes longitudes de onda: En el caso de tumores que no se encuentran en la superficie, como en el cáncer de piel, y están profundamente ubicados en el organismo, es crucial que el PS pueda ser activado por la luz a través de una profundidad de penetración adecuada. Por lo tanto, para superar la absorción significativa de la melanina, proteínas, vitaminas y otras moléculas presentes en las capas superficiales de la piel, el rango fototerapéutico utilizado en la TFD de haz externo generalmente se encuentra entre los 600 y 800 nm, que coincide con la longitud de onda de absorción de los fotosensibilizadores (Dabrowski *et al.*, 2016).
- Toxicidad leve: Un PS ideal no debe ser tóxico en ausencia de luz, debería presentar una sensibilidad mínima o nula a la luz y debe acumularse selectivamente en el tejido tumoral, lo que implica una retención preferencial en el tumor, una

acumulación y una eliminación rápidas. Esto ayuda a minimizar la fototoxicidad en la piel y garantiza una acción específica en el tejido canceroso (Hamblin, 2008).

- **Distribución:** La estructura química del PS influye en su distribución, siendo particularmente beneficiosa si el PS es anfifílico (es decir, soluble en agua, pero con una matriz hidrofóbica), lo que facilita su paso a través de las membranas celulares (Hamblin, 2008).
- **Estabilidad y circulación:** Es fundamental que el PS sea estable y se pueda disolver fácilmente en disolventes inyectables para su formulación. Sin embargo, una vez administrado, el compuesto debe demostrar una alta acumulación en el tumor y una eliminación rápida del sistema circulatorio (Hamblin, 2008).
- **Obtención:** El PS debe ser químicamente puro y su obtención debe ser posible a través de una ruta sintética corta y de alto rendimiento (Hamblin, 2008).

1.7. El Azul de toluidina (TBO⁺)

El Azul de toluidina (TBO⁺) es un colorante básico tiazínico con propiedades metacromáticas, lo que significa que tiñe los tejidos ricos en ácidos nucleicos, como el ADN y el ARN, debido a su gran afinidad por los componentes ácidos de los tejidos. La estructura de este colorante en la **Figura 3** ha encontrado diversas aplicaciones, tanto como tinción vital en tejidos vivos como en técnicas de tinción especial. En particular, se ha utilizado *in vivo* para identificar displasias y carcinomas en la cavidad oral (Sridharan & Shankar, 2012).

El Azul de toluidina también actúa como un fotosensibilizador catiónico con notables propiedades fotoquímicas. Posee un alto rendimiento cuántico en la conversión entre sistemas y la generación de oxígeno singulete. Además, en presencia de agentes reductores, puede producir especies radicales (Harris *et al.*, 2004). Su baja toxicidad lo convierte en un ingrediente común en preparados farmacéuticos, y es considerado un candidato prometedor para la terapia contra el cáncer debido a su capacidad para intercalarse entre las bases del ADN, así como por su capacidad para inactivar virus en componentes sanguíneos debido a su naturaleza fotoactiva (Wagner, 2002).

Robinson-Duggon, Pérez-Mora, Dibona-Villanueva, *et al.* (2017) han reportado que el Azul de toluidina es un fotosensibilizador potente, cuyo rendimiento cuántico ($\Phi\Delta$) varía en función del pH, observándose valores más bajos en medios neutros o ácidos, con un valor de 0,18 obtenido en una disolución amortiguadora de fosfato a pH 7.

1.7.1. Derivados desmetilados del Azul de toluidina (TBO⁺)

Robinson-Duggon *et al.* (2019) establecieron que la irradiación con luz visible del Azul de toluidina (TBO⁺) en presencia de oxígeno en acetonitrilo ocasionó un cambio de color en la disolución, pasando de azul claro a violeta, lo que se manifestó mediante un cambio hipsocrómico en los máximos de absorción.

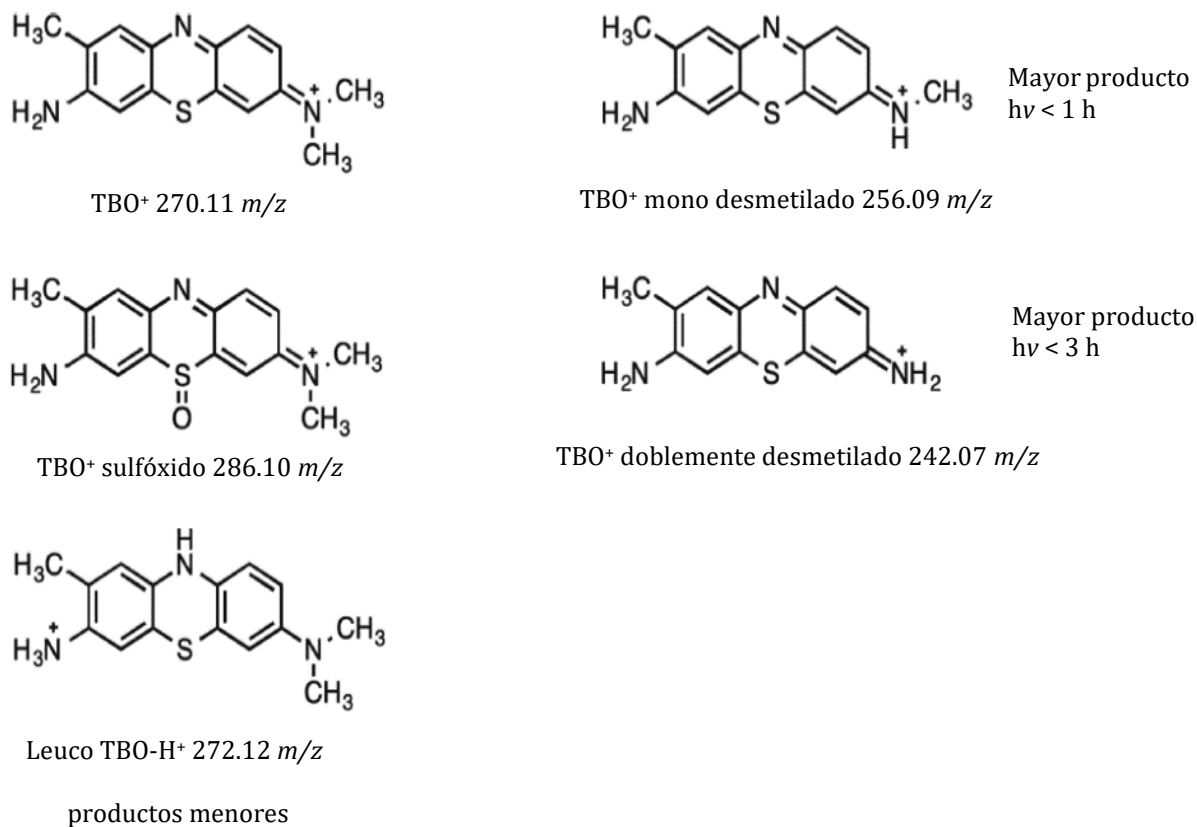


Figura 3. El TBO⁺ y sus derivados. Estructuras de compuestos asignados a señales detectadas por UHPLC-MS/MS de la fotooxidación autosensibilizada de TBO⁺ bajo irradiación con luz visible en acetonitrilo aireado (Robinson-Duggon *et al.*, 2019).

Después de la irradiación, se identificó al Azul de toluidina monodesmetilado (d-TBO⁺) como el producto principal durante una hora de irradiación, seguido de la aparición del Azul de toluidina doblemente desmetilado (dd-TBO⁺) después de tres horas de irradiación, manteniéndose estable en el tiempo y con la estructura en la **Figura 3**. También se detectaron como productos secundarios el Azul de toluidina sulfóxido y el leuco-azul de toluidina protonado. El máximo de absorción para el Azul de toluidina es de 626 nm, y después de tres horas de irradiación este disminuyó a 595 nm, lo que se atribuyó al producto doblemente desmetilado.

1.8. El cucurbit[7]urilo en el transporte de fármacos y la terapia fotodinámica

En 1981, Mock y sus colaboradores denominaron 'cucurbiturilo' al hexámero de glicolurilo macrocíclico con puente de metileno (CB[6]). Esta familia de compuestos ha crecido hasta incluir homólogos (CB[5]-CB[10]). El CB[7] es ligeramente más voluminoso y, por tanto, puede unirse a una gama más amplia de huéspedes, como una variedad de compuestos aromáticos cargados positivamente y metales, lo que sugiere el uso del CB[7] para reducir la toxicidad en el tratamiento del cáncer (Lagona *et al.*, 2005).

Los CB[n] son capaces de capturar fármacos dentro de sus cavidades hidrofóbicas con altas afinidades de unión, lo que los protege de la degradación enzimática y la desactivación (Assaf & Nau, 2015; Walker *et al.*, 2011). En los últimos años, han recibido mucha atención como posibles sistemas de administración de medicamentos (DDS por sus siglas en inglés), especialmente el CB[7] hidrosoluble (Assaf & Nau, 2015). Además, la formación de complejos con CB[7] ayuda a aumentar la solubilidad de varias moléculas de interés biológico, lo que tiene un efecto positivo en la transferencia biológica (Kuok *et al.*, 2017).

Para aplicaciones en la terapia fotodinámica, se ha señalado que los CB[n] pueden influir en las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los fotosensibilizadores incorporados (Robinson-Duggon, Pérez-Mora, Dibona-Villanueva, *et al.*, 2017b). El CB[7] aumenta el rendimiento cuántico de fluorescencia al mismo tiempo que reduce el fotoblanqueo, puede estabilizar el estado de excitación triplete, aumentando así la generación de oxígeno singlete, lo cual son características deseables para la obtención de imágenes de células *in*

vivo. El Azul de toluidina, en presencia de CB[7], aumentó el valor del rendimiento cuántico ($\Phi\Delta$) en 1,5 veces, mientras que disminuyó en 2,6 veces con la adición de CB[8]. Incluso puede activarse y desactivarse reversiblemente por competencia con un huésped biocompatible y las constantes de unión de los fotosensibilizadores (PS) basados en un núcleo de acridinio o fenotiazinio con los macrociclos se sitúan en el intervalo submicromolar, lo que permite aplicaciones terapéuticas (Montes-Navajas *et al.*, 2008; Robinson-Duggon, Pérez-Mora, Valverde-Vásquez, *et al.*, 2017).

1.9. La Albúmina de suero humano (HSA) y su rol en el desarrollo de la TFD

La albúmina sérica tiene interacciones físicas con ácidos grasos, moléculas pequeñas, iones metálicos y diversas proteínas. Esta capacidad de unirse a una amplia gama de sustancias bioactivas la convierte en una molécula de transporte esencial. Además, la albúmina tiene la capacidad de eliminar las especies reactivas de oxígeno que pueden ser dañinas para la supervivencia celular (Mishra & Heath, 2021).

La HSA es una proteína abundante en el torrente sanguíneo, con una vida media en circulación prolongada de 19 días. Se ha utilizado ampliamente como vehículo para diversos fármacos y agentes de imagen (Elzoghby *et al.*, 2012; Schilling *et al.*, 1992). Además, la HSA cuenta con la aprobación de la FDA como excipiente en varias formulaciones farmacéuticas disponibles comercialmente y en ensayos clínicos actuales (Elsadek & Kratz, 2012; Schilling *et al.*, 1992). Posee dos zonas de unión para fármacos (sitios I y II de Sudlow) y varios sitios de unión para ácidos grasos grandes que se han utilizado previamente con fines de administración de fármacos (Sudlow *et al.*, 1975; Sudlow *et al.*, 1976; Abou-Zied & Al-Lawatia, 2010; Z. Wang *et al.*, 2013). Además, la HSA tiene la capacidad de dirigirse a regiones tumorales debido a su mayor permeabilidad y efecto de retención, así como a su unión a receptores específicos (Kratz, 2008; Heneweer *et al.*, 201).

La estructura primaria de la HSA está compuesta por 585 aminoácidos, que incluyen 18 tirosinas, 6 metioninas, un único triptófano (Trp-214), 17 puentes disulfuro y un grupo tiol libre. Los puentes disulfuro están dispuestos en una serie repetida de nueve estructuras en forma de bucle centradas en ocho pares secuenciales Cys-Cys. Según la

estructura cristalográfica determinada de la HSA, se sugiere que el único residuo de triptófano (Trp-214) se localiza en el sitio de unión de IIA (El-Kemary *et al.*, 2007).

Sharma *et al.* (2014c) observaron que, en un experimento competitivo de sitios, el colorante TBO⁺ se une específicamente a la bolsa hidrófoba del sitio I (subdominio IIA) de la HSA. La presencia de interacciones hidrofóbicas, así como enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas, desempeñó un papel crucial en las interacciones de unión de TBO⁺ con la HSA. Esto se determinó mediante la disminución drástica en la intensidad de emisión de los residuos de triptófano de la HSA, acompañada de un ligero desplazamiento hacia el rojo en el máximo de emisión (345–348 nm), al agregar una concentración creciente de TBO⁺. Esto se atribuyó a las alteraciones en las conformaciones de las proteínas, lo que a su vez provocó cambios en el microambiente alrededor de los residuos de triptófano. Además, se informó un valor de $K_{SV} = 1,67 \times 10^5$ como la constante de autoapagamiento de Stern-Volmer, que mide la eficiencia del autoapagamiento en fluorescencia, y $4,09 \times 10^5$ como la constante de asociación del sistema HSA:TBO⁺.

1.9.1. El uso de bloqueadores en el estudio asociativo con la HSA

Zhang *et al.* (2011) describieron que para identificar el sitio de unión de TBO⁺ en HSA, llevaron a cabo experimentos competitivos con marcadores de sitio, utilizando fármacos que se unen específicamente a un sitio o región conocida en la HSA. A partir de estudios cristalográficos de rayos X, se ha demostrado que la warfarina, la fenilbutazona, entre otros, se unen al subdominio IIA (sitio I de Sudlow), mientras que el ibuprofeno, el ácido flufenámico, etc., son del subdominio IIIA (sitio II de Sudlow). Por lo tanto, se puede obtener información sobre la interacción de unión selectiva del sitio de TBO⁺ con HSA mediante la monitorización de los cambios en la emisión de la HSA unida a TBO⁺ en ausencia y presencia de marcadores de sitio por separado. Esto se ilustra en la **Figura 4**.

El ibuprofeno ha sido aprobado por la FDA para tratar enfermedades inflamatorias y trastornos reumatoides (Halford *et al.*, 2011). Por otro lado, la warfarina se emplea en la prevención y tratamiento de la trombosis venosa y eventos tromboembólicos, siendo clasificada como un anticoagulante (Patel, 2023). De acuerdo con la literatura, cuando el ibuprofeno está presente, la propiedad de emisión del sistema HSA:TBO⁺ se mantuvo

prácticamente igual que en situaciones donde no estaba presente el ibuprofeno. Esto sugiere que el ibuprofeno no inhibió la unión de TBO⁺ en su sitio de unión habitual (Sharma *et al.*, 2014a).

En un estudio adicional, Zhang *et al.* (2011) observaron que al agregar warfarina a la disolución de HSA junto con puerarina, la longitud de onda de emisión máxima de HSA se desplazó hacia el rojo y la intensidad de fluorescencia disminuyó significativamente en comparación con la ausencia de warfarina. La constante de asociación del sistema puerarina-HSA disminuyó de manera notable en presencia de warfarina. Estos hallazgos sugieren que la warfarina desplazó a la puerarina de su sitio de unión. Por consiguiente, se propuso que la puerarina estaba localizada en la región del subdominio IIA (sitio Sudlow I) de HSA.

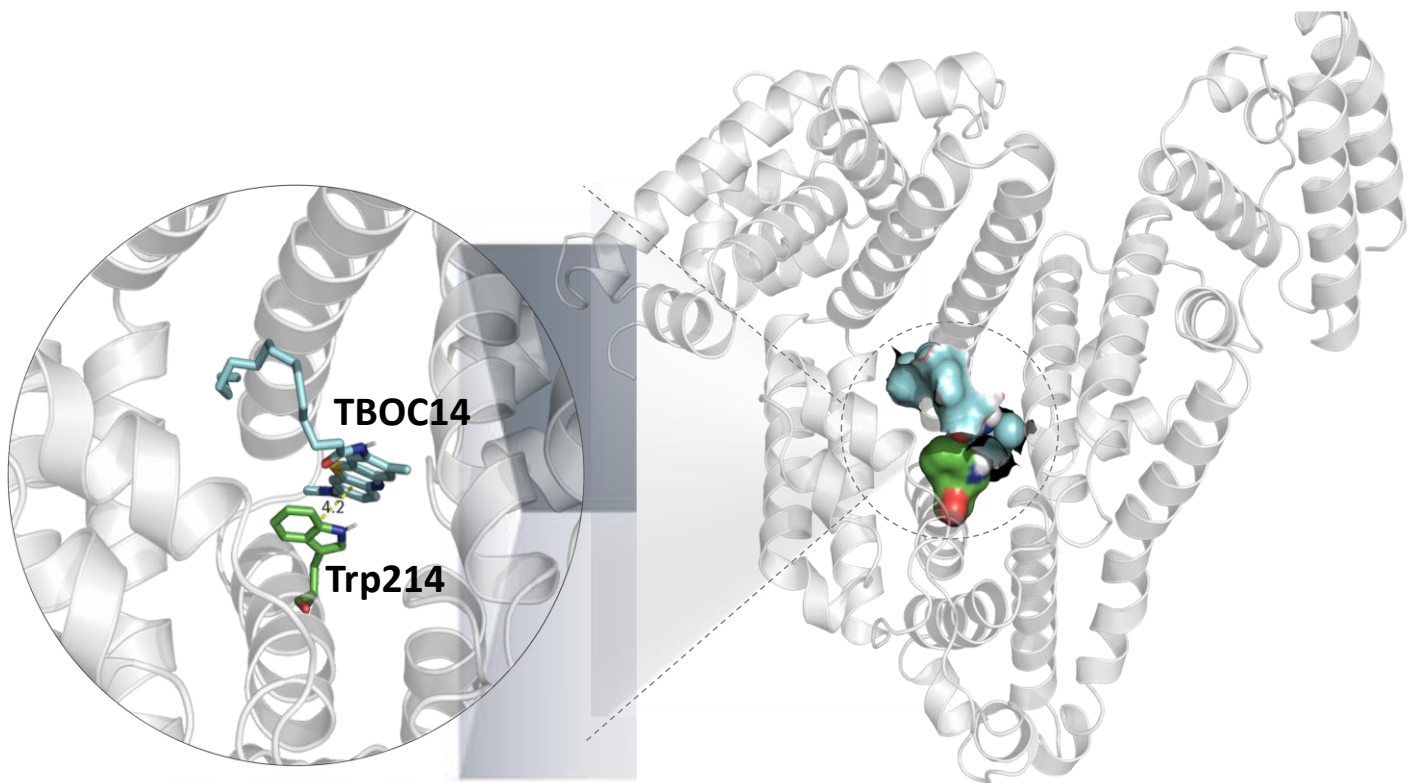


Figura 4. Acoplamiento molecular inducido del complejo TBOC14:HSA. La unión principal al sitio I de Sudlow se encuentra con una energía de unión de $-5,45 \text{ kcal mol}^{-1}$. Se muestra un primer plano de la interacción del residuo Trp-214 y TBOC14 (Robinson-Duggon *et al.*, 2021).

1.10. Objetivos

1.10.1. Objetivo general

Sintetizar y encapsular un derivado de Azul de toluidina, así como investigar su interacción con la Albúmina de Suero Humano en presencia de ibuprofeno o warfarina.

1.10.2. Objetivos específicos

- Sintetizar y estudiar fotoquímicamente el derivado mono desmetilado (d-TBO⁺) del Azul de toluidina.
- Determinar la asociación del derivado mono desmetilado (d-TBO⁺) del Azul de toluidina con el CB[7] y CB[8].
- Determinar el sitio y la constante de asociación de los derivados desmetilados del Azul de toluidina con la Albúmina de Suero Humano.

1.11. Hipótesis de trabajo

La fotoactividad de un derivado desmetilado del Azul de toluidina, tanto solo, como encapsulado en CB[7] y CB[8], permite potenciar su fotoactividad y capacidad terapéutica. Además, la asociación de los derivados con la Albúmina de suero humano establece su capacidad transportadora.

Capítulo II. Metodología

2.1. Síntesis y caracterización fotoquímica del derivado mono desmetilado (d-TBO⁺) del Azul de toluidina.

2.1.1. Purificación del Azul de toluidina

Se purificó el Azul de toluidina (TBO⁺) obtenido comercialmente (CAS: 92-31-9, Sigma-Aldrich) por cromatografía en columna abierta de vidrio de 15 cm de largo x 10 mm de diámetro. La fase estacionaria fue silica gel 60 (CAS: 7631-86-9, Merck Millipore) con poros de 35 a 70 μm . La fase móvil consistió en una mezcla de etanol y HCl (99:1) (Robinson-Duggon *et al.*, 2019).

2.1.2. Síntesis de los derivados desmetilados

El TBO⁺ purificado se ajustó a 12,5 μM en su máximo de absorción a 626 nm que corresponde a una absorbancia de 0,5 en acetonitrilo. Las muestras se ajustaron en una lectura en un rango de 200 a 800 nm en intervalos de 1 nm en la lectura en un espectrofotómetro Cary 60 UV-VIS utilizando celdas de cuarzo. Se irradió con luz blanca (LED) de 150 mm x 27,2 mm x 150 mm y 30 W con una temperatura de 6 500 K y 2 100 lúmenes (Lm), la irradiación se hizo con 32369 lux aproximadamente en celdas de cuarzo por 1 hora para generar el derivado mono desmetilado d-TBO⁺ y por 3 horas para el derivado doblemente desmetilado dd-TBO⁺ (Otero, 2023).

2.1.3. Purificación de los derivados desmetilados

Para cada caso se purificó por cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés) para garantizar la mayor pureza de cada derivado. Las muestras irradiadas se rotaevaporaron a 47 °C con una rotación a 105 rpm y una presión de 600 mmHg o con nitrógeno gaseoso. Las muestras se disolvieron en la fase móvil de etanol y HCl (99:1) y se sembraron en placas de silica gel F₂₅₄ (Merck, Supelco) 20x20 cm. La elución se realizó por 3 horas y se rasparon las fracciones correspondientes para filtrarlas y disolver las muestras purificadas en acetonitrilo, así como también se determinaron las abundancias relativas por medio de Espectrometría de Masas (EM).

2.1.4. Determinación de la abundancia relativa

La abundancia relativa se determinó por medio de Espectrometría de Masas con ionización positiva por electrospray (ESI⁺) con el cromatógrafo Waters UPLC ACQUITY Clase H y espectrómetro Waters XEVO TQD en la Universidad de Panamá siguiendo las condiciones de la **Tabla 1**. Por medio de inyección directa se determinaron las masas y abundancias relativas del TBO⁺ y los derivados desmetilados después de su purificación, ajustados a 0,5 de absorbancia en acetonitrilo y filtrados por un filtro de 0,22 µm en un rango de 200 a 300 *m/z*. La evaluación de la encapsulación del d-TBO⁺ en CB[7] y CB[8] se realizó en agua grado LC-MS de 200 a 1 600 *m/z*.

Tabla 1. Condiciones de la Espectrometría de Masas (ESI⁺)

Voltajes de la fuente		Analizador	
Capilar (kV)	3,80	LM resolución 1	2,9
Cono (V)	43	HM resolución 1	14,8
Temperaturas de la fuente		Energía de ionización 1	-0,6
Temperatura de solvatación (°C)	499	LM resolución 2	8,1
Flujo de gas de la fuente		HM resolución 2	14,5
Solvatación (L/h)	398	Energía de colisión MS (V)	4
Cono (L/h)	30		

2.1.5. Determinación del rendimiento cuántico de fotoluminiscencia

Se determinó el rendimiento cuántico de fotoluminiscencia con la esfera de integración QuantaPhi-2 en el fluorímetro FluoroMax-4 de Horiba de estado estacionario. Se utilizó el método de las 4 curvas con previos ajustes de 3 mL del máximo de absorción UV-Vis de cada fotosensibilizador a 0,2, 0,5, 0,8 y 0,1 para cada curva en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM a pH 7 y un filtro de densidad óptica de 3,0 en la entrada de excitación de la muestra para ajustar la rendija o slit según la intensidad del pico de Rayleigh entre 10⁶ and 2 x 10⁶ cps (HORIBA scientific, 2022, Alessi *et al.*, 2013).

2.2. Determinación de la asociación del derivado mono desmetilado (d-TBO⁺) del Azul de toluidina con el CB[7] y CB[8].

2.2.1. Titulación espectrofotométrica del CB[7] y CB[8]

Se ajustó una disolución de 3 mL de Cob⁺ a 17,54 μM que corresponde a una absorbancia de 0,6 a su longitud de onda máxima de 261 nm. Se tomaron lecturas en cada adición de 8 μL de CB[7] hasta los 120 μL en el espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis en un rango de 200 a 800 nm con intervalos de 1 nm. Para el CB[8], se ajustó el Cob⁺ a 4,39 μM que corresponde a una absorbancia de 0,15 a su longitud de onda máxima de 261 nm. Se tomaron lecturas en cada adición de 30 μL de CB[8] hasta los 390 μL en el espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis en un rango de 200 a 800 nm con intervalos de 1 nm.

2.2.2. Encapsulación supramolecular del fotosensibilizador en CB[7] y CB[8]

Se prepararon dos disoluciones de 3 mL en disolución amortiguadora de pH 7, la primera con d-TBO⁺ a 2 μM y CB[7] a 50 μM y la segunda solo con el d-TBO⁺ a 2 μM , se repitió con el CB[8] a 35 μM . A ambas disoluciones se les realizó un barrido con el fin de compararlos en un rango de 200 a 800 nm en el espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis y en el fluorímetro Fluoromax-4 de Horiba, se excitaron las muestras en las longitudes de onda en que no cambian los espectros entre el derivado solo y encapsulado. También, se analizó las por inyección directa en Espectrometría de Masas según la sección 2.1.4.

2.2.3. Determinación de la constante de asociación con CB[7] y CB[8]

La asociación de los derivados desmetilados con el CB[7] se determinó por medio de una curva de unión. Se elaboraron 2 disoluciones en disolución amortiguadora a pH 7, la primera manteniendo constante la concentración de los fotosensibilizadores a 2 μM y la segunda con el fotosensibilizador a 2 μM con CB[7] 30 μM o CB[8] 10 μM . Se hicieron alícuotas de 1 mL con concentraciones crecientes de CB[7] desde 0 a 30 μM y de CB[8] de 0 a 10 μM manteniendo constante la concentración del fotosensibilizador y observando el cambio en la intensidad de emisión excitando a una longitud de onda sin cambios de absorbancia entre los derivados solos y encapsulados con slit de 2 nm. Se determinó la

constante de asociación d-TBO+@CB[7] y d-TBO+@CB[8] por el software de *Scientist* (Scholtbach *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2011).

2.2.4. Determinación indirecta de oxígeno singulete

La generación de oxígeno singulete se determinó siguiendo la disminución de la absorción a 380 nm y/o emisión de fluorescencia a 407 nm del ácido 9,10-antracenediil-bis(metileno)dimalónico (ABMA por sus siglas en inglés) (Cáceres *et al.*, 2017; Kuznetsova *et al.*, 2001; Robinson-Duggon *et al.*, 2019) a 1,6 μM con cada fotosensibilizador a 4 μM , excitando a 395 nm y colectando la intensidad de fluorescencia de 400 a 550 nm. Se utilizó el iluminador LED (LEDi) de Luzchem con el cabezal de luz ámbar con el máximo en un rango de 590 a 610 nm. Se irradió la disolución de 2 mL por 30 minutos con una intensidad de 0,01 en agitación constante y se tomaron los datos en lecturas cada 3 minutos. El slit de excitación y emisión fue de 1 nm para el fotosensibilizador solo y encapsulado, con NaN_3 , de 4 nm solo y 2 nm encapsulado con FeCy, según indica Otero, 2023.

2.3. Determinación de la constante y sitio de asociación de los derivados desmetilados del Azul de toluidina con la Albúmina de Suero Humano.

2.3.1. Asociación espectrofotométrica de los fotosensibilizadores con la Albúmina de suero humano

La evaluación de los cambios en los espectros de absorbancia UV-Vis se realizó con espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis en celdas de cuarzo con disoluciones de 2 mL de HSA a una concentración 5 μM y cada fotosensibilizador de 0 a 10 μM en un rango de lectura de 200 a 800 nm con intervalos de 1 nm en disolución amortiguadora de fosfato a pH 7.

2.3.2. Determinación de la constante de Stern-Volmer de los fotosensibilizadores con la Albúmina de suero humano

Las constantes de asociación con la HSA se determinaron mediante el análisis de Stern-Volmer del autoapagamiento de la fluorescencia del triptófano 214 (Cáceres *et al.*, 2017). Las constantes de unión para cada fotosensibilizador se midieron en un intervalo de 0 a 10 μM en presencia de HSA a una concentración 5 μM en disolución amortiguadora de

fosfato a pH 7. Se utilizó el fluorímetro Fluoromax-4 de Horiba excitando a 280 nm y colectando los datos de 290 a 550 nm con un slit de excitación y emisión de 2 nm. El gráfico de Stern-Volmer se obtuvo graficando la relación de la intensidad de fluorescencia inicial con la obtenida a cada concentración de fotosensibilizador añadida a 350 nm como establece la **Ecuación 1**.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

Ecuación 1. Ecuación de Stern-Volmer. I y I_0 son la intensidad de emisión relativa corregida en ausencia y presencia del desactivador, respectivamente. K_q es la constante de velocidad de enfriamiento bimolecular; τ_0 es el tiempo de vida media del fluoróforo en ausencia del desactivador y $[Q]$ es la concentración del desactivador. K_{SV} es la constante de Stern-Volmer que mide la eficacia del autoapagamiento.

2.3.3. Asociación competitiva utilizando marcadores en el sitio de unión con la Albúmina de suero humano

2.3.3.1. Ibuprofeno como marcador del sitio de unión

Se colocó en una celda, una disolución de HSA a una concentración 5 μM e ibuprofeno 5 μM a la que se añadieron cantidades crecientes de 2 μM de cada fotosensibilizador hasta 10 μM . Se excitó a 280 nm y se recolectó la intensidad de fluorescencia de 290 a 550 nm con slit de excitación y emisión de 2 nm en disolución amortiguadora de fosfato a pH 7, además de HSA 5 μM e ibuprofeno de 0 a 10 μM . Las tendencias de unión se graficaron según el máximo a 350 nm en ausencia y presencia del bloqueador (Sharma *et al.*, 2014a).

2.3.3.2. Warfarina como marcador del sitio de unión

Se colocó en una celda, una disolución de HSA a una concentración 5 μM y cada fotosensibilizador a 10 μM con adiciones crecientes de warfarina de 2 hasta 10 μM , se excitó a 280 nm y se recolectó la intensidad de fluorescencia de 290 a 550 nm con slit de excitación y emisión de 2 nm en disolución amortiguadora de fosfato a pH 7. También se realizó la determinación de la constante de Stern-Volmer con la warfarina según la sección **2.3.2.** y se graficó la tendencia de unión según el máximo a 350 nm en ausencia y presencia

del bloqueador. Además, se realizó la observación del desplazamiento del fotosensibilizador excitando a 550 nm, longitud de onda sin absorbancia de la proteína ni el bloqueador, tomando la emisión de 560 a 750 nm y graficando según el máximo de emisión.

2.3.4. Fotooxidación de la Albúmina de suero humano por el d-TBO⁺

Se colocó en una celda, una disolución de HSA a una concentración 25 μ M y se añadió d-TBO⁺ 5 μ M en disolución amortiguadora de fosfato a pH 7 y se irradió con luz ámbar por 30 min con el iluminador LED (LEDi) de Luzchem, se excitó a 280 nm y se recolectó la intensidad de fluorescencia de 290 a 550 nm con slit de excitación y emisión de 2 nm. Se tomaron las lecturas cada 3 minutos y se registró el cambio en la intensidad de fluorescencia a los 350 nm con el fluorímetro Fluoromax-4 de Horiba.

2.3.5. Electroforesis con la Albúmina de suero humano irradiada

Para la fotooxidación de la HSA se prepararon geles de poliacrilamida con el gel separador al 12 % y 10 % según la **Tabla 2** en condiciones reductoras. Se elaboró una disolución de 2 mL del d-TBO⁺ y la HSA en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM a pH 7, esta se irradió en una celda de cuarzo por 30 minutos con luz ámbar en una intensidad de 0,01. En el gel se añadieron 5 μ L de muestra irradiada y no irradiada. Se utilizó una cámara Mini-Protean II de Bio-Rad (Richmond, CA, USA) aplicando 50 V por 30 min y luego 100 V por 1 h. Los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie R-250 y se revelaron con una disolución decolorante en diferentes lavados o se revelaron con la tinción con plata (Cáceres *et.al.*, 2017).

Tabla 2. Componentes de geles separadores según su concentración.

Componente	Gel al 10 %	Gel al 12 %
Disolución amortiguadora de carga (mL)	1,5	1,5
Disolución de acrilamida (mL)	1,95	2,4
Agua desionizada (mL)	2,55	2,1
TEMED (μ L)	5	5
Persulfato de amonio al 10 % (μ L)	20	20

Capítulo III.

Resultados y discusión

3.1. Síntesis y caracterización fotoquímica del derivado mono desmetilado (d-TBO⁺) del Azul de toluidina.

3.1.1. Purificación del Azul de toluidina

La purificación del Azul de toluidina se realizó por cromatografía en columna abierta utilizando como fase estacionaria la silica gel y como fase móvil una disolución de etanol y HCl (99:1). Se pesaron 5 mg de TBO⁺ para su separación por la columna, de esta eluyeron un total de 7 fracciones (Otero González, 2023). Por medio de Espectrofotometría UV-Vis y Espectrometría de Masas ESI⁺ se logró identificar el máximo de absorbancia de cada fracción siendo la primera en eluir la correspondiente a 595 nm del derivado doblemente desmetilado del Azul de toluidina (dd-TBO⁺). La fracción 3 a 610 nm correspondió al derivado mono desmetilado (d-TBO⁺) y las fracciones 6 y 7 fueron las más cercanas al máximo en 626 nm del Azul de Toluidina purificado como se observa en la **Figura 5** y que coincide con la reportada por Robinson-Duggon *et al.* (2019).

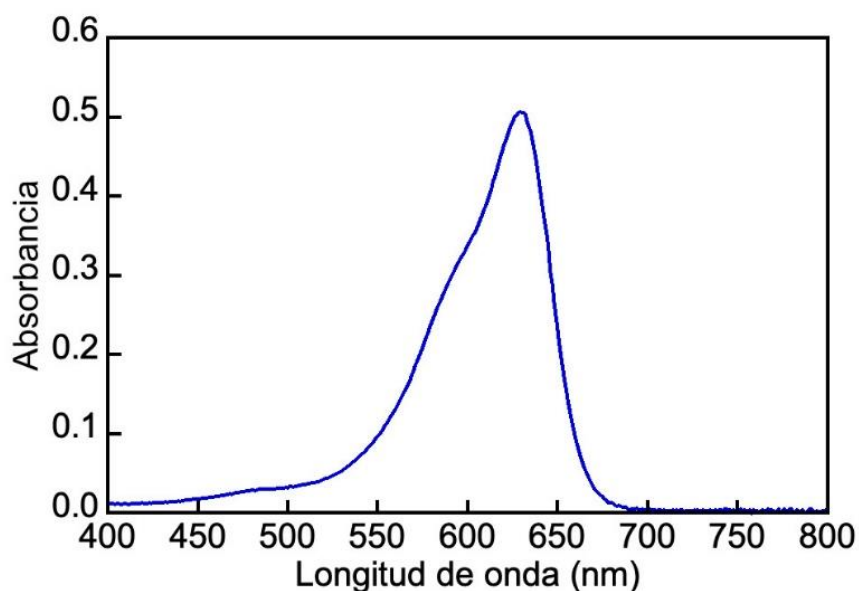


Figura 5. Espectro de absorción UV-Vis del TBO⁺ purificado en acetonitrilo.

El TBO⁺ purificado se filtró e inyectó en el espectrómetro de masas con ionización positiva según la sección 2.1.4. En la **Figura 6** se muestra el espectro en donde el pico base a $m/z = 270.1$ con una abundancia relativa del 100 % coincide con el peso molecular del TBO⁺ y

con una abundancia menor al 10 % los fotoproductos de su fotodegradación, el $m/z = 256.1$ para el d-TBO⁺ y $m/z = 242.2$ para el dd-TBO⁺. A través de la purificación en columna se obtuvo el Azul de toluidina con una pureza del 95 %, permitiendo su utilización en experimentos posteriores con un alto nivel de confianza en obtener resultados significativos.

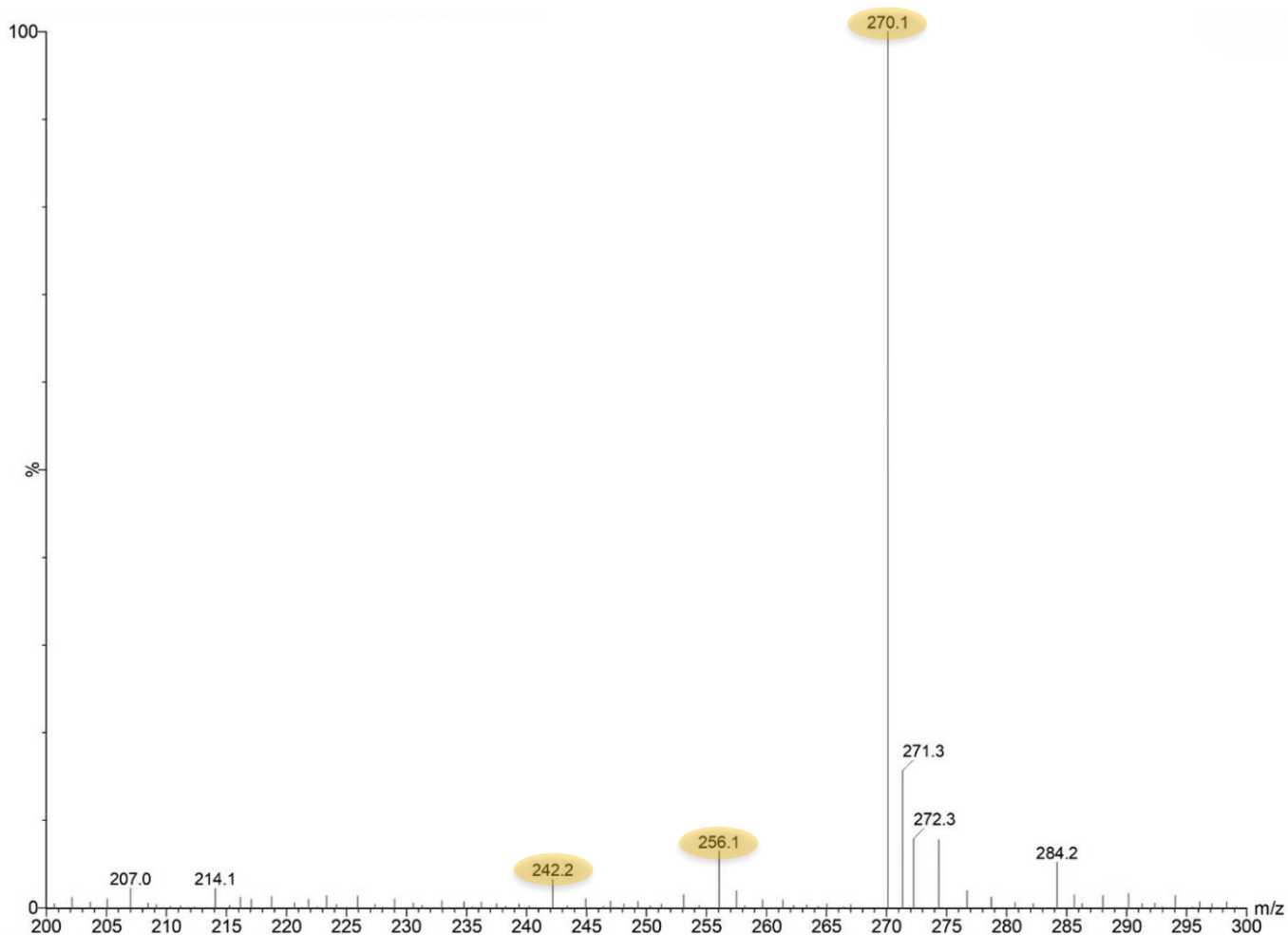


Figura 6. Espectro de masas ESI⁺ del Azul de toluidina purificado en acetonitrilo.

3.1.2. Síntesis de los derivados desmetilados

A partir del Azul de toluidina purificado, este se ajustó a una concentración 12,5 μM y se irradió por 1 hora, tomando lecturas cada 5 minutos, para producir la desmetilación del extremo de la N,N-Dimetilamina de la molécula madre hacia el derivado mono desmetilado (d-TBO⁺) y se irradió por 3 horas para obtener el Azul de toluidina doblemente desmetilado (dd-TBO⁺) tomando lecturas a los 90, 120 y 180 min, estas lecturas se

muestran en la **Figura 7**. Como se observa en la **Figura 8**, el máximo a 626 nm correspondiente al ajuste de la concentración inicial del TBO⁺ disminuye y se desplaza hacia longitudes de onda menores con el aumento del tiempo de irradiación, siendo 610 nm el máximo para el d-TBO⁺ y 595 nm para el dd-TBO⁺.

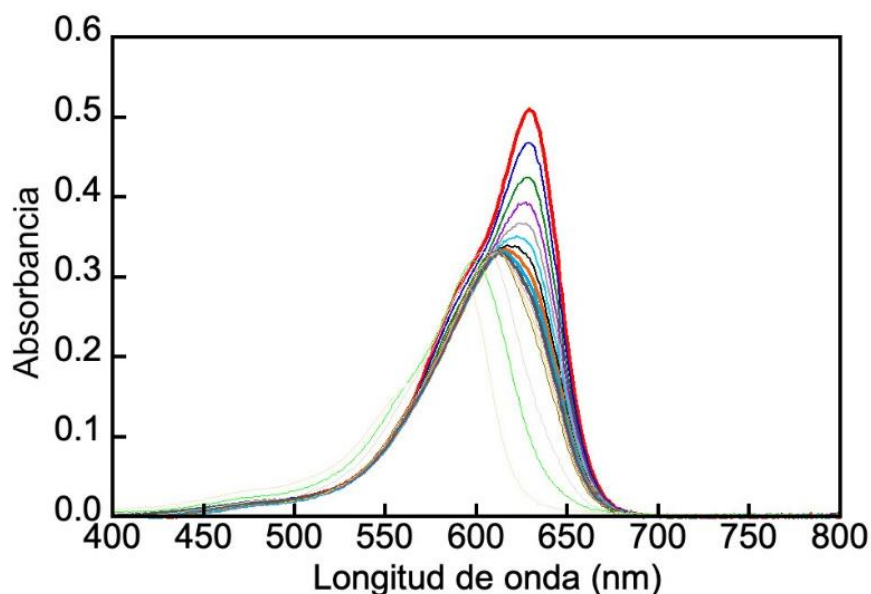


Figura 7. Espectro de absorción UV-Vis del TBO⁺ irradiado por 3 horas con lecturas cada 5 min hasta los 60 min y luego a 90, 120 y 180 min.

Con la **Figura 8** se evidencia que la irradiación del TBO⁺ purificado en acetonitrilo permite monitorear la generación de los fotoproductos deseados por lo que su purificación resulta imprescindible para la obtención de los derivados desmetilados. Cabe destacar que la desmetilación sigue ocurriendo, teniendo las moléculas en disolución y en presencia de luz común, por lo que el almacenamiento y concentración de las muestras se mantuvo controlado durante la manipulación de estas.

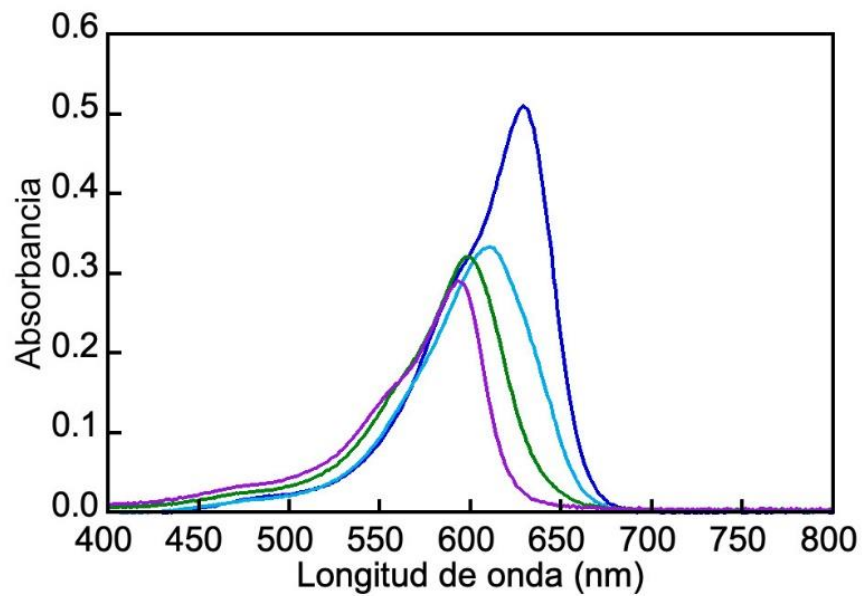


Figura 8. Espectro de absorción UV-Vis de la fotodegradación del TBO⁺ irradiado por 3 horas. La línea azul corresponde a los 0 minutos; la celeste 1 hora; la verde 2 horas y la morada 3 horas.

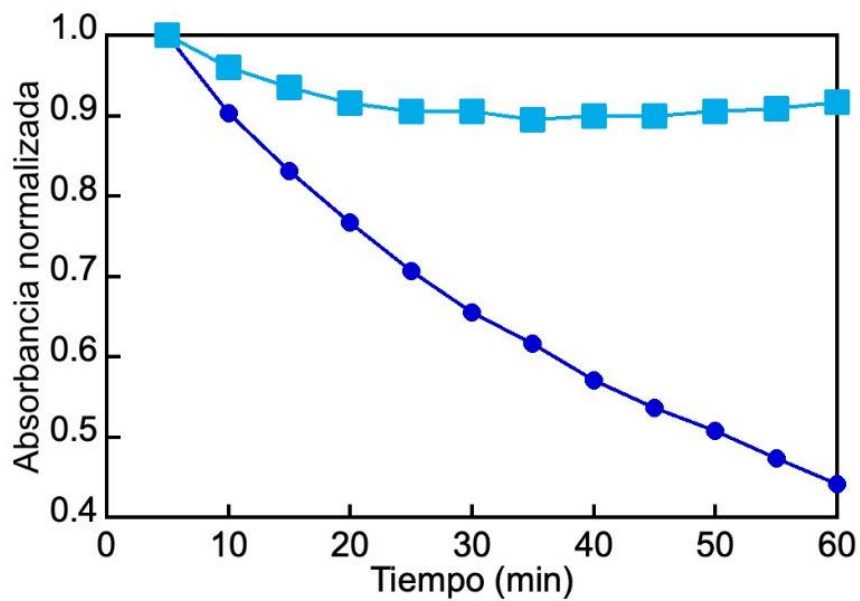


Figura 9. Cinética de la fotodegradación del TBO⁺ irradiado con luz blanca por 1 hora para la síntesis del d-TBO⁺ en acetonitrilo. Los marcadores celestes representan la generación del d-TBO⁺ a 610 nm y los marcadores azules representan la fotodegradación del TBO⁺ a 650 nm.

A medida que transcurre el tiempo de irradiación y se observa el desplazamiento del máximo de absorbancia en el espectro, la concentración de unas especies aumenta y la de otras disminuye, observar la cinética de la fotodegradación en la **Figura 9** evidencia que en la primera hora de irradiación la cantidad de TBO⁺ disminuye y la cantidad del d-TBO⁺ aumenta por lo que parte del TBO⁺ se convierte a d-TBO⁺. La cinética se representa graficando una longitud de onda específica para cada fotosensibilizador, a 650 nm para el TBO⁺ porque ningún fotoproducto absorbe a esa longitud de onda y a 610 nm para el d-TBO⁺.

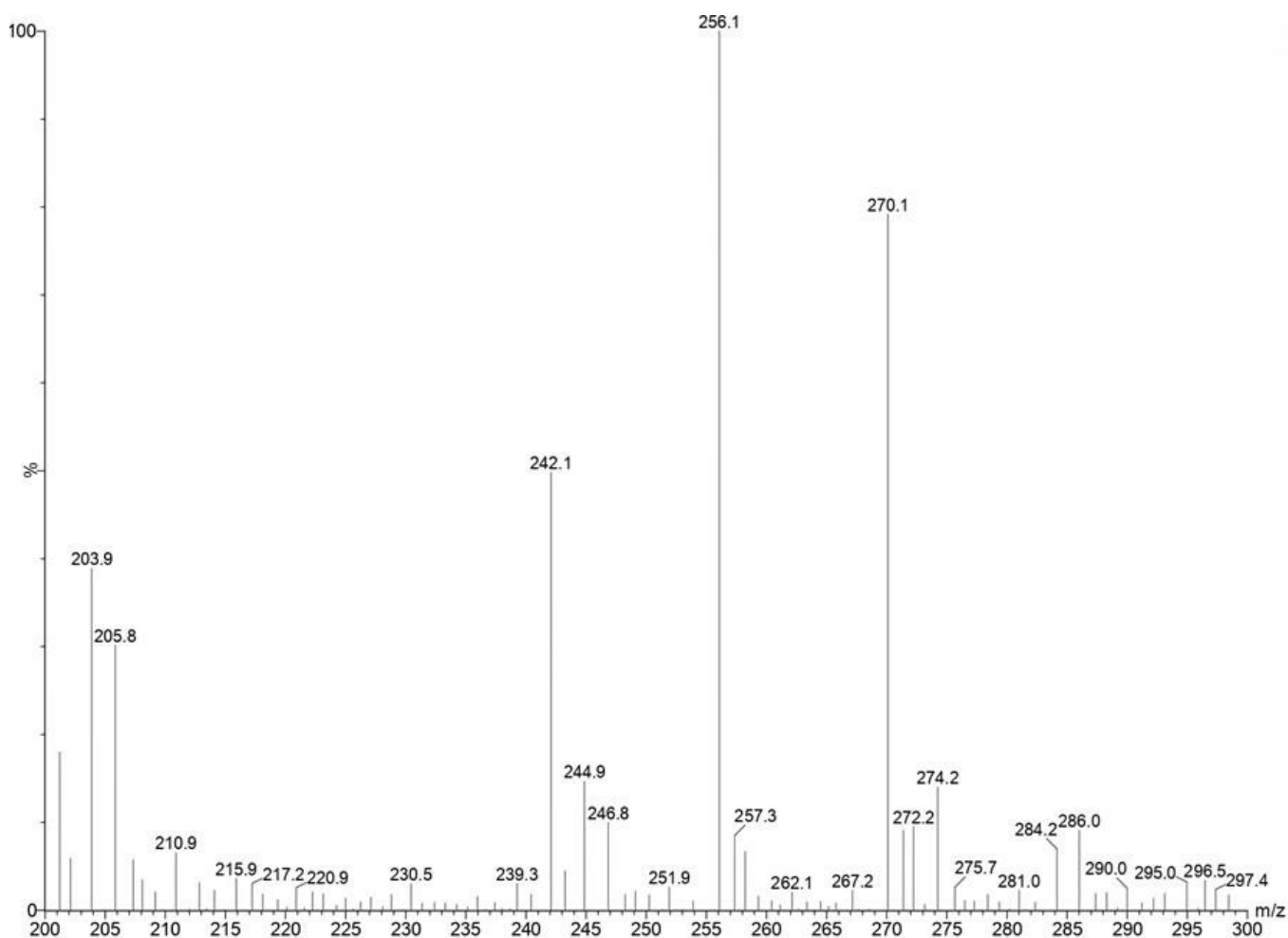


Figura 10. Espectro de masas ESI⁺ en acetonitrilo del TBO⁺ con 1 hora de irradiación.

La desmetilación del TBO⁺ a lo largo del tiempo varía la especie mayoritaria en la celda de irradiación y para esta investigación la especie preferible es el d-TBO⁺ por lo que una vez que transcurrió el tiempo establecido y se observó el desplazamiento del máximo de absorbancia desde 626 nm a 610 nm, se detuvo la irradiación y se almacenó la muestra

para su posterior purificación. En la **Figura 10** se observan los 3 fotosensibilizadores y sus abundancias relativas a 1 hora de irradiación del TBO⁺, a este tiempo el d-TBO⁺ constituye el pico base de la muestra que corresponde a la señal de $m/z = 256.1$ con una abundancia relativa del 100 %, la segunda especie más abundante es el TBO⁺ con la señal correspondiente a $m/z = 270.1$ con una abundancia relativa del 78 % y la tercera especie más abundante es el dd-TBO⁺ con la señal de $m/z = 242.1$ con una abundancia relativa del 51 %.

3.1.3. Purificación de los derivados desmetilados

Se realizaron varias irradiaciones del TBO⁺ hasta alcanzar los 500 mL de muestra irradiada con d-TBO⁺ producido por 1 hora y dd-TBO⁺ producido por 3 horas. Estas muestras se rotaevaporaron para remover el acetonitrilo y se redisolvieron en 1 mL de eluyente para su purificación por cromatografía de capa fina. La purificación de las muestras irradiadas se hace necesaria porque aún en disolución se mantienen los otros fotosensibilizadores, como ocurrió con el d-TBO⁺, se pudo detener la irradiación hasta ser el fotoproducto mayoritario, pero aún existen otras especies en cantidades considerables (**Figura 10**) que impiden la utilización de la muestra irradiada para realizar los experimentos planteados ya que estas especies pueden interferir y desviar los resultados del comportamiento verdadero. Una vez se obtuvo la muestra irradiada reconstituida en eluyente, esta se sembró en la placa de TLC y se colocó en una cámara cromatográfica durante 3 horas para la elución total de las fracciones existentes en el medio (Otero, González 2023) como se observa en la **Figura 11**.

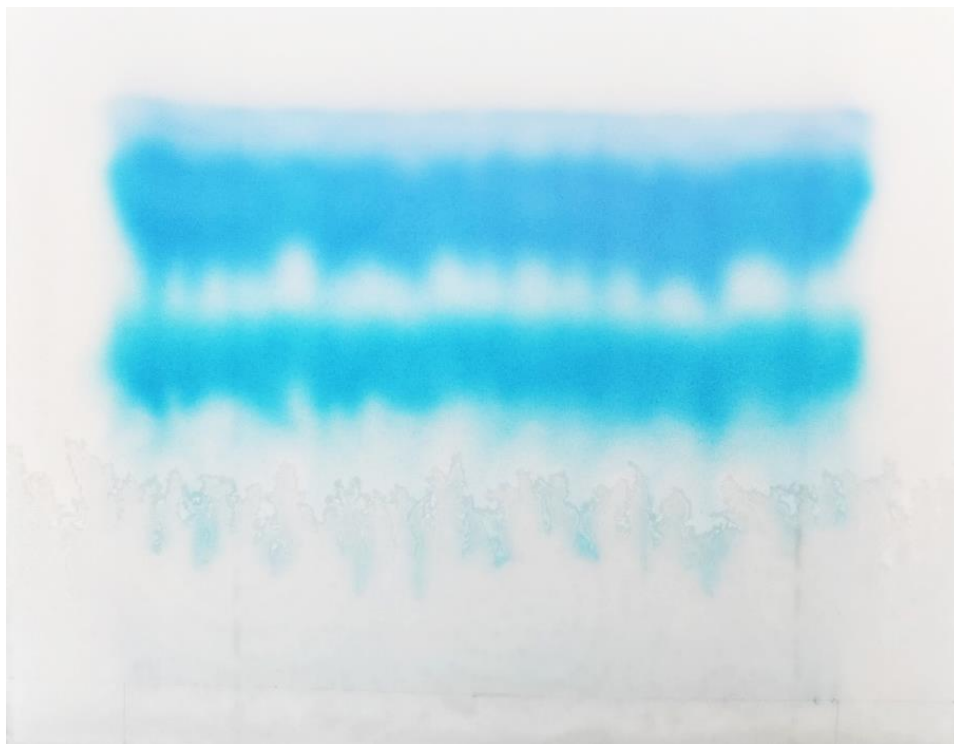


Figura 11. Cromatografía de capa fina del TBO⁺ irradiado por 1 hora.

En la placa de TLC después de 3 horas con el TBO⁺ irradiado por 1 hora se observaron 3 fracciones distinguibles por su color a simple vista, cada fracción se raspó según su coloración y se leyó por espectroscopía UV-Vis para asignar sus máximos de absorción. La primera fracción de abajo hacia arriba correspondió al TBO⁺ que no se desmetiló después de 1 hora de irradiación, la segunda fracción de abajo hacia arriba correspondió al d-TBO⁺ y la tercera fracción de abajo hacia arriba correspondió al dd-TBO⁺.

Como se observa en la **Figura 11**, al TBO⁺ se le atribuiría el factor de retención más bajo y a los fotoproductos desmetilados factores de retención mayores, esta observación evidencia que la desmetilación genera fotoproductos menos polares que la molécula madre, siendo el dd-TBO⁺ el derivado menos polar. A su vez, esta polaridad se podría relacionar con la capacidad del TBO⁺ de tener mayores fuerzas intermoleculares que le confieren mayor afinidad con el gel de sílice. Esta propiedad intrínseca y el color de cada molécula permite la diferenciación entre cada fotosensibilizador.

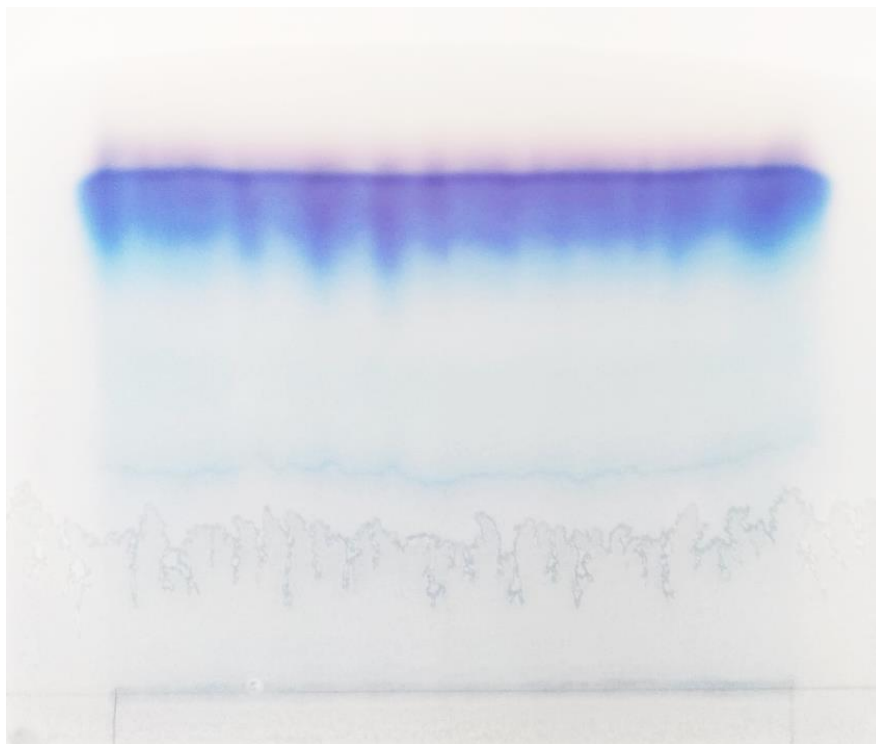


Figura 12. Cromatografía de capa fina del TBO⁺ irradiado por 3 horas.

También se realizó la purificación por TLC del TBO⁺ irradiado por 3 horas y se pudo distinguir la fracción correspondiente al dd-TBO⁺ que tiene una coloración lila según la **Figura 12**, esta se raspó y se leyó por Espectroscopía UV-Vis. A diferencia de la **Figura 11**, la purificación a las 3 horas de irradiación establece una mayor cantidad del dd-TBO⁺ con pocos rastros de TBO⁺ sin desmetilar y poca cantidad de d-TBO⁺, también la fracción aparece a la misma distancia en ambas TLC.

Las fracciones se analizaron por Espectrometría de Masas para evaluar las abundancias relativas de estas según la sección **2.1.4**. La purificación por TLC permitió el completo aislamiento de la especie d-TBO⁺ y dd-TBO⁺ de la muestra irradiada con una alta abundancia relativa. Como se muestra en la **Figura 13**, los porcentajes de abundancia relativas de los otros fotosensibilizadores que se observaron en la **Figura 10** disminuyeron hasta por debajo del 10 % y la abundancia relativa del d-TBO⁺ se mantuvo en 100 % con la señal en $m/z = 256.1$. El espectro de MS/MS que se realizó al ion molecular

del d-TBO⁺ en la **Figura 14** destaca la señal del dd-TBO en $m/z = 241.1$ que se produce seguida la desmetilación del d-TBO⁺.

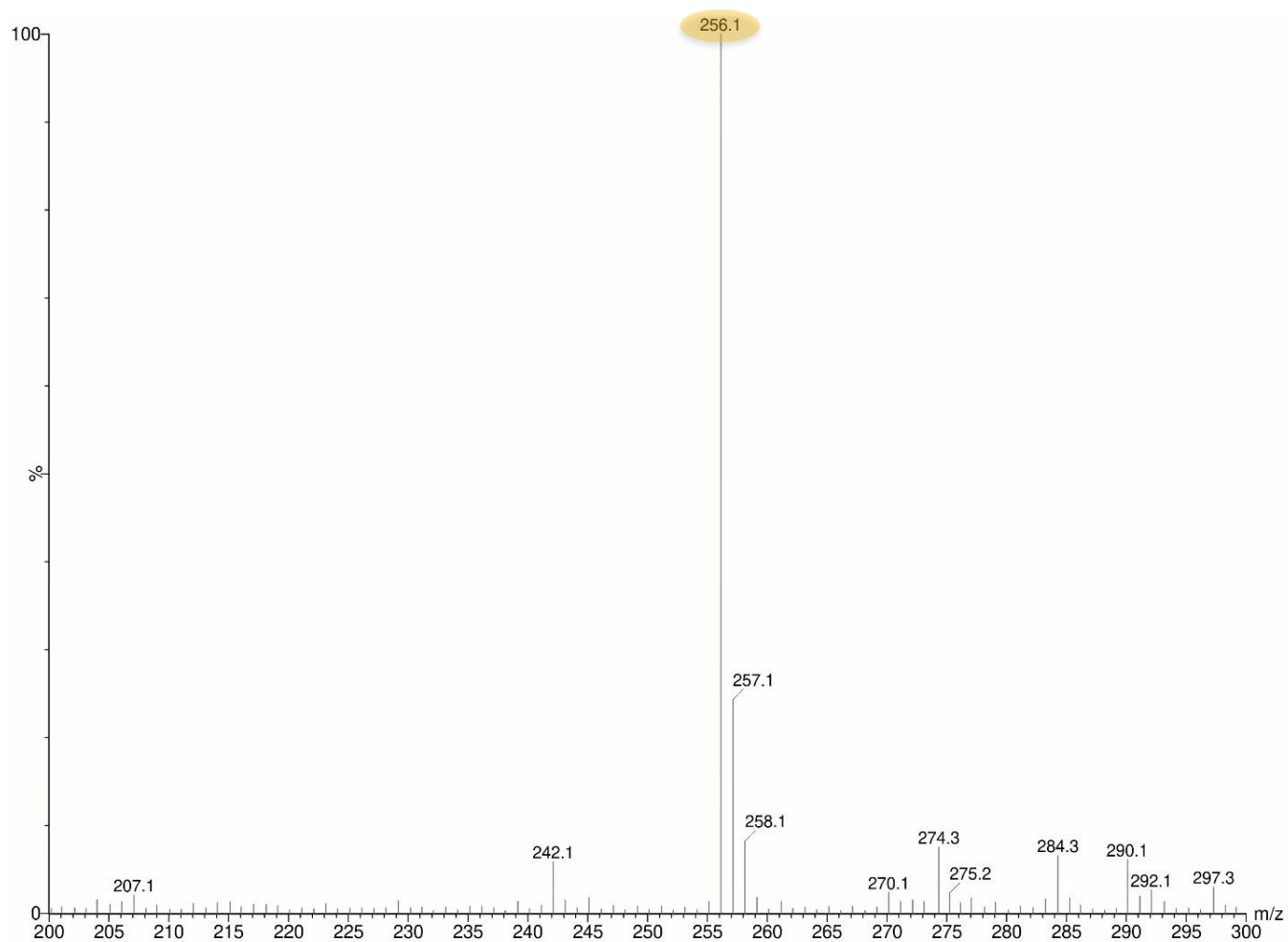


Figura 13. Espectro de masas ESI⁺ del derivado mono desmetilado (d-TBO⁺) en acetonitrilo purificado por cromatografía de capa fina.

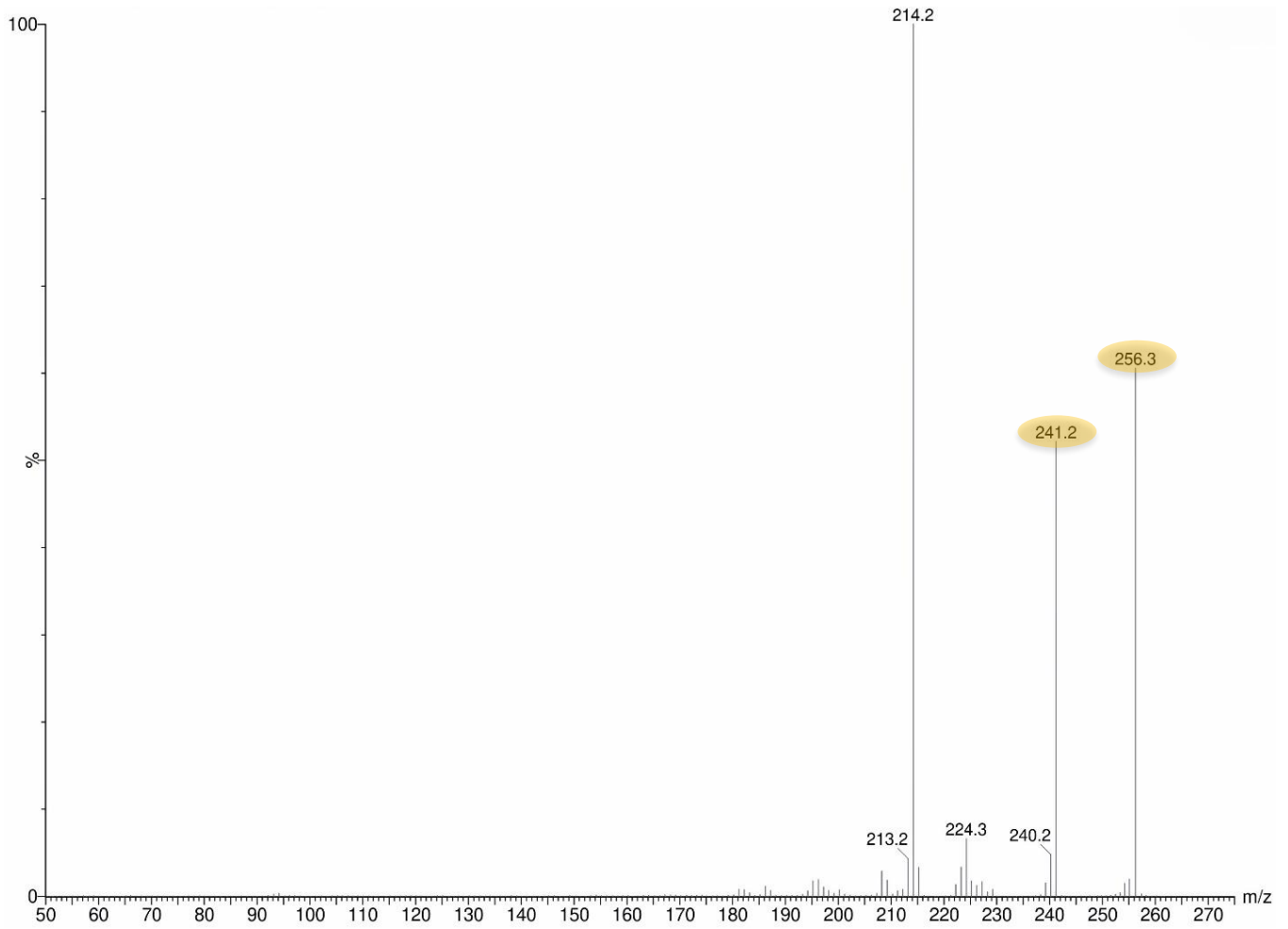


Figura 14. Espectro de MS/MS ESI⁺ de $m/z = 256$ en acetonitrilo.

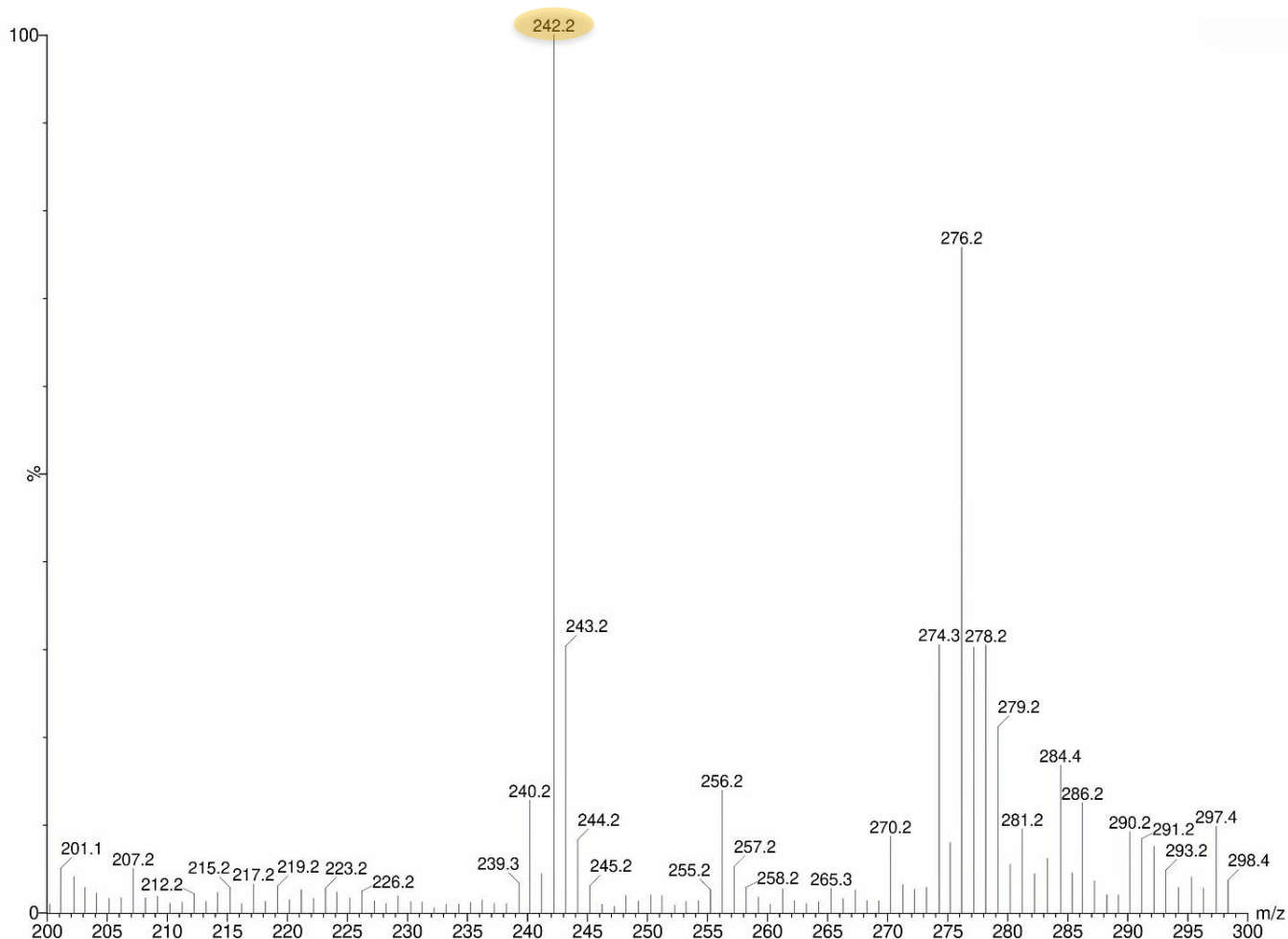


Figura 15. Espectro de masas ESI⁺ del derivado doblemente desmetilado (dd-TBO⁺) en acetonitrilo purificado por cromatografía de capa fina.

En la **Figura 15** se observa el espectro de masas ESI⁺ del dd-TBO⁺ purificado por TLC que corresponde a la señal de $m/z = 242.2$ con una abundancia relativa del 100 % y el resto de los fotosensibilizadores por debajo del 10 % de abundancia. La purificación de los fotoproductos de la irradiación del TBO⁺ se realizó satisfactoriamente y garantiza que el TBO⁺, d-TBO⁺ y dd-TBO⁺ se pueden utilizar con total confiabilidad en experimentos posteriores para obtener resultados significativos sin interferencia de la actividad de otros fotosensibilizadores.

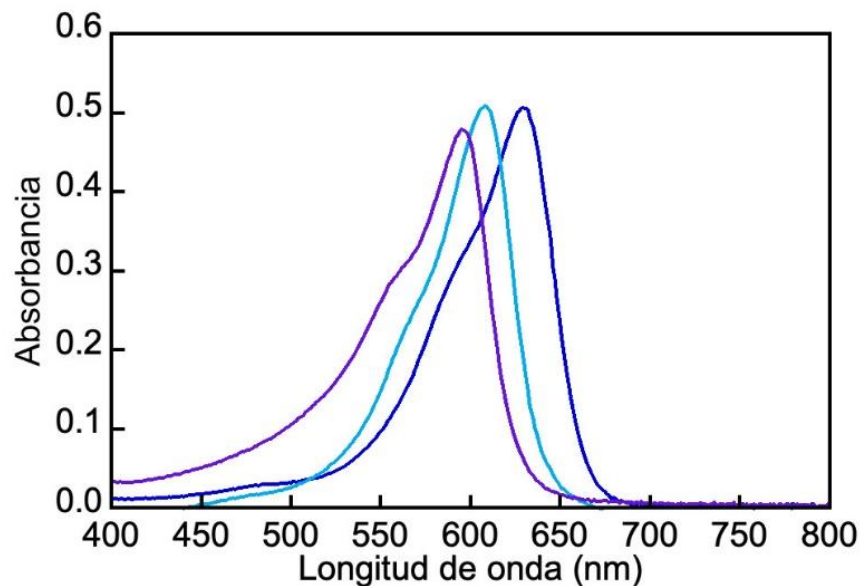


Figura 16. Espectro de absorción UV-Vis del TBO⁺ (línea azul), d-TBO⁺ (línea celeste) y dd-TBO⁺ (línea morada) purificados en acetonitrilo.

Cada fotosensibilizador purificado se almacenó en viales ámbar para su posterior utilización. En la **Figura 16** se observa la absorción característica de cada fotosensibilizador por UV-Vis donde se distinguió el máximo de absorción de cada uno, a los 626 nm para el TBO⁺, los 610 nm para el d-TBO⁺ y los 595 nm para el dd-TBO⁺. También se puede visualizar el desplazamiento hipsocrómico que ocurre con la pérdida de cada metilo, esto puede estar relacionado a la característica del grupo amino disustituido por ser un auxocromo, la desmetilación del TBO⁺ puede cambiar la absorción y el efecto hacia los grupos cromóforos de la molécula por lo que se observa el desplazamiento a longitudes de onda menores y colores más hacia el azul con los derivados desmetilados.

Los tres fotosensibilizadores ajustados a una concentración 2 μM se excitaron en su máximo de absorción y se registraron sus espectros de emisión en la **Figura 17**, el d-TBO⁺ es el más fluorescente a pesar de estar en medio de la fotodegradación del TBO⁺ y la producción del dd-TBO⁺. Ambos derivados desmetilados exhibieron mayor fluorescencia que la molécula madre indicando que los metilos confieren características fotoquímicas

importantes a cada fotosensibilizador en sus mecanismos de desactivación energética y los distinguen notoriamente.

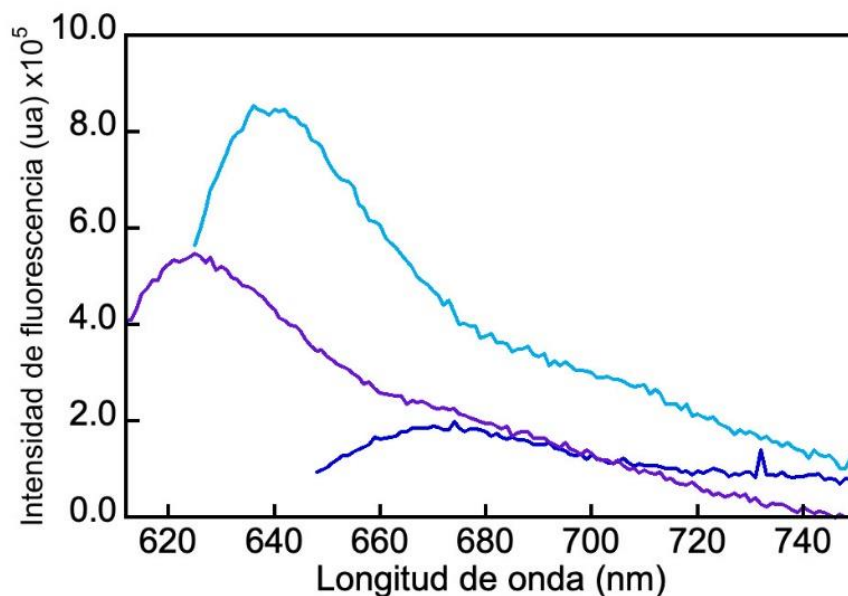


Figura 17. Espectro de emisión del TBO⁺ (línea azul), d-TBO⁺ (línea celeste), dd-TBO⁺ (línea morada) purificados a 2 μ M en disolución amortiguadora en fosfato 10 mM de pH 7.

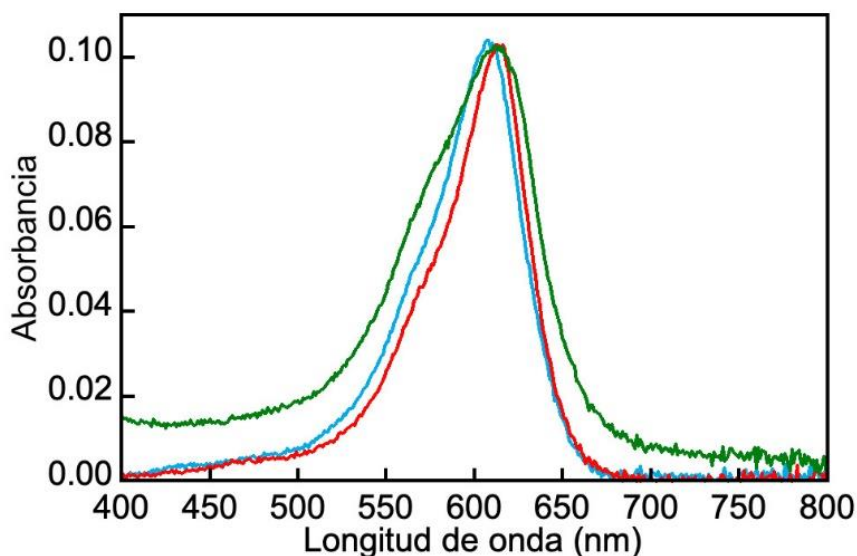


Figura 18. Espectro de absorción UV-Vis del d-TBO⁺ en acetónitrilo (línea celeste), disolución amortiguadora en fosfato 10 mM de pH 7 (línea verde) y metanol (línea roja).

Tabla 3. Máximos de absorción del d-TBO⁺ en diferentes disolventes para la evaluación del efecto solvatocrómico.

Disolvente	Máximo de absorción
Acetonitrilo	610 nm
Disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7.0	615 nm
Metanol	613 nm

Una vez obtenido el d-TBO⁺ purificado, se caracterizó su absorción en diferentes disolventes por medio de espectroscopía UV-Vis como se muestra en la **Figura 18**, se destaca que disuelto en condiciones más polares aumenta su máximo de absorción por el efecto batocrómico, estos se encuentran en la **Tabla 3**. El d-TBO⁺ tiene una diferencia de 20 nm aproximadamente entre su máximo de absorción y emisión en disolución amortiguadora, indicando un pequeño desplazamiento de Stokes que se relaciona con la transferencia de energía radiativa y no radiativa.

3.1.4. Determinación del rendimiento cuántico de fotoluminiscencia

Se determinó el rendimiento cuántico de fotoluminiscencia para el TBO⁺, d-TBO⁺ y dd-TBO⁺ con el método de las 4 curvas debido a que los fotosensibilizadores tienen una alta dispersión de la luz y baja fluorescencia. Se utilizaron ajustes de 3 mL del máximo de absorción de cada fotosensibilizador a 0,2, 0,5, 0,8 y 0,1 en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM a pH 7 y un filtro de densidad óptica de 3,0 en la entrada de excitación de la muestra.

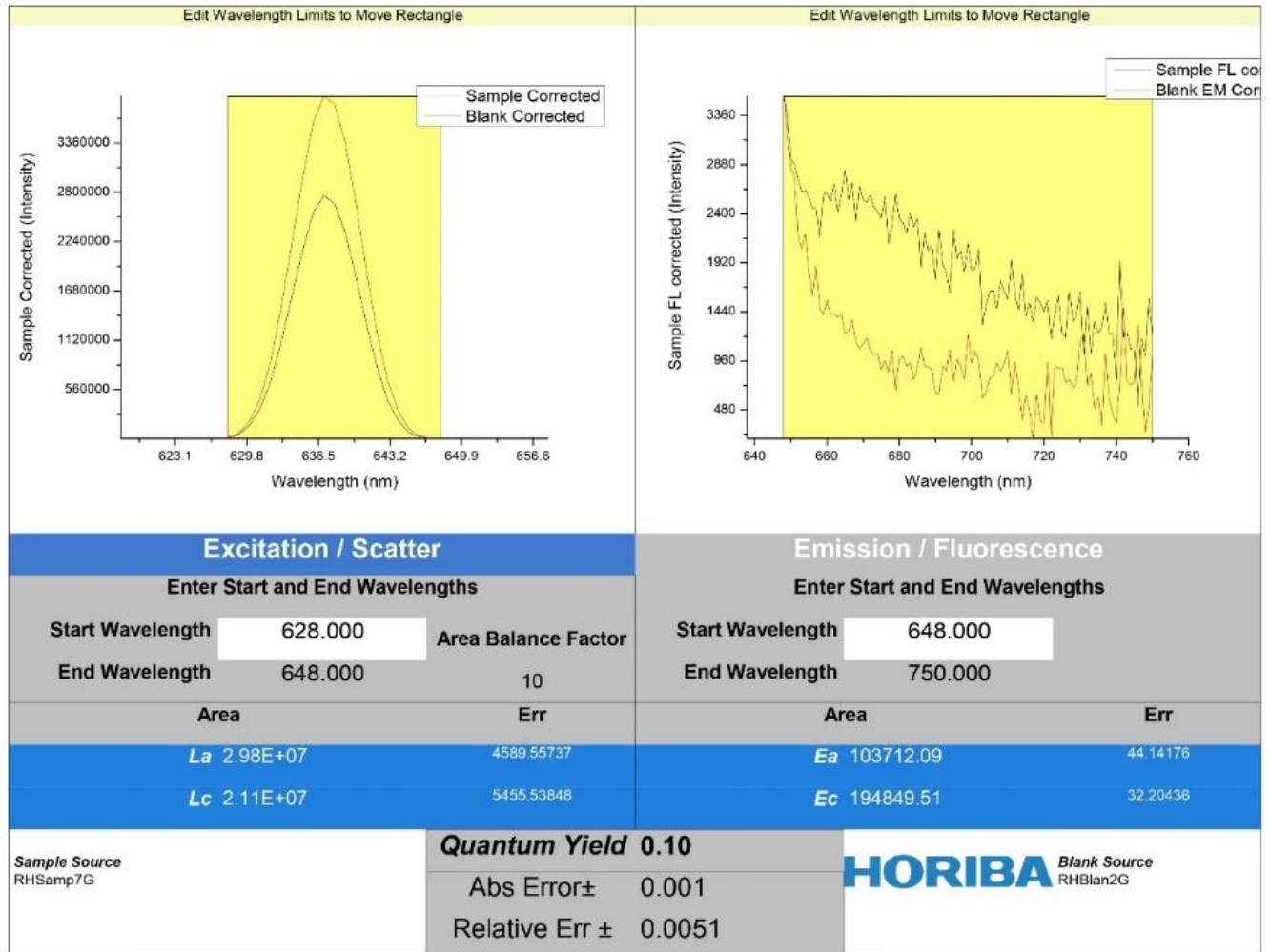


Figura 19. Rendimiento cuántico de fotoluminiscencia del TBO⁺ determinado con la esfera de integración.

En la **Figura 19** se muestra el resultado de la integración por el software del equipo para el rendimiento cuántico de fotoluminiscencia del TBO⁺ al ser excitado a los 638 nm con un slit de excitación y emisión de 5 nm. El valor de $\phi = 0,10$ con un error absoluto de $\pm 0,001$ y un error relativo del $\pm 0,0051$ para el TBO⁺ concuerda con su poca fluorescencia. Esto significa que el 10 % de los fotones que se absorben son emitidos como fluorescencia, por lo que el 90 % de los fotones o energía absorbida va hacia otros procesos como el decaimiento no radiativo o transferencia de energía (Robinson-Duggon *et al.*, 2019).

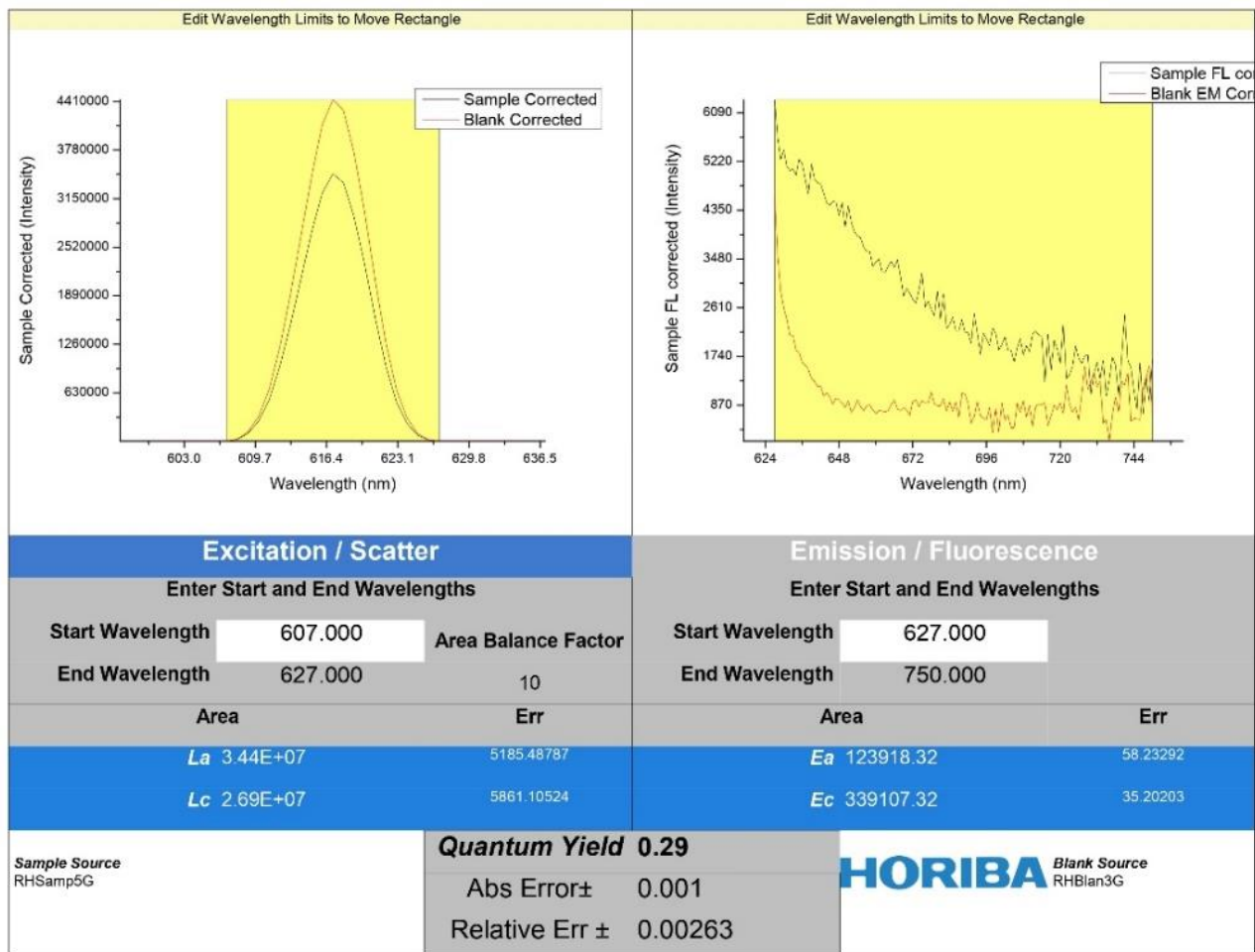


Figura 20. Rendimiento cuántico de fotoluminiscencia del d-TBO⁺ determinado con la esfera de integración.

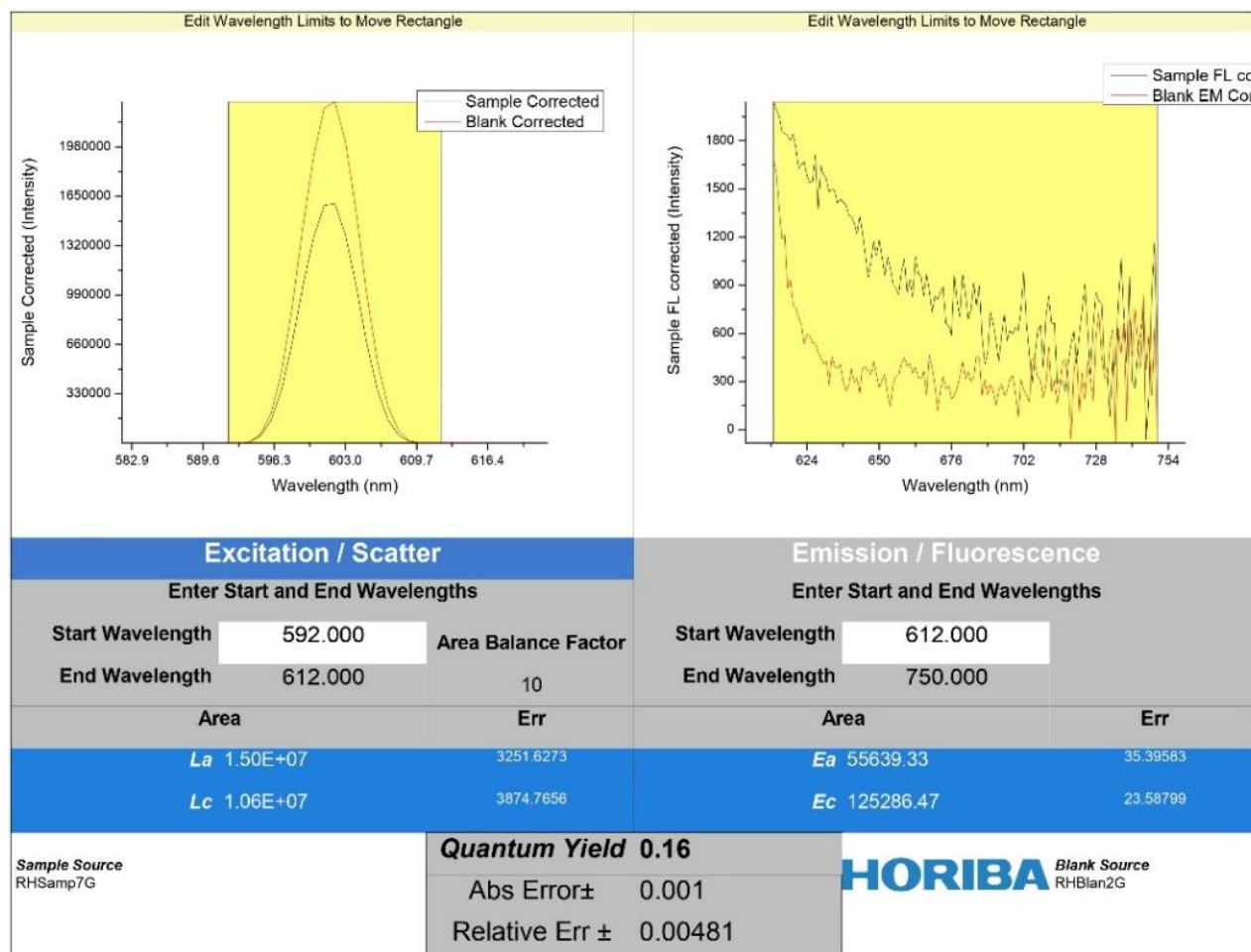


Figura 21. Rendimiento cuántico de fotoluminiscencia del dd-TBO⁺ determinado con la esfera de integración.

El d-TBO⁺ se excitó a 617 nm con slit de excitación y emisión de 5 nm. La integración en la **Figura 20** resultó en el $\phi = 0,29$ con un error absoluto de $\pm 0,001$ y error relativo de $\pm 0,00263$, esto indica que el 29 % de los fotones absorbidos por el d-TBO⁺ son emitidos por fluorescencia y el 71 % restante es dirigido a otros mecanismos de desactivación. En la **Figura 21** se muestra el resultado de la integración de las 4 curvas para el dd-TBO⁺ que se excitó a 602 nm con slit de excitación y emisión de 4 nm. El rendimiento $\phi = 0,16$ con un error absoluto de $\pm 0,001$ y error relativo de $\pm 0,00481$, esto indica que un 16 % de los fotones absorbidos son emitidos por el dd-TBO⁺ y el 84 % de su actividad restante se desactiva por medio de otros mecanismos.

Los valores se mantuvieron constantes para cada ajuste de absorbancia realizado y es congruente con la magnitud del rendimiento cuántico ya que es una propiedad intrínseca de cada fotosensibilizador sin importar la concentración utilizada, pero para la determinación del ϕ se utilizaron absorbancias que no ocasionen el efecto de autoabsorción. Como se observa en la **Tabla 4**, el d-TBO⁺ tiene el mayor rendimiento de los tres, esto significa que tiene mayor desactivación por medio de la emisión de los fotones absorbidos. El mayor rendimiento del d-TBO⁺ es congruente al también ser la especie con mayores unidades de fluorescencia en el espectro de emisión de la **Figura 17**. Por otra parte, el dd-TBO⁺ se encuentra en medio del TBO⁺ y d-TBO⁺, por lo que se esperaría mayor actividad en la desactivación de forma no radiativa hacia los mecanismos tipo I y II con transferencia de energía.

De estos comportamientos se puede establecer que la total desmetilación del TBO⁺ favorece el cruce entre sistemas hacia el estado triplete pero si se trata de una sola desmetilación ocurre lo contrario, por lo que los derivados son moléculas con configuraciones electrónicas propias y distinguibles entre sí. Como el dd-TBO⁺ también es producto de la desmetilación del d-TBO⁺, el 71 % de su actividad restante incluye propiedades fotooxidativas para la degradación de este. Ya se ha reportado el valor de 0,18 para el rendimiento cuántico de oxígeno singulete del TBO⁺ y restando el de fotoluminiscencia se estimaría un 72 % correspondiente al decaimiento no radiativo u otro mecanismo de desactivación.

Tabla 4. Resumen de rendimientos cuántico de fotoluminiscencia

Fotosensibilizador	ϕ	Error absoluto	Error relativo
TBO ⁺	0,10	± 0,001	± 0,0051
d-TBO ⁺	0,29	± 0,001	± 0,00263
dd-TBO ⁺	0,16	± 0,001	± 0,00481

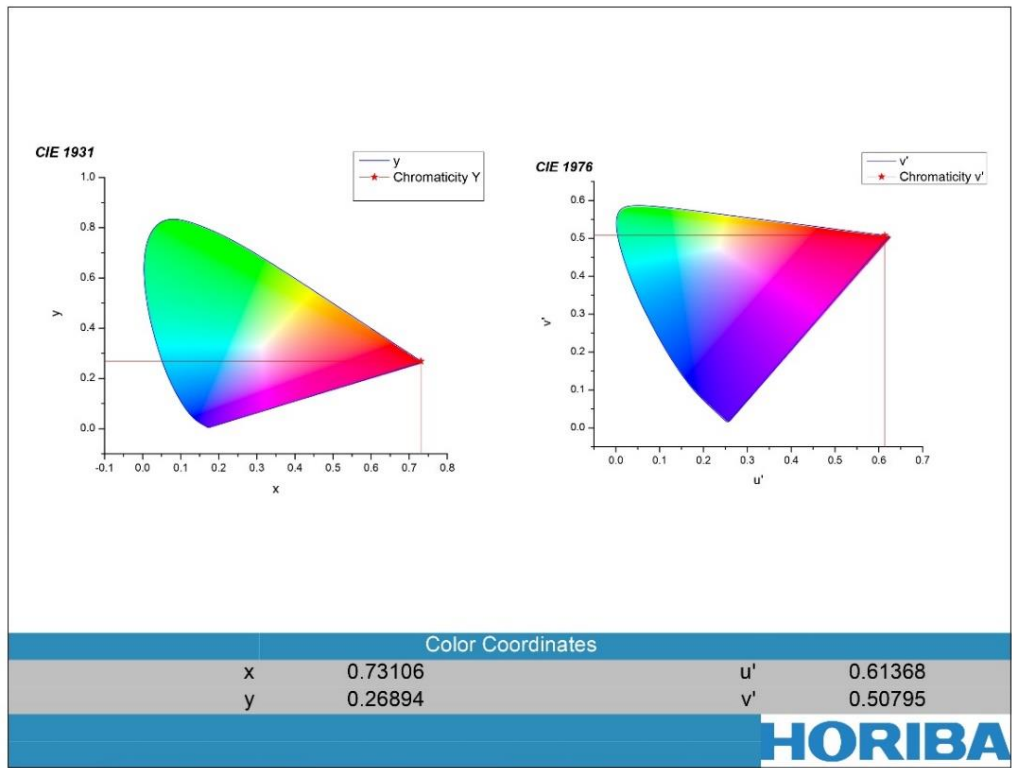


Figura 22. Diagrama de cromaticidad del TBO+.

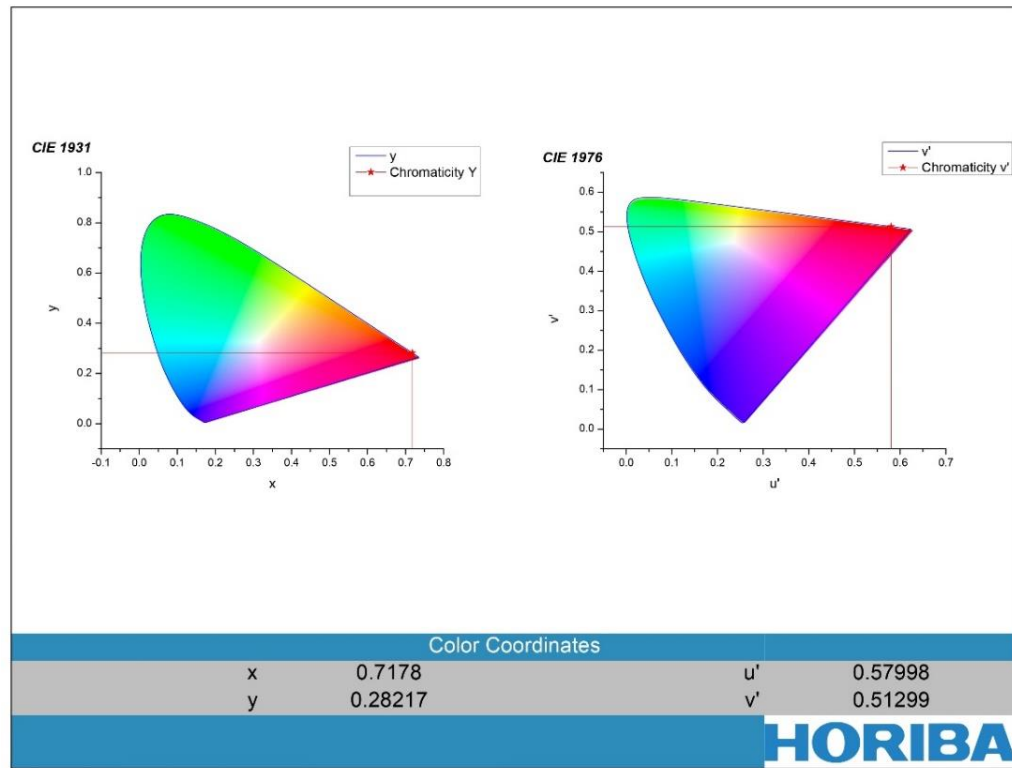


Figura 23. Diagrama de cromaticidad del d-TBO+.

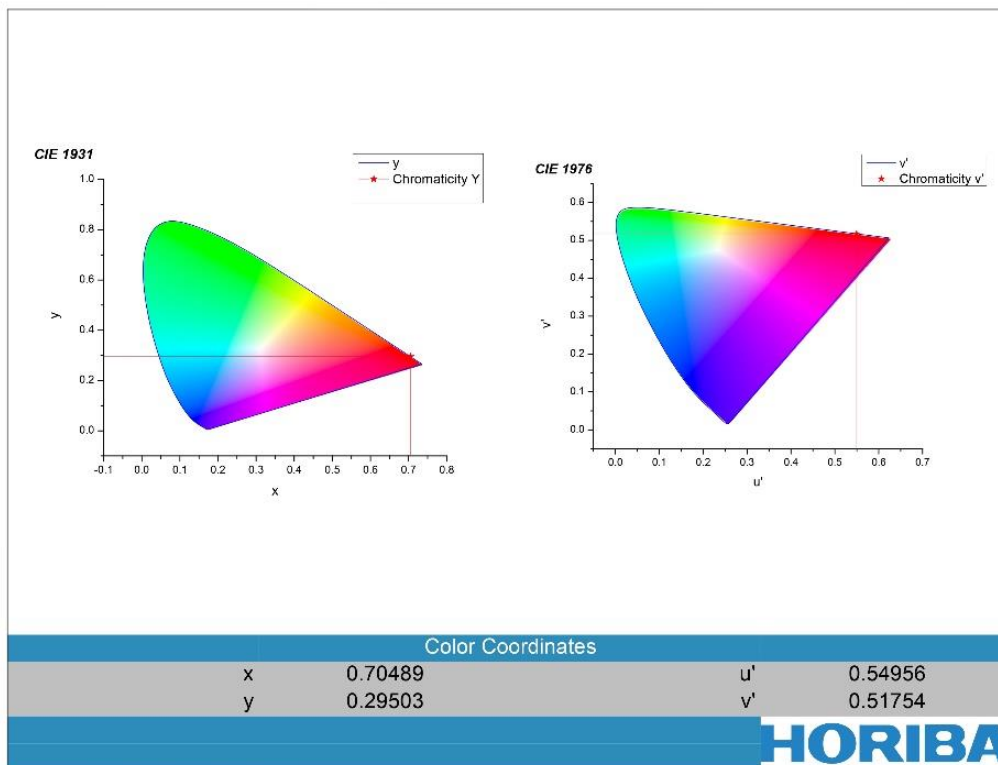


Figura 24. Diagrama de cromaticidad del dd-TBO⁺.

A partir de la determinación del rendimiento cuántico de fotoluminiscencia, se generó la cromaticidad del espectro de emisión de cada fotosensibilizador según la CIE 1931 y CIE 1976. Las gráficas de cromaticidad indicaron el color correspondiente a la emisión de cada fotosensibilizador en coordenadas. Como se observa en las **Figuras 22-24**, los tres fotosensibilizadores emiten colores espectrales que se encuentra en el borde de los diagramas de cromaticidad, esto significa que emiten colores que pueden ser captados por el ojo humano y reproducidos digitalmente. También cabe destacar que no se observa un desplazamiento significativo en el diagrama CIE 1976, así como los tres fotosensibilizadores emiten colores cercanos al naranja y rojo, siendo el más rojizo el TBO⁺ y desplazándose hacia el naranja desde del d-TBO⁺ al dd-TBO⁺ como se observa en la **Figura 25**.

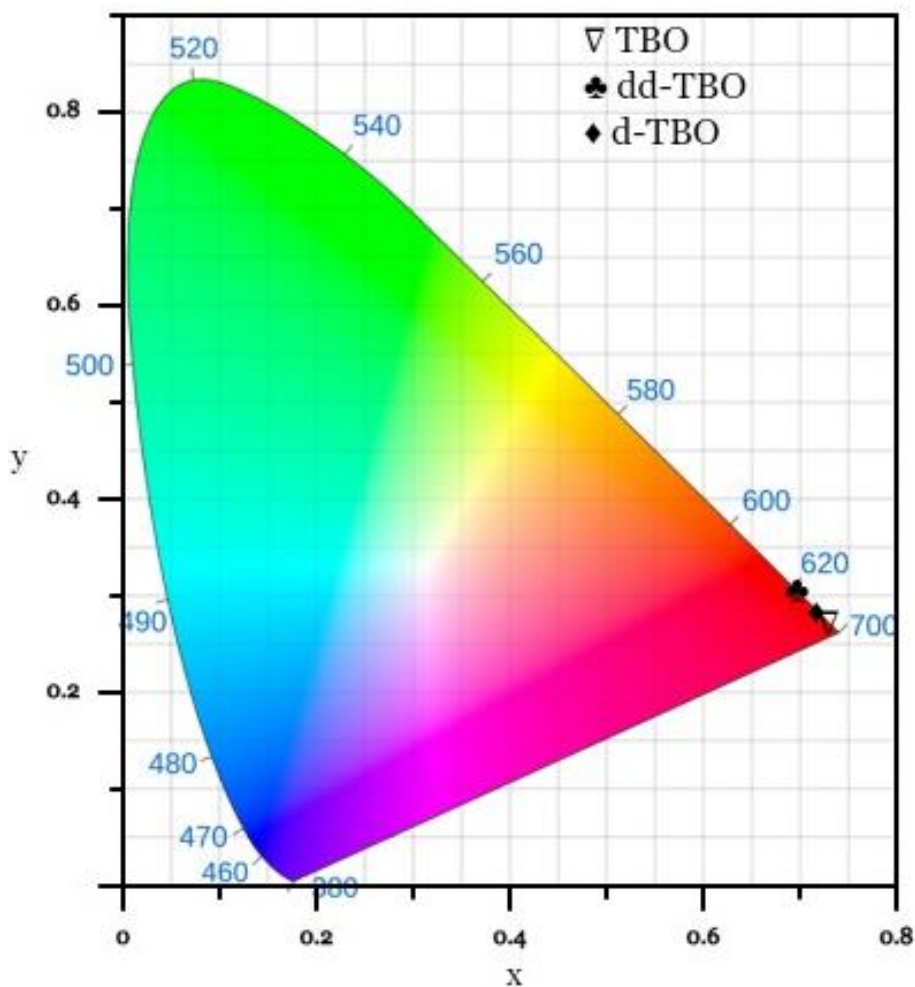


Figura 25. Diagrama de cromaticidad CIE 1931 con las coordenadas del TBO⁺, d-TBO⁺ y dd-TBO⁺ obtenido de Hasabeldaim *et al.* (2023).

3.2. Determinación de la asociación del derivado mono desmetilado (d-TBO⁺) del Azul de toluidina con el CB[7].

3.2.1. Titulación espectrofotométrica del CB[7] y CB[8]

La concentración de CB[7] y CB[8] se determinó a partir de la titulación espectrofotométrica con el Cary 60 UV-Vis siguiendo la metodología planteada por Yi y Kaifer (2011) con el cobaltoceno a concentraciones específicas para cada molécula encapsuladora y agregando volúmenes de cada una hasta llegar a un punto de equivalencia en que se puede despejar la concentración de cada disolución preparada de CB[7] o CB[8].

Para cada caso, se pesaron y disolvieron cada encapsulador según su solubilidad en agua y se realizó la titulación espectrofotométrica.

Con el CB[7] se ajustó la absorbancia del Cob⁺ a 0,6 en su longitud de onda máxima de 261 nm que corresponde a 17,54 μM, esta lectura se tomó como el valor a 0 μL de CB[7] y se tomaron lecturas cada 8 μL de CB[7] añadidos hasta los 120 μL como se observa en la **Figura 26**. Una vez terminada la titulación se determinó la concentración de 1 289 μM de CB[7] con las ecuaciones de las rectas azul y roja en la **Figura 27**.

Volumen CB[n] (μL)	A 261 nm
0	0.60073
8	0.55818
16	0.53167
24	0.50195
32	0.47422
40	0.45292
48	0.44918
56	0.44241
64	0.44390
72	0.44051
80	0.44001
88	0.43891
96	0.43664
104	0.43829
112	0.43562
120	0.43507

Epsilon Cob ⁺ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	3.42E+04	Punto de equivalencia (μL)	40.88
Concentración Cob ⁺ (M)	1.757E-05	Pendiente azul	-0.0036
		Intercepto azul	0.5928
		Pendiente roja	-2.00E-04
Concentración CB[n]	1.28896E-03	Intercepto roja	0.4538

Figura 26. Determinación de la concentración del CB[7] en Cob⁺ en agua grado LC-MS. Recolección de los datos a la longitud de onda máxima del Cob⁺.

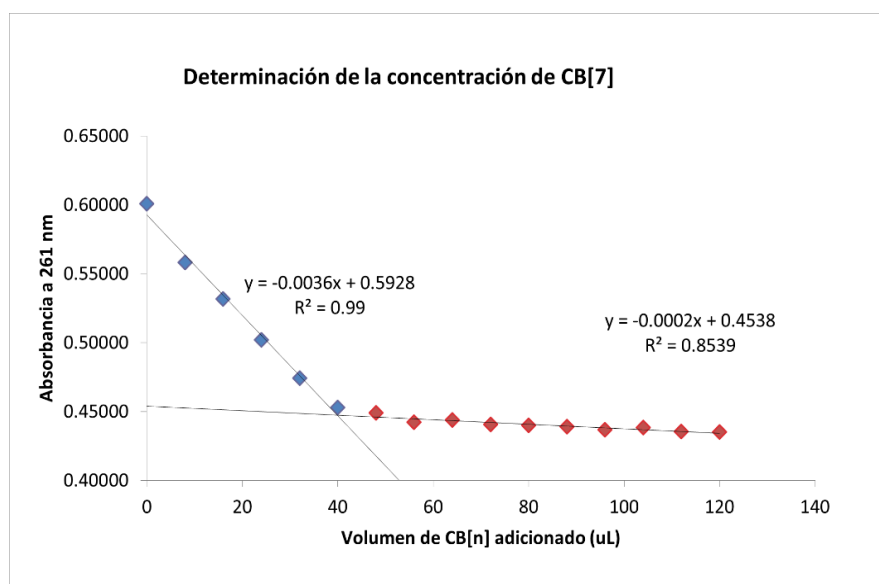


Figura 27. Titulación espectrofotométrica del CB[7] en agua grado LC-MS.

Igualmente, se tituló el CB[8] ajustando la absorbancia a 0,15 en la longitud de onda máxima del Cob⁺ correspondiente a 4,39 μM y se tituló en incrementos de 30 μL de CB[8] hasta los 390 μL. Se determinó que la concentración de 72 μM de CB[8] como se observa en la **Figura 28** mediante los valores de las ecuaciones de la recta en la **Figura 29**. Una vez conocidas las concentraciones de las disoluciones con macrociclos, se pudo proceder a su utilización en experimentos posteriores.

CB[8] (μL)	A 261 nm	A 261 nm (corregida)	
0	0.15088	0.15088	
30	0.14119	0.14261	
60	0.13424	0.13692	
90	0.12229	0.12596	
120	0.11856	0.12330	
150	0.10874	0.11418	
180		0.10765	0.11411
210		0.10574	0.11314
240		0.10507	0.11348
270		0.10497	0.11441
300		0.10394	0.11434
330		0.10161	0.11278
360		0.10259	0.11490
390		0.10226	0.11556

Epsilon Cob ⁺ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	3.42E+04	Punto de eq. (μL)	184.06
Concentración Cob ⁺ (M)	4.412E-06	Pendiente azul	-0.0002
		Intercepto azul	0.1503
Concentración CB[8]	7.19E-05	Pendiente roja	7.00E-06
		Intercepto roja	0.1122

Figura 28. Determinación de la concentración del CB[8] en Cob⁺ en agua grado LC-MS. Recolección de los datos a la longitud de onda máxima del Cob⁺.

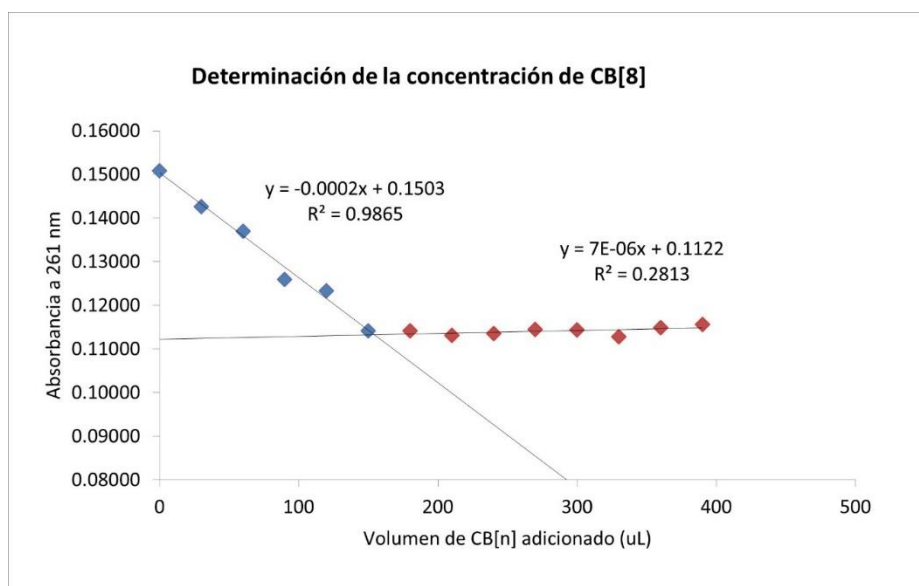


Figura 29. Titulación espectrofotométrica del CB[8] en agua grado LC-MS.

3.2.2. Encapsulación supramolecular del fotosensibilizador en CB[7] y CB[8]

Se realizó un barrido en el espectrofotómetro UV-Vis para tres disoluciones en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7: el derivado d-TBO⁺ a 2 μM, el d-TBO⁺ a 2 μM con CB[7] a 50 μM y el d-TBO⁺ a 2 μM con CB[8] a 35 μM. Los tres barridos se muestran en la **Figura 30** donde se pueden observar diferencias en cada lectura. La absorbancia del d-TBO⁺ a 615 nm cambió en ambas disoluciones con los macrociclos, dando en ambos casos un desplazamiento hacia el azul como se indica en la **Tabla 5**. Este desplazamiento en la absorbancia indica la formación de una especie diferente, en este caso los complejos de inclusión con CB[7] y CB[8], siendo distinguibles entre sí con un mayor desplazamiento para el complejo d-TBO⁺@CB[8] que para el complejo d-TBO⁺@CB[7], lo cual puede explicarse por el mayor tamaño de la cavidad del CB[8] que puede incluir dos moléculas de d-TBO⁺, este es un comportamiento previamente observado por Robinson-Duggon *et al.* (2017).

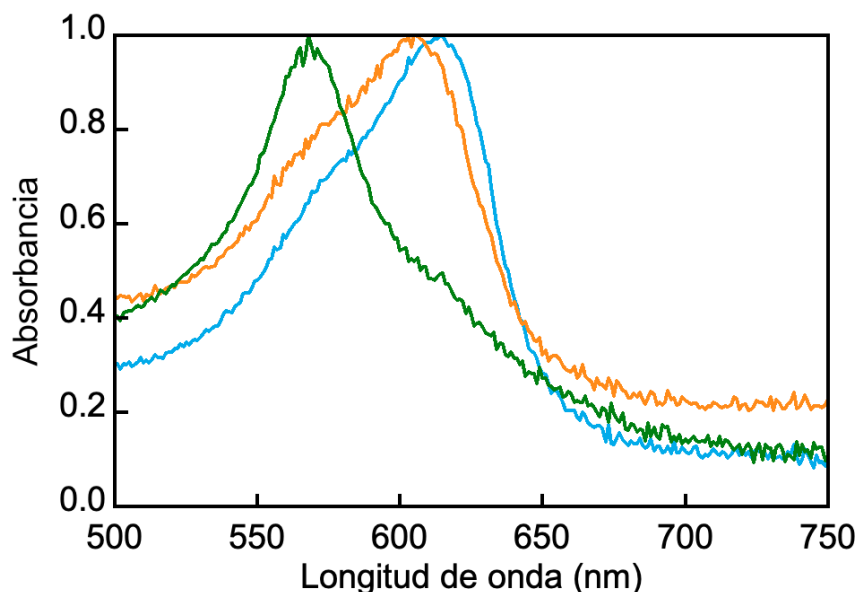


Figura 30. Espectro de absorción UV-Vis normalizada del d-TBO⁺ y los complejos de inclusión en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7. Se representa el d-TBO⁺ (línea celeste), el complejo de inclusión d-TBO⁺@CB[7] (línea naranja) y el complejo de inclusión d-TBO⁺@CB[8] (línea verde).

De la misma manera se realizó la lectura de cada disolución en el fluorímetro para recolectar el espectro de emisión como se muestra en la **Figura 31**, en esta se observa el cambio en la emisión para los complejos de inclusión que fueron excitados en su máximo de absorción, para el CB[8] ocurrió una disminución en la fluorescencia debido al autoapagamiento de la excitación que ocurre entre las dos moléculas dentro de la cavidad del macrociclo. Para el complejo con CB[7] se observó una disminución de la fluorescencia en comparación con la molécula sola y en ambos complejos de inclusión ocurrió desplazamiento hacia en azul en las longitudes de onda de máximas de absorción y emisión, como se indican en la **Tabla 5**.

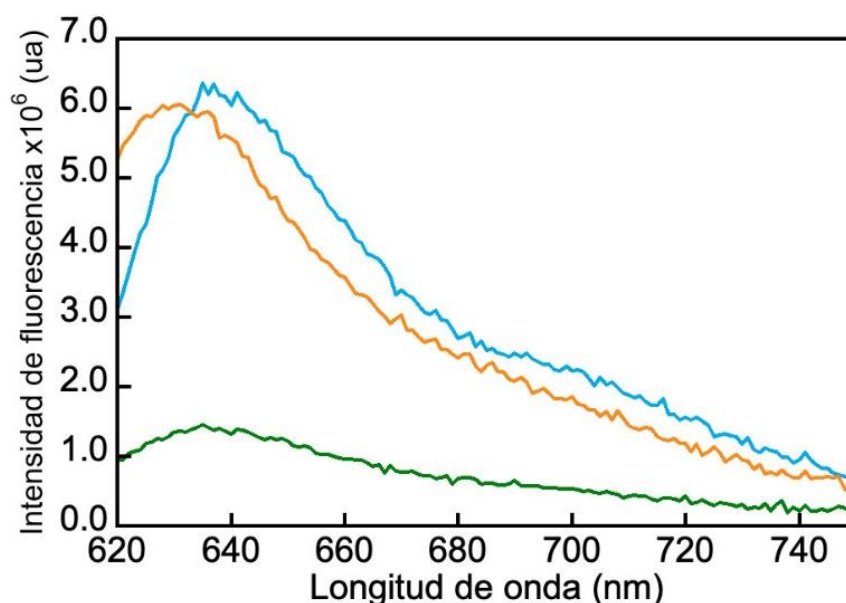


Figura 31. Espectro de emisión de fluorescencia del d-TBO⁺ y los complejos de inclusión en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7. Se representa el d-TBO⁺ (línea celeste), el complejo de inclusión d-TBO⁺@CB[7] (línea naranja) y el complejo de inclusión d-TBO⁺@CB[8] (línea verde).

Tabla 5. Máximos de absorción y emisión del d-TBO⁺ en los complejos de inclusión en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7

Muestra	Máximo de absorción	Máximo de emisión
d-TBO ⁺	615 nm	635 nm
d-TBO ⁺ @CB[7]	605 nm	631 nm
d-TBO ⁺ @CB[8]	568 nm	635 nm

Seguida a la caracterización espectroscópica de los complejos con los macrociclos, se inyectaron las disoluciones en agua grado LC-MS en el espectrómetro de masas con ionización positiva. Para la **Figura 32** y la **Figura 33** se utilizó el CB[7] a 200 μM para lograr una saturación del macrociclo y asegurar que el d-TBO⁺ a 5 μM en el medio estuviera totalmente encapsulado. En el espectro de la **Figura 32** se logran visualizar las señales características del CB[7], como $m/z = 604,1$ que corresponde al pico base y al ion $[\text{CB7} + 2\text{Na}]^{2+}$ dividiendo entre dos su masa inicial de 1 163 g/mol más dos iones de sodio. También se observan señales producidas por dividir entre dos a $m/z = 1 185,4$ con $[\text{CB7} + \text{Na}]^+$, 620,0 con $[\text{CB7} + 2\text{K}]^{2+}$ y 601,2 con $[\text{CB7} + \text{K}]^+$.

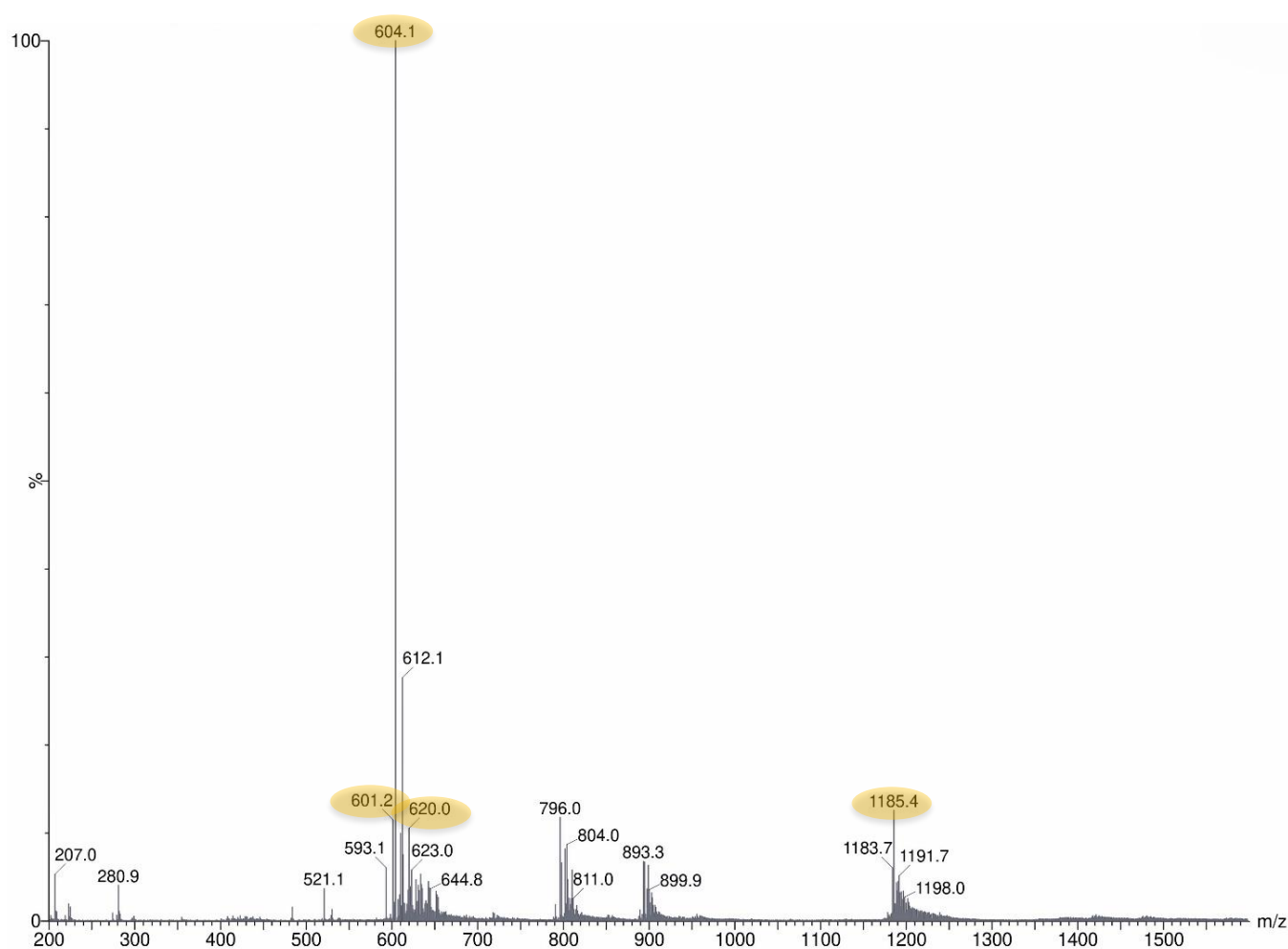


Figura 32. Espectro de masas ESI⁺ del curcubit[7]urilo en agua grado LC-MS.

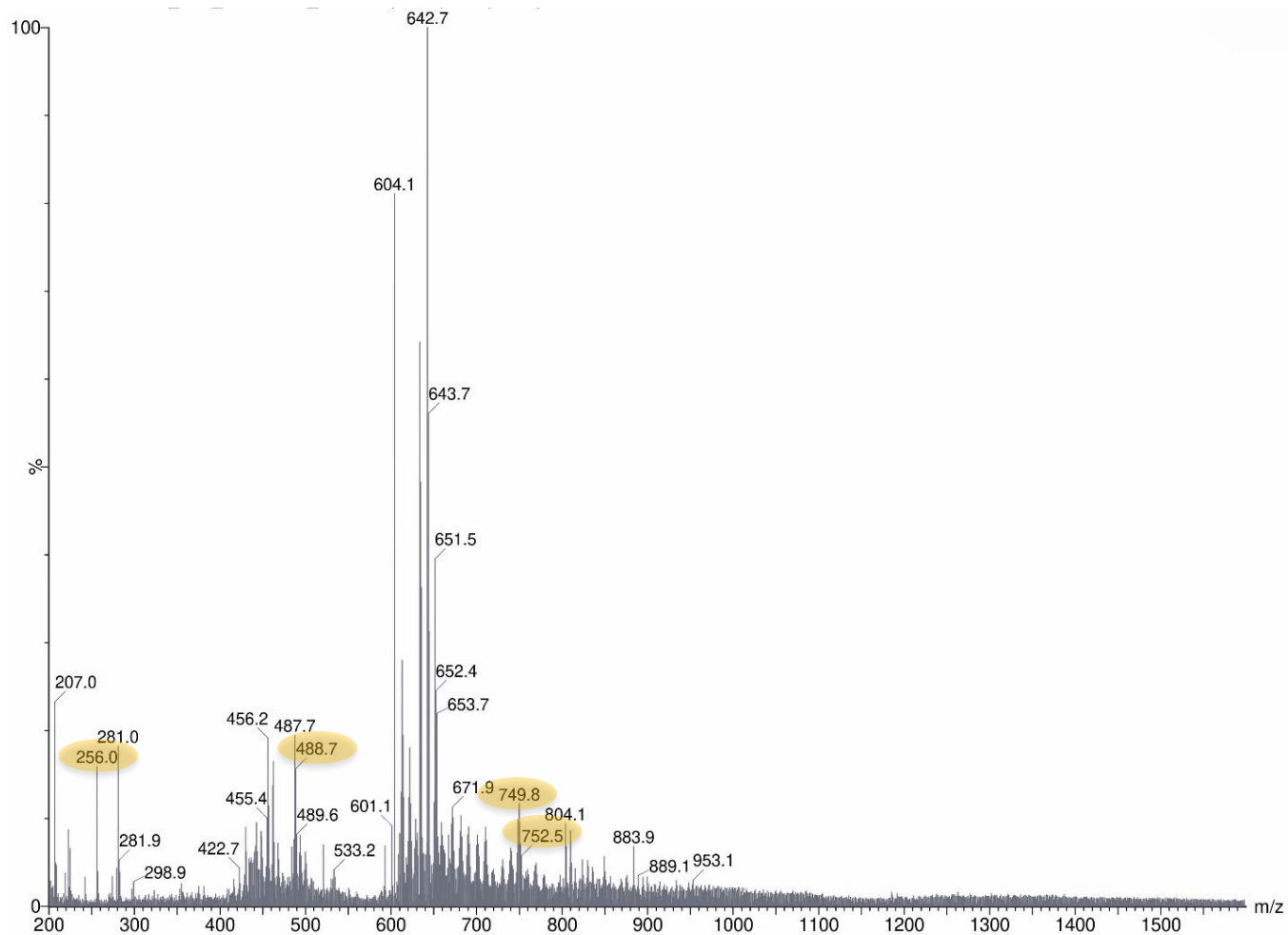


Figura 33. Espectro de masas ESI⁺ del d-TBO⁺ encapsulado en curcubit[7]urilo en formando el complejo (d-TBO⁺@CB[7]) en agua grado LC-MS.

Para el complejo propuesto de d-TBO⁺@CB[7] se lograron identificar las señales a $m/z = 749,8$ que correspondería al ion $[\text{CB7} + 2\text{K} + \text{d-TBO}]^{3+}$ y $m/z = 752,5$ para el ion $[\text{CB7} + 2\text{Na} + \text{K} + \text{d-TBO}]^{4+}$ si se divide entre dos. Dividiendo entre tres se identificó el ion $m/z = 488,7$ $[\text{CB7} + 2\text{Na} + \text{d-TBO}]^{3+}$ y también se observa el ion $m/z = 256,0$ correspondiente al d-TBO⁺ en disolución que no fue encapsulado por el CB[7]. Si se comparan la **Figura 32** con la **Figura 33** se observan señales características de cada espectro y se pueden destacar dos áreas importantes que están en el espectro de d-TBO⁺@CB[7] que son entre $m/z = 400$ a 550 y $m/z = 660$ a 780 , en estos rangos no se observan señales en el espectro del CB[7] solo por lo que demuestra la existencia de más iones que pueden representar el complejo de inclusión 1:1 con d-TBO⁺.

De igual modo se realizó la inyección del CB[8] a $110 \mu\text{M}$ solo y con d-TBO⁺ $5 \mu\text{M}$. En la **Figura 34** se observa el espectro de masas característico para el CB[8] del que destaca la señal de $m/z = 695,2$ de $[\text{CB8} + \text{K} + \text{Na}]^{2+}$ como el pico base al dividir entre dos a 1329 g/mol más un ion de potasio y un ion de sodio. También se observan señales como $m/z = 687$ del ion $[\text{CB8} + 2\text{Na}]^{2+}$, $m/z = 703$ del ion $[\text{CB8} + 2\text{K}]^{2+}$ y $m/z = 684$ del ion $[\text{CB8} + \text{K}]^{+}$ dividiendo entre dos. La señal $m/z = 469$ corresponde al ion $[\text{CB8} + 2\text{K}]^{2+}$ dividido entre tres. Los valores observados en los espectros de masas del CB[7] y CB[8] son iguales a los reportados por Da Silva *et al.* (2011).

En el espectro de d-TBO⁺@CB[8] de la **Figura 35** se observaron nuevas señales a diferencia del espectro en la **Figura 34**. La señal de $m/z = 940,5$ correspondería al ion $[\text{CB8} + 2\text{NH}_4 + 2\text{H} + 2\text{d-TBO}]^{6+}$ y $m/z = 960,5$ al ion $[\text{CB8} + 2\text{d-TBO} + 2\text{K}]^{4+}$ dividido entre dos, el $m/z = 543,6$ del ion $[\text{CB8} + \text{d-TBO} + 2\text{Na}]^{+}$ dividido entre tres. También se observa el d-TBO⁺ presente en el medio por la señal de $m/z = 256$. Los iones moleculares establecidos para los complejos de inclusión se resumen en la **Tabla 6**.

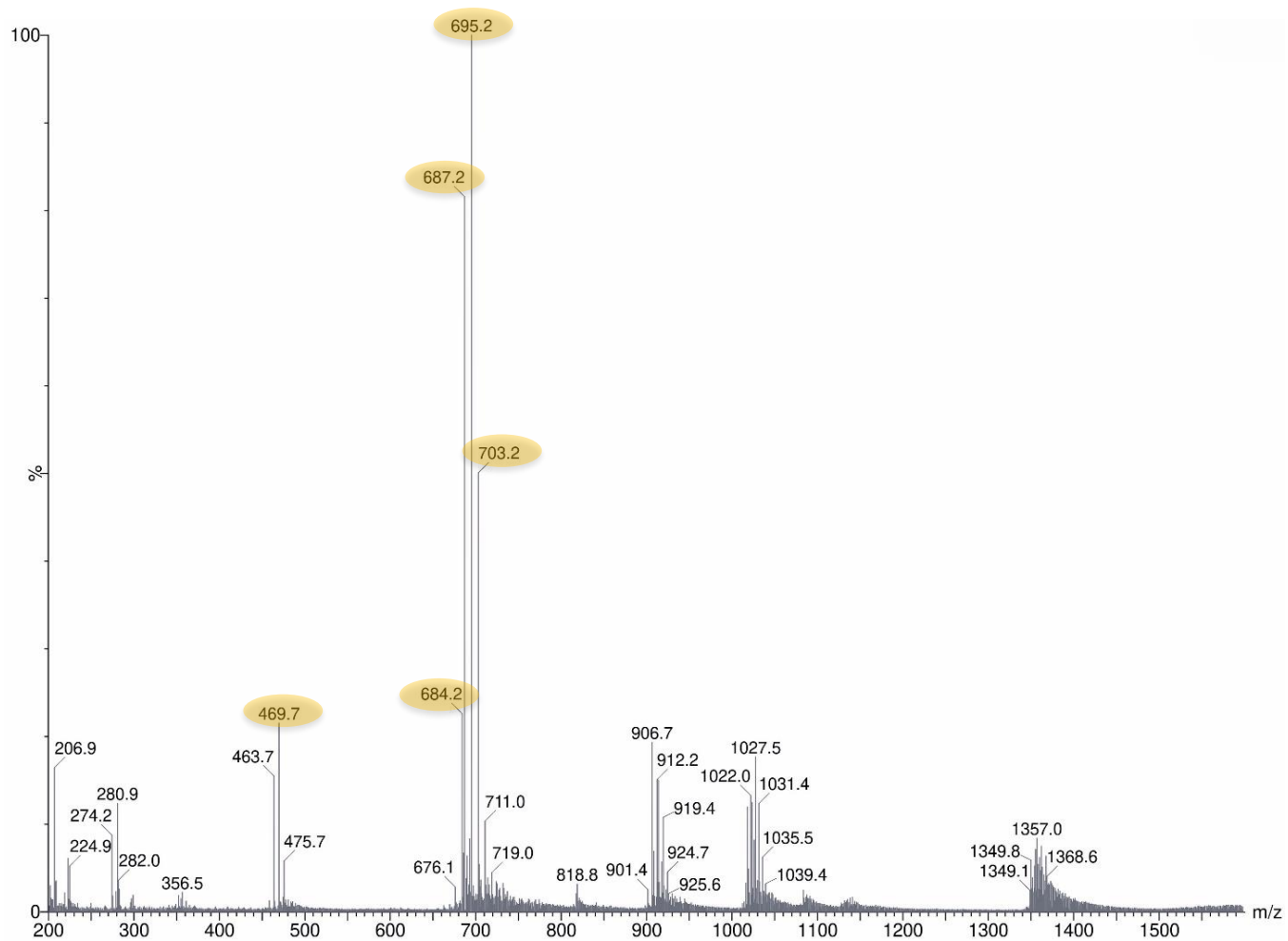


Figura 34. Espectro de masas ESI⁺ del curcubit[8]urilo en agua grado LC-MS.

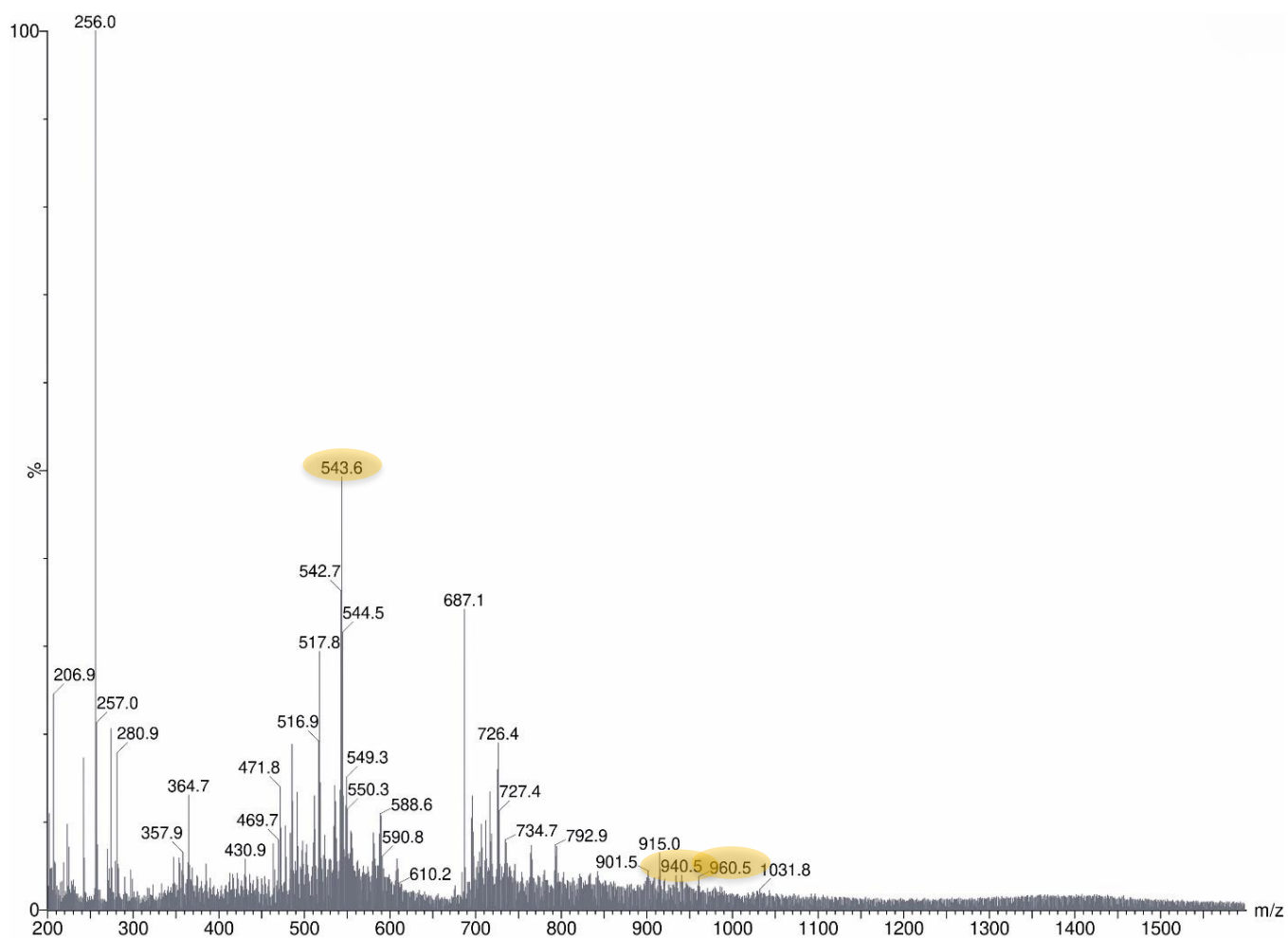


Figura 35. Espectro de masas ESI⁺ del d-TBO⁺ encapsulado en curcubit[8]urilo en formando el complejo (d-TBO⁺@CB[8]) en agua grado LC-MS.

Tabla 6. Resumen de los iones moleculares de los complejos de inclusión del d-TBO⁺ con CB[7] y CB[8].

Ion	<i>m/z</i>
[CB7 + 2K + d-TBO] ³⁺	749,8
[CB7 + 2Na + K + d-TBO] ⁴⁺	752,5
[CB7 + 2Na + d-TBO] ³⁺	488,7
[CB8 + 2NH ₄ + 2H + 2d-TBO] ⁶⁺	940,5
[CB8 + 2d-TBO + 2K] ⁴⁺	960,5
[CB8 + d-TBO + 2Na] ⁺	543,6

3.2.3. Determinación de la constante de asociación con CB[7] y CB[8]

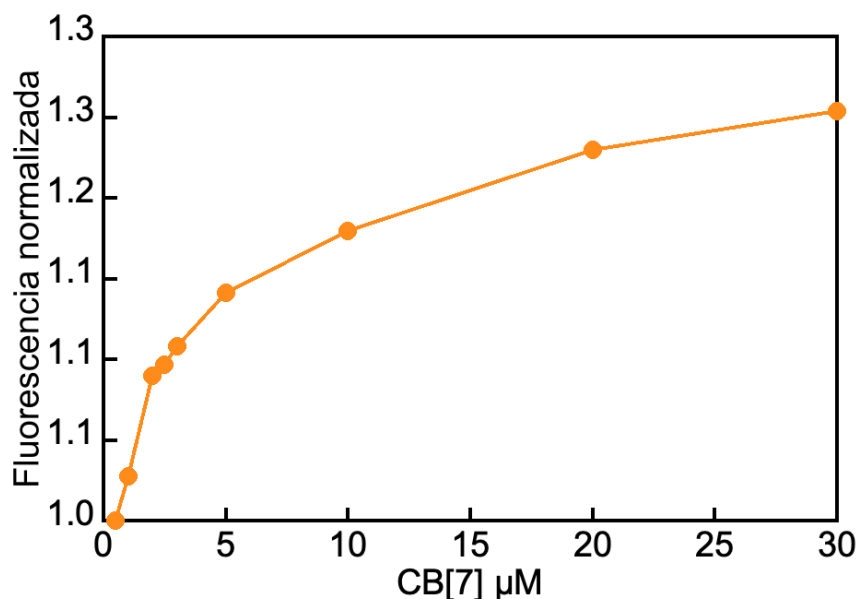


Figura 36. Curva de unión del complejo d-TBO⁺@CB[7] en PB.

Después de la verificación de la encapsulación supramolecular del d-TBO⁺ se procedió a determinar la constante de asociación del complejo d-TBO⁺@CB[7] por medio de una isoterma de asociación en observación de la fluorescencia al excitar cada punto a 550 nm al ser una longitud de onda con absorbancia constante para el fotosensibilizador y el complejo. Se observa en la **Figura 36** la curva producida por las lecturas al aumentar la concentración de CB[7] y mantener constante al d-TBO⁺. También se realizó la isoterma de asociación del complejo d-TBO⁺@CB[8] excitando a 570 nm cada punto como se observa en la **Figura 37**.

Con el software de *Scientist* se determinó una constante de asociación de $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ del d-TBO⁺@CB[7] y de $9,35 \times 10^{12} \text{ M}^{-2}$ para el d-TBO⁺@CB[8] como se muestra en la **Tabla 7**. Las constantes de asociación se determinaron para complejos 1:1 para el d-TBO⁺@CB[7] y 2:1 para el d-TBO⁺@CB[8] y se observa una mayor afinidad hacia el CB[8] y constantes de menor magnitud en comparación con los complejos de TBO⁺, esto puede explicarse debido a la pérdida de un metilo que afectará en las interacciones electroestáticas con los grupos carbonilos en los extremos de los macrociclos, como indica Robinson-Duggon *et al.* (2017).

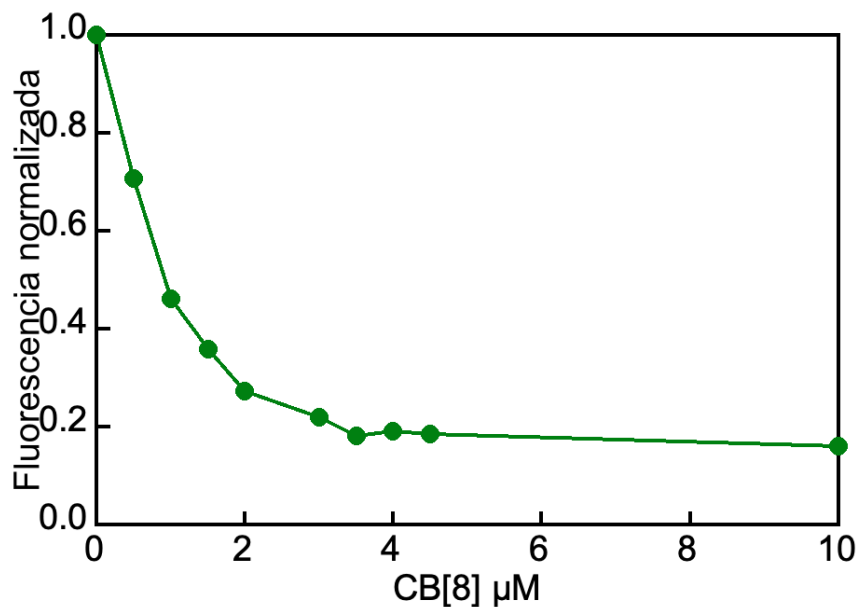


Figura 37. Curva de unión del complejo d-TBO⁺@CB[8] en PB.

Tabla 7. Valores obtenidos con el software *Scientist* para las constantes de asociación del d-TBO⁺ con CB[7] y CB[8].

Nombre	d-TBO ⁺ CB[7]	d-TBO ⁺ @CB[8]
β_{11}	$2,494 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	$9,3466 \times 10^{12} \text{ M}^{-2}$

3.2.4. Determinación indirecta del oxígeno singlete

Para determinar indirectamente la generación de oxígeno singlete se utilizó el Ácido 9,10-antraceniil-bis (metileno) dimalónico o ABMA a 1,6 μM que es una sonda molecular que desactiva el oxígeno singlete ya que este oxida las insaturaciones en el ABMA y genera una disminución en la fluorescencia de este. Se realizaron variaciones experimentales utilizando el ABMA junto aditivos como el hexacianoferrato de tripotasio o FeCy a 1 mM y azida de sodio (NaN₃) a 2 mM en presencia de d-TBO⁺ a 4 μM solo y encapsulado en CB[7] 50 μM y CB[8] 35 μM en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7 y en agua deuterada (D₂O).

Todas las mediciones se hicieron irradiando con luz ámbar con el máximo en un rango de 590-610 nm por 30 minutos y tomando lecturas cada 3 minutos. Esta luz se utilizó al

proporcionar una excitación más cercana al máximo de absorción de 615 nm del fotosensibilizador y por lo tanto asegura la máxima generación de oxígeno singlete por el d-TBO⁺. Se excitó el ABMA a 395 nm, se colectaron los datos de 400 a 550 nm y graficaron según la emisión a 407 nm. Todas las lecturas se realizaron por duplicado.

Primeramente, se hizo una comparación de la generación de oxígeno singlete entre el TBO⁺, d-TBO⁺ y dd-TBO⁺. Los tres fotosensibilizadores se ajustaron a 0,16 de absorbancia a los 600 nm ya que es una longitud de onda en que los tres absorben e impacta la luz ámbar. En la **Figura 38** se observa que el TBO⁺ es el que menos disminución de fluorescencia causó al ABMA, seguido del d-TBO⁺ y el dd-TBO⁺ como la mayor disminución de fluorescencia. Este comportamiento indica que dd-TBO⁺ es el fotosensibilizador que genera la mayor cantidad de oxígeno singlete y que la desmetilación del TBO⁺ favorece el decaimiento no radiativo, el cruce entre sistemas hasta el estado triplete y la mayor transferencia de energía o mecanismo tipo II que se traduce como mayor generación de oxígeno singlete en su forma de desactivación energética. El TBO⁺ y el d-TBO⁺ pueden tener desactivaciones energéticas más relacionadas al mecanismo tipo I o la emisión de fluorescencia.

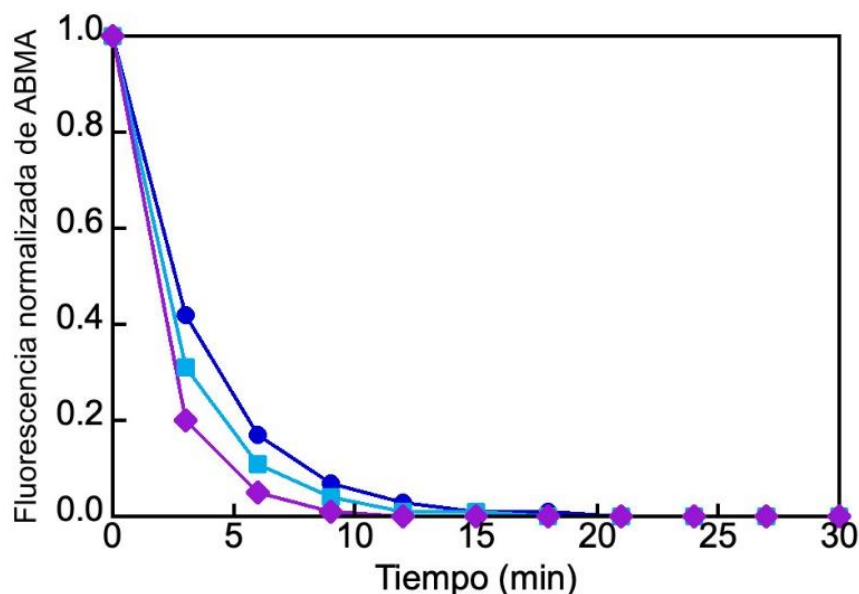


Figura 38. Irradiación del TBO⁺ y sus derivados con ABMA. Fluorescencia normalizada de ABMA (1,6 μ M) irradiado por 30 min con luz ámbar en presencia de TBO⁺ (marcadores azules), d-TBO⁺ (marcadores celestes) y dd-TBO⁺ (marcadores morados) en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7.

En otra ocasión se realizó una segunda adición de ABMA $1,6 \mu\text{M}$ a la celda de irradiación después de 30 minutos y se registró si aún se generaba oxígeno singlete capaz de oxidar al ABMA agregado. En la **Figura 39** se puede observar como la tendencia a disminuir la fluorescencia del ABMA se mantiene hasta los 60 minutos de irradiación, esto demuestra que los fotosensibilizadores pueden mantener su efectividad por mayores periodos de tiempo, indicativo de su regeneración y estabilidad. También se observó que en la segunda adición del ABMA la oxidación de este no ocurrió con igual rapidez que en la primera adición, indicando que la cantidad de oxígeno singlete es menor a la inicial, pero aún es significativa para el ABMA a $3,2 \mu\text{M}$ y mayor para los derivados desmetilados, con más efecto del dd-TBO⁺.

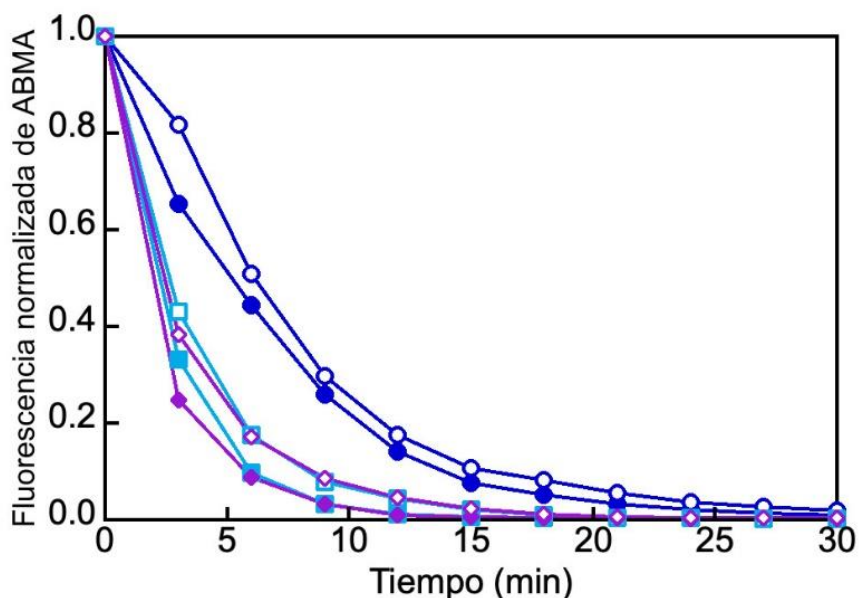


Figura 39. Irradiación del TBO⁺ y sus derivados con ABMA a 30 y 60 minutos. Fluorescencia normalizada de ABMA a $1,6 \mu\text{M}$ cada 30 min irradiado con luz ámbar en presencia de TBO⁺ (marcadores azules rellenos), d-TBO⁺ (marcadores celestes rellenos) y dd-TBO⁺ (marcadores morados rellenos) los primeros 30 min y TBO⁺ (marcadores azules huecos), d-TBO⁺ (marcadores celestes huecos) y dd-TBO⁺ (marcadores morados huecos) a los 60 min en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7.

La segunda adición de ABMA $1,6 \mu\text{M}$ provoca el aumento de la fluorescencia como se observa en la **Figura 40** a los 30 min, la irradiación a partir de la segunda adición se siguió normalizando con la señal a los 0 min. Para el d-TBO⁺ y dd-TBO⁺ fue igual pero menor para el TBO⁺. La menor disminución de la fluorescencia a partir de la segunda adición a los 30 min pudo haber ocurrido por el fotoblanqueo de los fotosensibilizadores que limitan la actividad fotoquímica de estos.

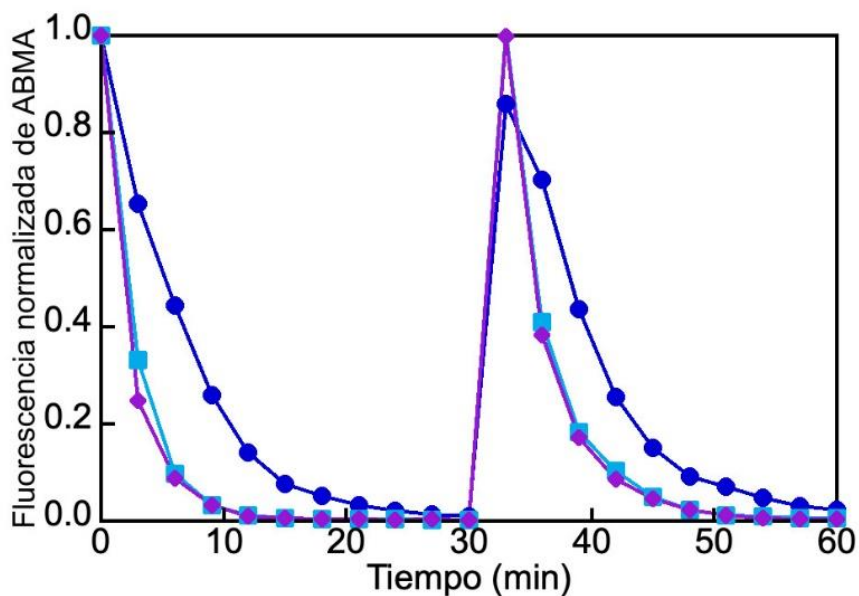


Figura 40. Irradiación del TBO⁺ y sus derivados con ABMA a 30 y 60 minutos con normalización inicial. Fluorescencia normalizada de ABMA a $1,6 \mu\text{M}$ irradiado con luz ámbar en presencia de TBO⁺ (marcadores azules), d-TBO⁺ (marcadores celestes) y dd-TBO⁺ (marcadores morados) por 60 min con adición de ABMA $1,6 \mu\text{M}$ a los 30 min.

En la **Figura 41** se observan todas las lecturas del d-TBO⁺ solo y encapsulado en disolución amortiguadora de fosfato a pH 7 y en agua deuterada con slit de excitación y emisión de 1 nm. El d-TBO⁺ solo genera mayor cantidad de oxígeno singlete que encapsulado, el d-TBO⁺@CB[7] genera menor cantidad en los primeros minutos de la irradiación pero a medida que llega a los 30 minutos alcanza el mismo nivel que el d-TBO⁺, esto ocurre porque el d-TBO⁺ encapsulado en la cavidad hidrofóbica del CB[7] tiene menor contacto con el medio acuoso y por lo tanto menor acceso a oxígeno para que ocurra la transferencia de energía y la generación de oxígeno singlete. La encapsulación en CB[7] puede proporcionar protección al fotosensibilizador y durabilidad, además de ser un medio de transporte favorable para la TFD. Por otra parte, el d-TBO⁺@CB[8] genera menos oxígeno

singlete durante todo el tiempo de irradiación, esto se explica por el autoapagamiento que ocurre en la excitación de ambas moléculas en la cavidad del CB[8], proceso que se adiciona a la restricción de oxígeno para el d-TBO⁺ por lo que el oxígeno singlete se desfavorece o mantiene en el tiempo, más no aumenta (Robinson-Duggon *et al.*, 2017).

La irradiación realizada en agua deuterada favorece un mayor tiempo de vida del oxígeno singlete en el sistema ya que es de 60 μ s a diferencia de 4 μ s en agua (Cáceres, J. *et al.*, 2017). Con el d-TBO⁺, esta mayor permanencia del oxígeno singlete ocasiona una oxidación mucho más rápida del ABMA y una mayor disminución de su fluorescencia. Con el d-TBO⁺@CB[7] se observó el mismo comportamiento que en agua pero con mayor disminución en la señal del ABMA.

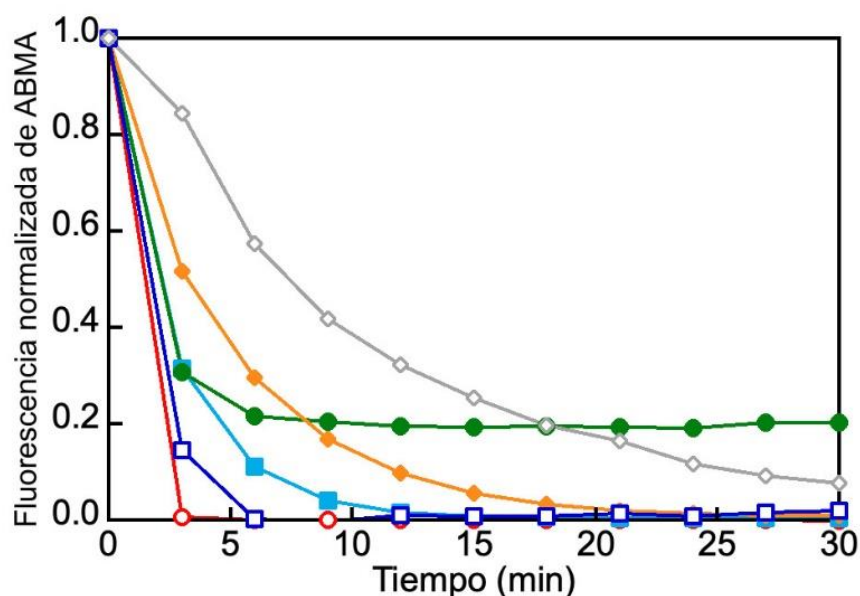


Figura 41. Fluorescencia normalizada de ABMA (1,6 μ M) irradiado por 30 min con luz ámbar con d-TBO⁺ solo y encapsulado. El d-TBO⁺ en ausencia (marcadores celestes) y en presencia de CB[7] 50 μ M (marcadores naranjas) y CB[8] 35 μ M (marcadores verdes) en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7. Fluorescencia normalizada de ABMA con d-TBO⁺ en ausencia (marcadores celestes) y en presencia de CB[7] 50 μ M (marcadores azules huecos) y CB[8] 35 μ M (marcadores grises huecos) en agua deuterada (D₂O).

El comportamiento del d-TBO⁺@CB[8] en D₂O si difiere del observado en disolución amortiguadora y esto nos permite evidenciar que el agua deuterada al mantener el oxígeno singlete por más tiempo sí logra marcar una tendencia en la disminución de fluorescencia del ABMA para el d-TBO⁺@CB[8]. En disolución amortiguadora se mantuvo constante la

señal del ABMA por lo que el oxígeno singulete producido por el complejo no perdura y el producido establece una señal constante, en agua deuterada, esta cantidad podría mantenerse en el medio y con el transcurso del tiempo el oxígeno singulete se acumula y logra oxidar el ABMA y disminuir su señal.

La irradiación en ambos medios permitió diferenciar mejor el comportamiento de cada especie y establecer que la encapsulación en CB[7] puede disminuir la generación en un inicio pero con el avance del tiempo llega a proporcionar la misma oxidación que el d-TBO⁺ y permanece la desactivación energética por un mecanismo tipo II pero con más o menos dependencia de un medio oxigenado.

Otra forma en que se diferencia el tipo de mecanismo de un fotosensibilizador es por medio de aditivos. En la **Figura 42** se muestra la irradiación del d-TBO⁺ con FeCy que generó una mayor disminución de la señal del ABMA, el FeCy actúa como un capturador de electrones e indica la actividad relacionada a un mecanismo de decaimiento tipo I pero la disminución del ABMA, a diferencia del d-TBO⁺ solo, indica que su mecanismo predominante no es tipo I. En cambio, con la azida de sodio, que actúa como un desactivador físico de oxígeno singulete, la señal del ABMA tuvo una menor disminución por lo que parte del oxígeno singulete generado fue desactivado por la azida y no oxidó al ABMA, indicando que el d-TBO⁺ tiene predominantemente un mecanismo tipo II.

Con la encapsulación del d-TBO⁺ en CB[7] en la **Figura 43** se observó un comportamiento similar, la tendencia con el FeCy se mantuvo igual y reduce la influencia predominante de un mecanismo tipo I pero, la tendencia con la azida de sodio fue similar al d-TBO⁺@CB[7] solo. Con el d-TBO⁺@CB[8] en la **Figura 44**, las lecturas con la azida de sodio fueron menores que con el complejo solo por lo que ocurrió la desactivación del oxígeno singulete y se indica el favorecimiento del mecanismo tipo II, a diferencia de la tendencia con FeCy que es más baja y descarta el mecanismo tipo I

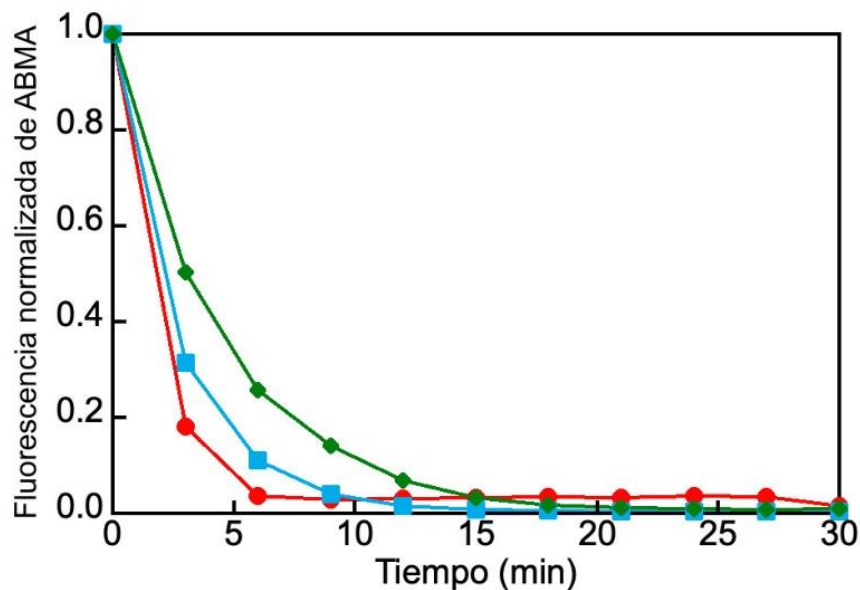


Figura 42. Fluorescencia normalizada de ABMA irradiado por 30 min con luz ámbar en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7 con d-TBO⁺ y aditivos. Se representa el d-TBO⁺ solo (marcadores celestes), en presencia de FeCy (marcadores rojos) y de NaN₃ (marcadores verdes).

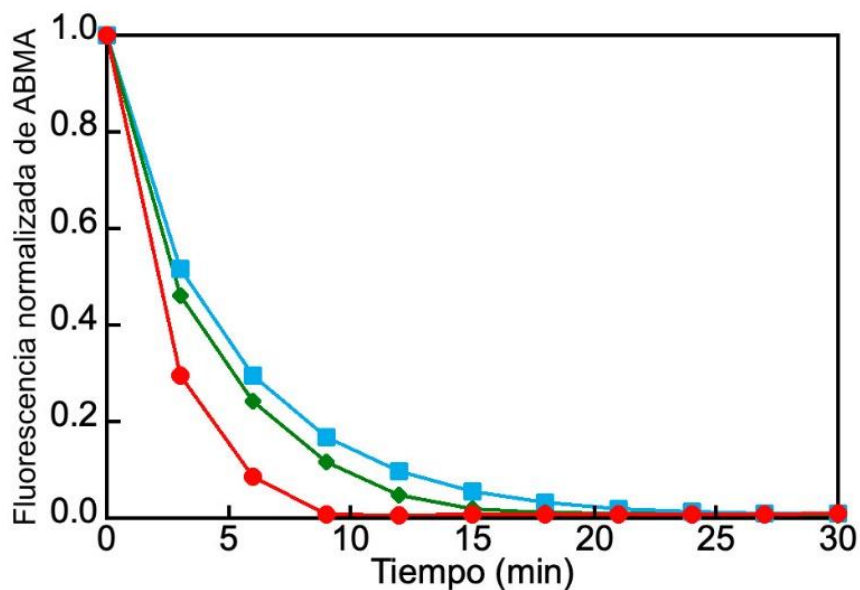


Figura 43. Fluorescencia normalizada de ABMA irradiado por 30 min con luz ámbar en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7 con d-TBO⁺@CB[7] y aditivos. Se representa el d-TBO⁺@CB[7] (marcadores celestes), en presencia de FeCy (marcadores rojos) y de NaN₃ (marcadores verdes).

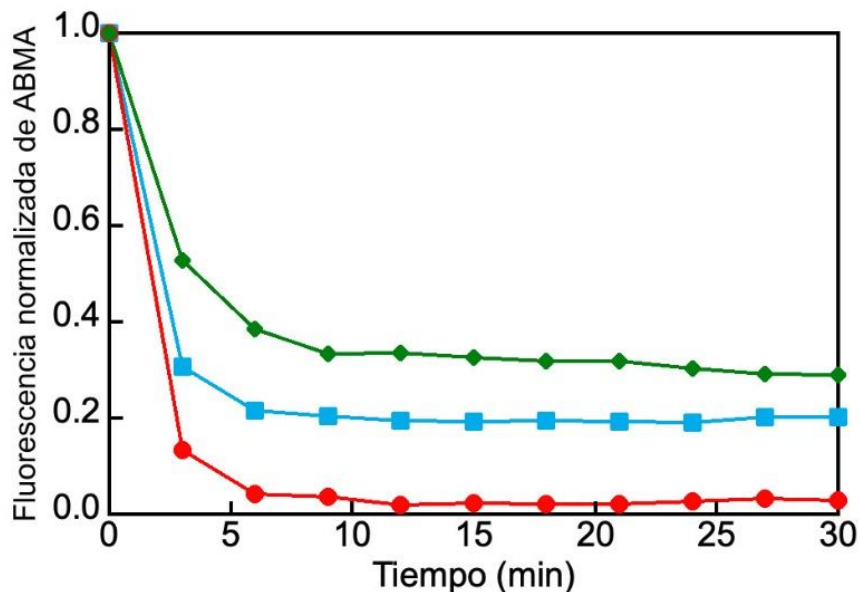


Figura 44. Fluorescencia normalizada de ABMA irradiado por 30 min con luz ámbar en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7 de d-TBO⁺@CB[8]. Se representa el d-TBO⁺@CB[8] (marcadores celestes), en presencia de FeCy (marcadores rojos) y de NaN₃ (marcadores verdes).

Estas variaciones experimentales demuestran que el d-TBO⁺ tiene un mecanismo de decaimiento no radiativo tipo II mayor que tipo I, propiedad que favorece a la TFD. La encapsulación del d-TBO⁺ puede mejorar o no sus propiedades no radiativas. Con el CB[7] se puede observar una generación de oxígeno singulete más paulatina pero con la misma tendencia siendo más indicado que el CB[8], ya que por el autoapagamiento y la menor generación de oxígeno singulete, no resulta más favorable que el CB[7].

3.3. Determinación de la constante y sitio de asociación de los derivados desmetilados del Azul de toluidina con la Albúmina de Suero Humano.

3.3.1. Asociación espectrofotométrica de los fotosensibilizadores con la Albúmina de suero humano

Por medio de la espectroscopía UV-Vis se pueden saber los posibles cambios en el entorno de una proteína, como ocurre con la HSA. Debido a que las propiedades espectrales en la

HSA se deben a su único triptófano y a los puentes disulfuro de su estructura, su interacción con otros fotosensibilizadores se puede monitorear por medio de la aromaticidad del anillo indol que tiene un máximo de absorción a los 280 nm. Se registraron espectros de absorbancia de la HSA a 5 μM con cantidades crecientes de cada fotosensibilizador desde 2 μM a 10 μM en un barrido de 200 a 800 nm en disolución amortiguadora de fosfato a pH 7. En la **Figura 45** está el espectro con TBO⁺ que se evidencia por su máximo de absorbancia a partir de 2 μM y con el aumento de la concentración de TBO⁺ incrementa la absorbancia de la HSA, también se observa el desplazamiento del máximo de absorbancia de la HSA hacia el rojo, esto evidencia un incremento de hidrofobicidad en torno al triptófano y rigidez conformacional.

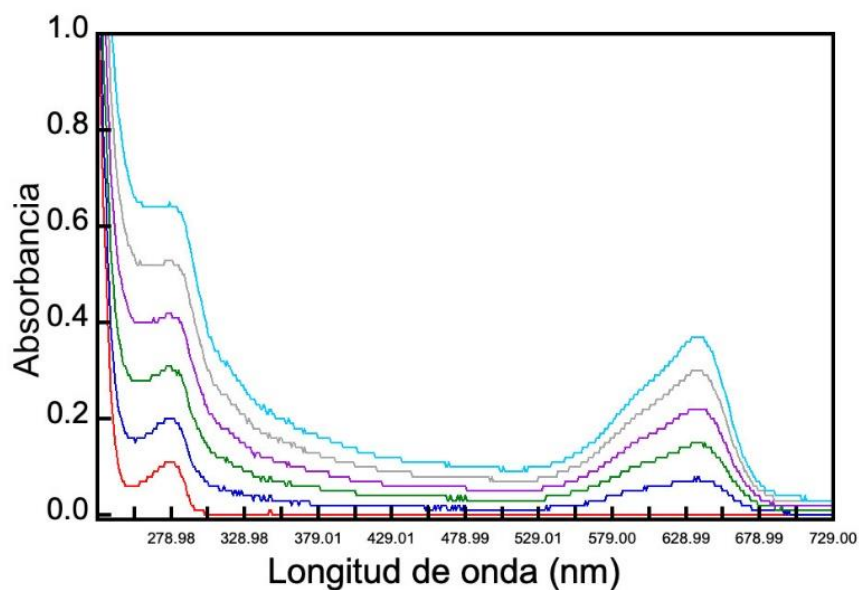


Figura 45. Espectro de absorción UV-Vis de la HSA (5 μM) con TBO⁺ de 0 a 10 μM .

El comportamiento fue similar con el d-TBO⁺ en la **Figura 46** y dd-TBO⁺ en la **Figura 47**, entonces los tres fotosensibilizadores afectan el microambiente cercano al triptófano. Los espectros de absorbancia UV-Vis pueden ser útiles para identificar el tipo de autoapagamiento que ocurre en la HSA al interactuar con los fotosensibilizadores, un espectro que permanece igual significa que el autoapagamiento es colisional. En cambio, el autoapagamiento estático ocurre cuando un fluoróforo (el triptófano) y un desactivador (el fotosensibilizador) forman un complejo en el estado basal y al ser excitado se muestran cambios en el espectro de absorbancia como ocurrió con los tres fotosensibilizadores.

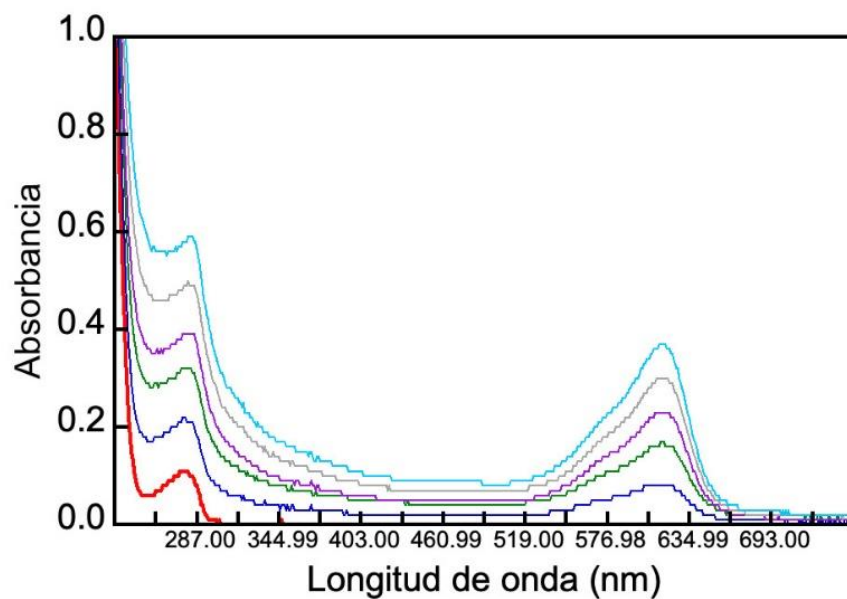


Figura 46. Espectro de absorción UV-Vis de la HSA (5 μM) con d-TBO⁺ de 0 a 10 μM .

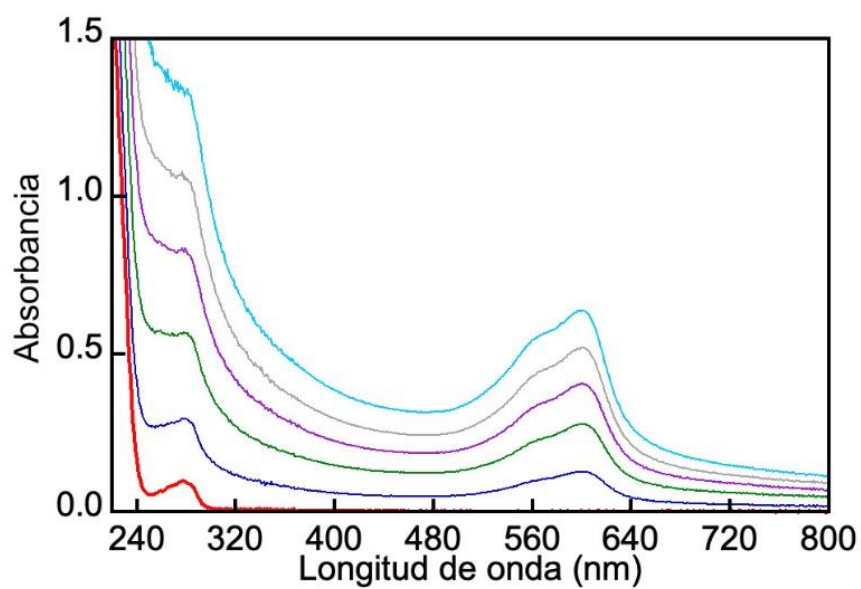


Figura 47. Espectro de absorción UV-Vis de la HSA (5 μM) con dd-TBO⁺ de 0 a 10 μM .

Por medio de fluorescencia se obtuvieron las constantes de asociación del TBO⁺, d-TBO⁺ y dd-TBO⁺ con la HSA siguiendo las concentraciones utilizadas en los espectros de absorción. La HSA fue excitada a 280 nm y se colectaron los datos de 290 a 550 nm con un slit de excitación y emisión de 2 nm y la corrección de la muestra. Se obtuvieron los espectros de emisión del único triptófano y su interacción con cada fotosensibilizador mediante el aumento de la concentración.

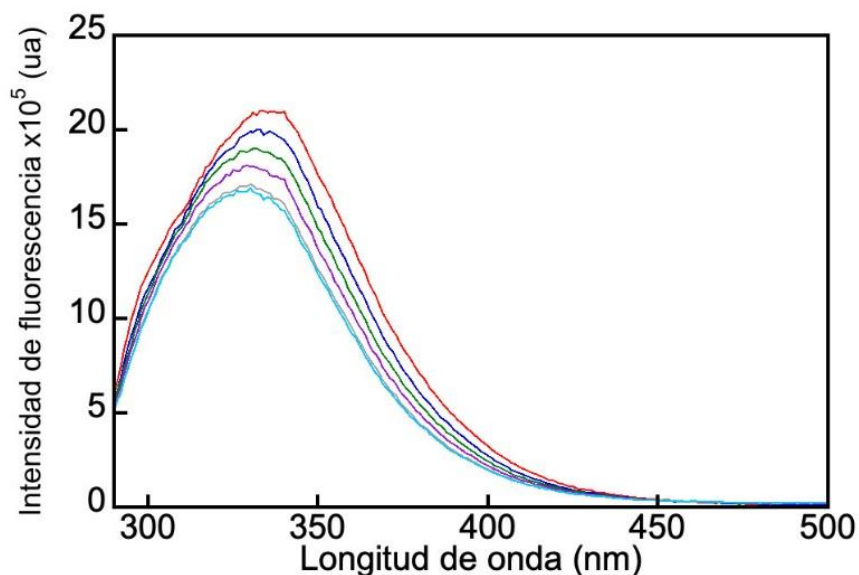


Figura 48. Espectro de emisión de la HSA (5 μM) con TBO⁺ de 0 a 10 μM.

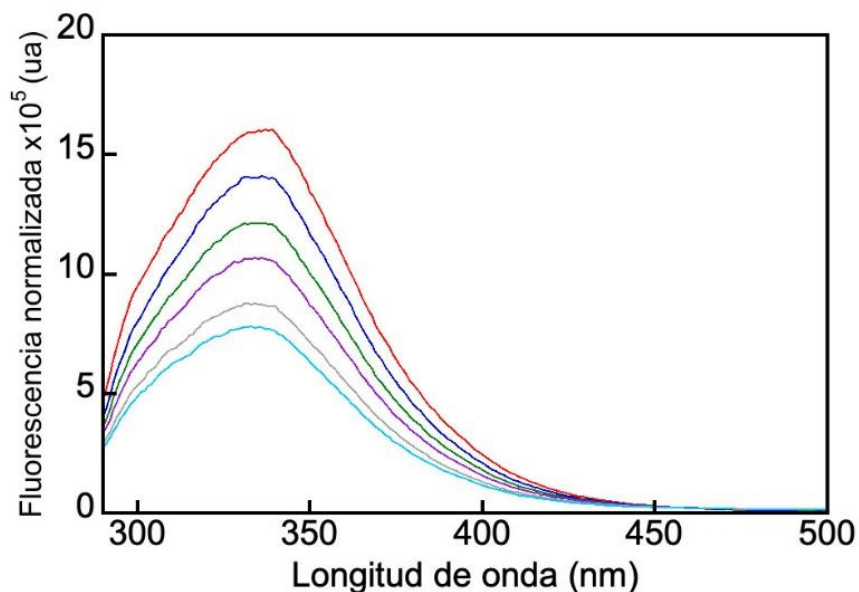


Figura 49. Espectro de emisión de la HSA (5 μM) con d-TBO⁺ de 0 a 10 μM.

Los espectros de emisión en la **Figura 48-50** para los tres fotosensibilizadores permitieron confirmar el cambio en el entorno del triptófano en la HSA, el desplazamiento hacia el azul confirma un entorno más hidrofóbico como se observó en los espectros UV-Vis. También se observó que la señal de emisión solo provino del triptófano como indicativo de que la adición de cada fotosensibilizador forma un complejo con la HSA sin actividad fluorescente, lo único que se observa es la disminución de la fluorescencia del fluoróforo que es un comportamiento relacionado al autoapagamiento estático.

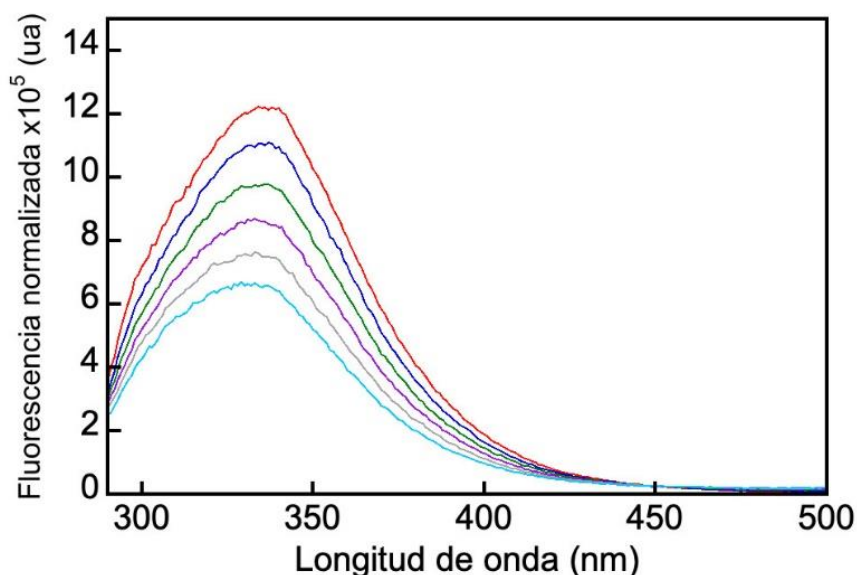


Figura 50. Espectro de emisión de la HSA (5 μM) con dd-TBO⁺ de 0 a 10 μM.

3.3.2. Determinación de la constante de Stern-Volmer de los fotosensibilizadores con la Albúmina de Suero Humano

A partir del cambio en la emisión del fluoróforo se determinaron las ecuaciones de Stern-Volmer que se observan en la **Figura 51** y se despejaron las constantes de asociación de cada fotosensibilizador a la HSA. En todos los casos la gráfica de Stern-Volmer resultó en una línea recta y se generó la ecuación de la recta para cada fotosensibilizador para obtener el valor de la constante K_{sv} que corresponde a la pendiente de la recta. Los experimentos se realizaron por triplicado y se calculó la desviación estándar para cada constante, mostrada en la **Tabla 8**.

La K_{sv} es propia del autoapagamiento dinámico y de esta se puede despejar el valor de la constante de autoapagamiento bimolecular (k_q) usando 10^{-8} s como el tiempo de vida media del fluoróforo en el estado excitado para una biomacromolécula. Los valores de k_q calculados fueron mayores al máximo correspondiente para el autoapagamiento dinámico ($2,0 \times 10^{10}$ L/mol s) indicando que el mecanismo de autoapagamiento ocurre probablemente por la formación de un complejo y no por colisión dinámica. También una gráfica de comportamiento lineal con el incremento de la concentración es propia del autoapagamiento estático.

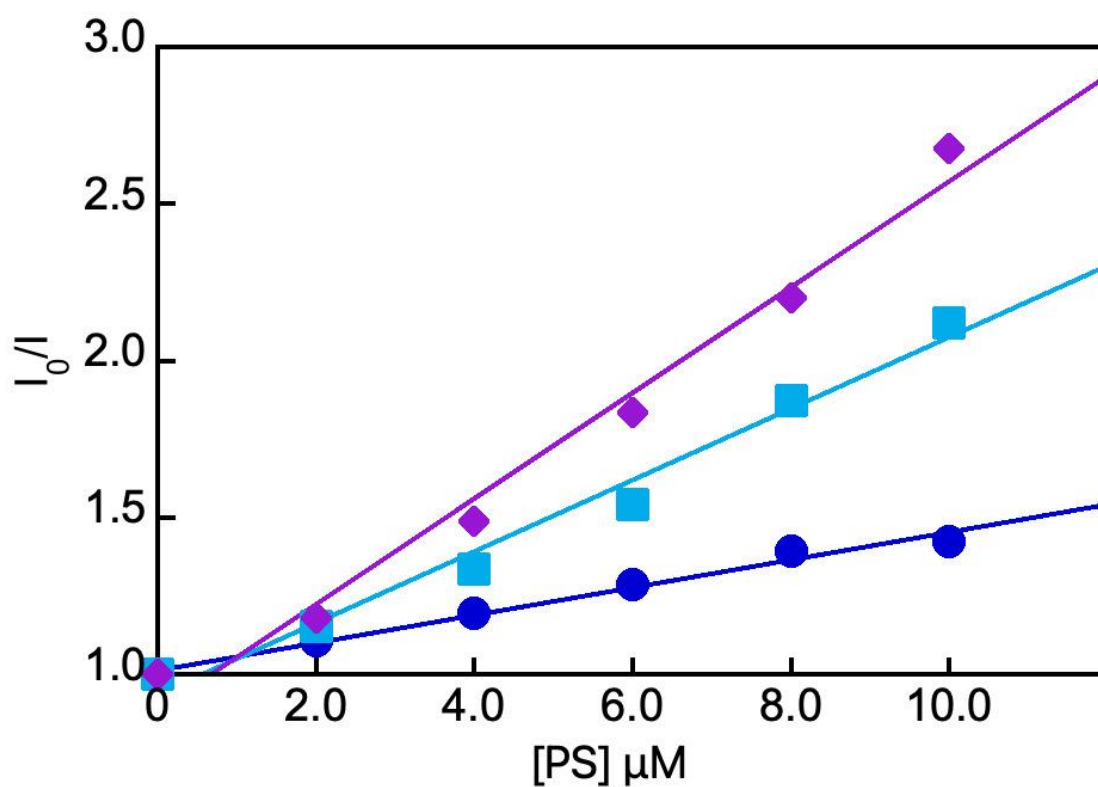


Figura 51. Gráfica de Stern-Volmer de la HSA (5 μM) con TBO⁺ (marcadores azules), d-TBO⁺ (marcadores celestes) y dd-TBO⁺ (marcadores morados) de 0 a 10 μM .

El autoapagamiento del triptófano puede afectarse por la accesibilidad de este en el medio y al contacto con los desactivadores, tomando en cuenta esta posibilidad y los valores mayores de k_q , se utilizó la ecuación de Stern-Volmer modificada para encontrar la fracción de fluoróforos accesibles a los desactivadores (f_a) y la constante de autoapagamiento de la fracción de residuos de triptófano accesibles en el medio o K_a a partir del intercepto y la pendiente de las rectas en la **Figura 52**.

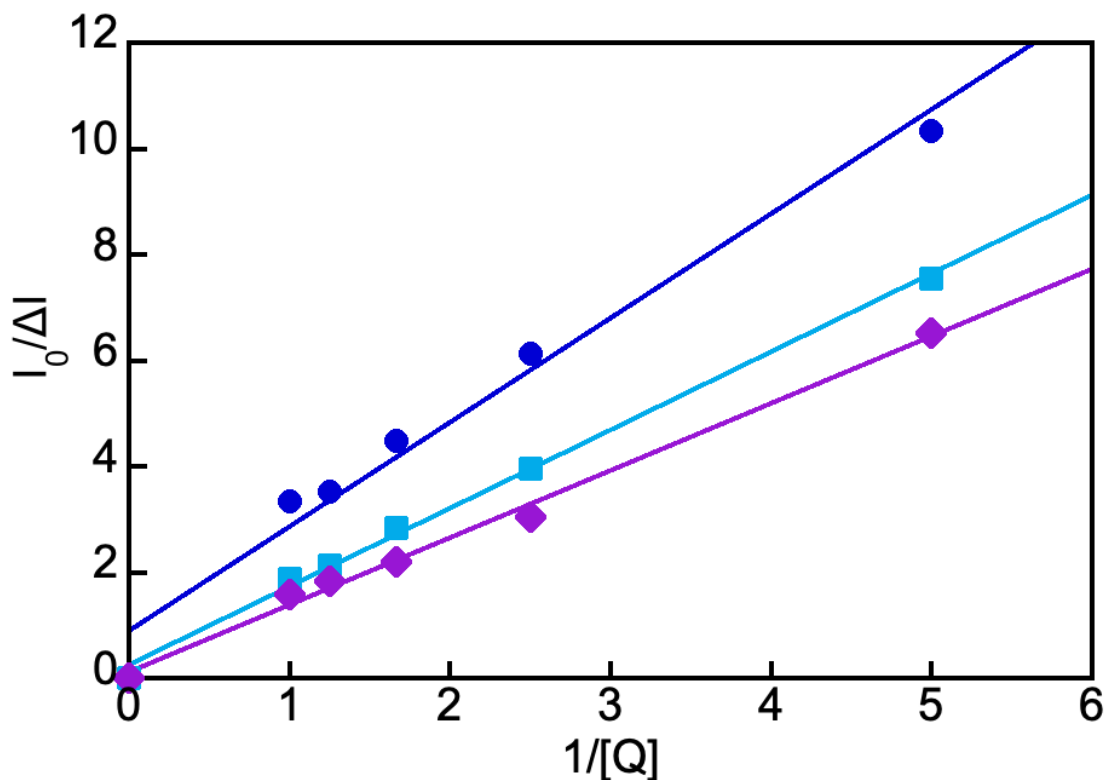


Figura 52. Gráfica de Stern-Volmer corregido de la HSA (5 μ M) con TBO⁺ (marcadores azules), d-TBO⁺ (marcadores celestes) y dd-TBO⁺ (marcadores morados) de 0 a 10 μ M.

Los tres fotosensibilizadores exhibieron el mismo tipo de mecanismo de autoapagamiento de la HSA, el autoapagamiento estático, y partir de la ecuación modificada se establece que el TBO⁺ tiene mayor autoapagamiento con los residuos de triptófano accesibles en la HSA que los derivados desmetilados. Pero también se destaca el valor de la fracción accesible (f_a) que es mayor para el derivado dd-TBO⁺, estas observaciones indican que la desmetilación no cambia el tipo de autoapagamiento pero si influye en la interacción con los residuos de triptófano y los adyacentes en la cavidad.

Tabla 8. Constantes de asociación de HSA con TBO⁺, d-TBO⁺ y dd-TBO⁺

Fotosensibilizador	K _{sv}	K _q	f _a	K _a
TBO ⁺	4,40 x10 ⁴ ± 0,17	4,40 x10 ¹²	1,12	4,53 x10 ⁴
d-TBO ⁺	1,14 x10 ⁵ ± 0,43	1,14 x10 ¹³	3,96	1,71 x10 ⁴
dd-TBO ⁺	1,68 x10 ⁵ ± 0,64	1,68 x10 ¹³	8,30	9,50 x10 ³

La K_a resultó estar entre 10³-10⁴ para los tres fotosensibilizadores, indicando una asociación moderada con la HSA y viable como vehículo de transporte en el torrente sanguíneo. Los metilos extremos del TBO⁺ pueden significar mayor estabilidad del complejo con la HSA y la molécula mediante puentes de hidrógeno e interacciones electroestáticas como lo indica Sharma *et al.* (2014). Los puentes de hidrógeno ocurren predominantemente en el nitrógeno ubicado en el anillo de tiazina, entonces la desmetilación del TBO⁺ puede tener un mayor rol en las interacciones electroestáticas para la asociación de los derivados con la HSA. Los residuos polares de los aminoácidos en la cavidad confieren estabilidad al complejo y la HSA tiene carga neta negativa, la falta de metilos puede reducir esa estabilidad y accesibilidad a más residuos de triptófano, lo que se traduce en una alta interacción con la fracción accesible pero menor penetración en la cavidad de la asociación. Además de que los carbonos de los metilos en el TBO⁺ pueden atraer mayor densidad electrónica y conferir mayor carga positiva al nitrógeno, pero al desmetilarse los hidrógenos sustraen menos densidad electrónica y pueden causar una carga positiva más débil en el extremo de las moléculas d-TBO⁺ y dd-TBO⁺. Así como también favorecer los puentes de hidrógeno e interacciones polares que las no polares con los aminoácidos cercanos.

3.3.3. Asociación competitiva utilizando marcadores en el sitio de unión con la Albúmina de suero humano

Se realizaron estudios de asociación competitiva para determinar el sitio de unión de los derivados d-TBO⁺ y dd-TBO⁺, ya se ha reportado que el TBO⁺ se une al sitio de Sudlow I o subdominio IIA de la HSA, mismo sitio al que se une la warfarina. Se utilizó la HSA a 5 μM con cantidades crecientes de 2 μM de cada fotosensibilizador hasta 10 μM en disolución

amortiguadora de fosfato 10 mM a pH 7, excitando a 280 nm y recolectando de 290 a 550 nm con slit de excitación y emisión de 2 nm. También se realizaron experimentos de control con ibuprofeno y warfarina.

3.3.3.1. Ibuprofeno como marcador del sitio de unión

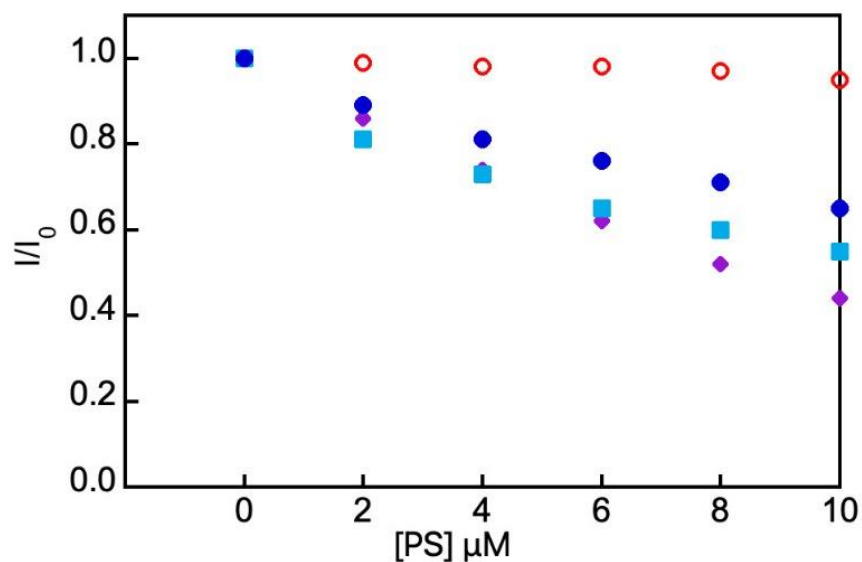


Figura 53. Desplazamiento de competidores con ibuprofeno. Con fluorescencia de la HSA (5 μM) por el ibuprofeno (5 μM) con TBO⁺ (marcadores azules), d-TBO⁺ (marcadores celestes) y dd-TBO⁺ (marcadores morados) de 0 a 10 μM . Lectura de control de HSA 5 μM con ibuprofeno de 0 a 10 μM (marcadores rojos huecos).

En la **Figura 53** se observa el cambio en la fluorescencia del triptófano según el fotosensibilizador. Cuando se adicionaron cantidades de ibuprofeno la señal no cambió así que no interacciona con el triptófano en el sitio de Sudlow I, comportamiento esperado ya que se ha reportado que este se asocia al sitio de Sudlow II o subdominio IIIA. En cambio, para los fotosensibilizadores sí se observó la disminución de fluorescencia, indicando que estos se unen a un sitio distinto al ibuprofeno o sitio de Sudlow II. También se destaca que la desmetilación produce mayor disminución de fluorescencia, como ocurrió con el dd-TBO⁺.

3.3.3.2. Warfarina como marcador del sitio de unión

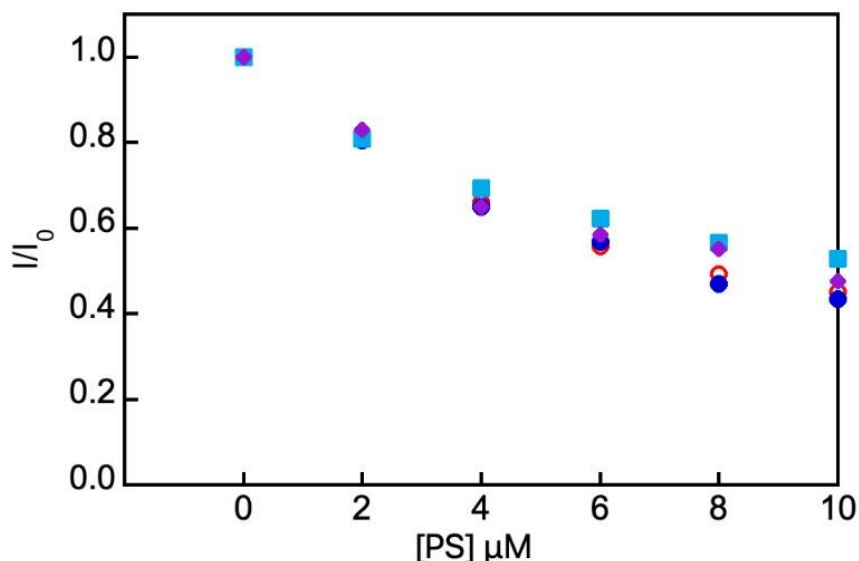


Figura 54. Desplazamiento de competidores con warfarina. Con fluorescencia de la HSA (5 μM) por la warfarina (5 μM) con TBO⁺ (marcadores azules), d-TBO⁺ (marcadores celestes) y dd-TBO⁺ (marcadores morados) a 10 μM . Lectura de control de HSA 5 μM con warfarina de 0 a 10 μM (marcadores rojos huecos).

La tendencia en la disminución de fluorescencia para los fotosensibilizadores y la warfarina indican la interacción en el mismo sitio de la HSA que genera la señal, el sitio con el triptófano 214. La **Figura 54** confirma que los derivados desmetilados del TBO⁺ y la warfarina se asocian en el sitio de Sudlow I o subdominio IIA de la HSA. La competencia por la asociación se demuestra por el cambio en la K_a de los fotosensibilizadores en presencia de la warfarina, como se observa en la **Tabla 9**, hubo un cambio significativo en las constantes de asociación que reflejan la competencia por el sitio de unión.

Tabla 9. Constantes de asociación de HSA con TBO⁺, d-TBO⁺ y dd-TBO⁺ en presencia de warfarina 10 μM

Fotosensibilizador	K_{sv}	K_q	f_a	K_a	RPD de K_a
TBO ⁺	$1,34 \times 10^5$	$1,34 \times 10^{13}$	1,96	$5,35 \times 10^4$	16,5 %
d-TBO ⁺	$8,89 \times 10^4$	$8,89 \times 10^{12}$	1,27	$8,25 \times 10^4$	131,3 %
dd-TBO ⁺	$1,07 \times 10^5$	$1,07 \times 10^{13}$	2,06	$4,50 \times 10^4$	130,3 %
Warfarina	$1,25 \times 10^5$	$1,25 \times 10^{13}$	2,04	$4,90 \times 10^4$	

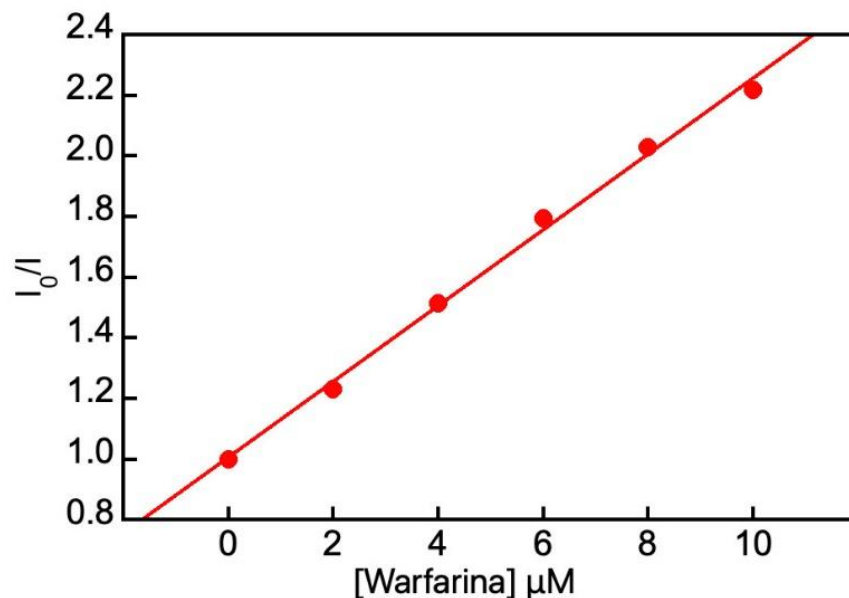


Figura 55. Gráfica de Stern-Volmer por fluorescencia de la HSA (5 μM) con warfarina de 0 a 10 μM .

Se realizó el Stern-Volmer de la warfarina como se observa en la **Figura 55** para obtener el valor de K_a que también fue diferente que en presencia de los fotosensibilizadores. A su vez, se comprobó la competencia por el sitio de unión observando solo el cambio en la fluorescencia del TBO⁺, excitando a 550 nm ya que la HSA ni la warfarina absorben a esta longitud de onda. En la **Figura 56** se observa la disminución de la fluorescencia del TBO⁺ al adicionar la warfarina debido a la competencia por el sitio de unión en la HSA.

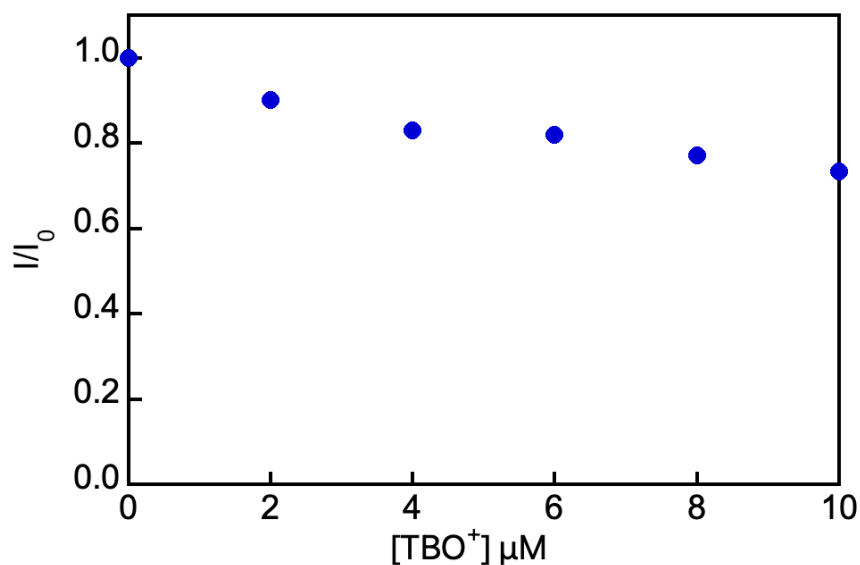


Figura 56. Desplazamiento de competidores por fluorescencia de la HSA (5 μM) por la TBO⁺ (10 μM) con warfarina de 0 a 10 μM excitando a 550 nm.

3.3.4. Fotooxidación de la Albúmina de suero humano por el d-TBO⁺

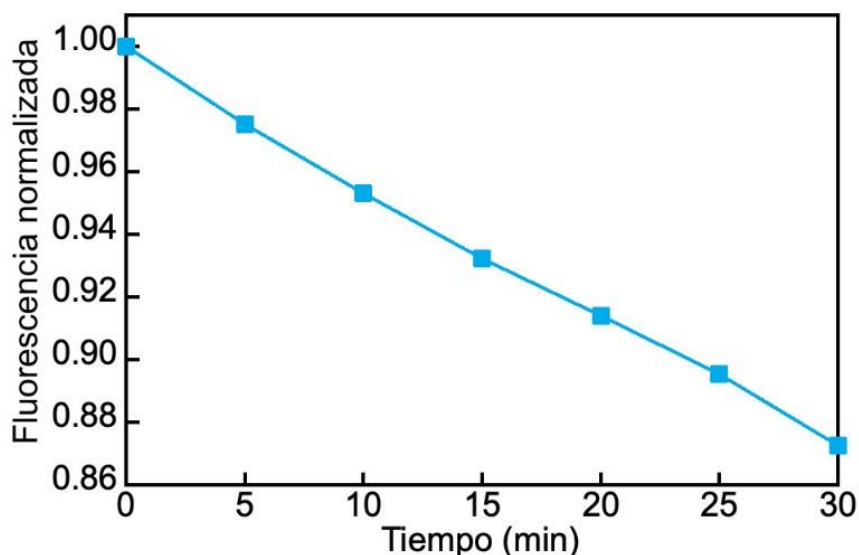


Figura 57. Fotooxidación de la HSA (5 μM) por fluorescencia en presencia de d-TBO⁺ irradiado durante 30 min con luz ámbar.

La HSA tiene actividad antioxidante por su capacidad de neutralizar a especies reactivas de oxígeno, característica que es desfavorable para la terapia fotodinámica. Se evaluó la capacidad de degradar la HSA por la generación de ERO del d-TBO⁺ por medio de fluorescencia y electroforesis. Se registró la fluorescencia del triptófano 214 en HSA 5 μM con d-TBO⁺ 4 μM irradiado con luz ámbar por 30 minutos, tomando lecturas cada 3 min. Se excitó a 280 nm y recolectó de 290 a 550 nm con slit de excitación y emisión de 2 nm en disolución amortiguadora de fosfato 10 mM. En la **Figura 57** se observa la disminución de la señal fluorescente de la HSA a medida que aumenta el tiempo de irradiación a causa de la generación de ERO por mecanismos tipo I y tipo II.

3.3.5. Electroforesis con la Albúmina de suero humano irradiada

También se observó la fotodegradación de la HSA por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras como se describen por Cáceres *et al.* (2017). En la **Figura 58** se observa la banda de la HSA entre los 75 y 50 kDa, correspondiente a su peso molecular de 66 kDa y las bandas por arriba de 100 kDa corresponden a dímeros de la HSA. Entre las bandas sin irradiar e irradiadas no se pudo observar mucha diferencia, solo un poco de difusión en la banda irradiada por 30 min. La poca diferencia entre las

bandas significa que la tinción con Coomassie R-250 no es lo suficientemente sensible para teñir fragmentos de la fotodegradación y también que la HSA no se degradó significativamente por las ERO del TBO⁺.

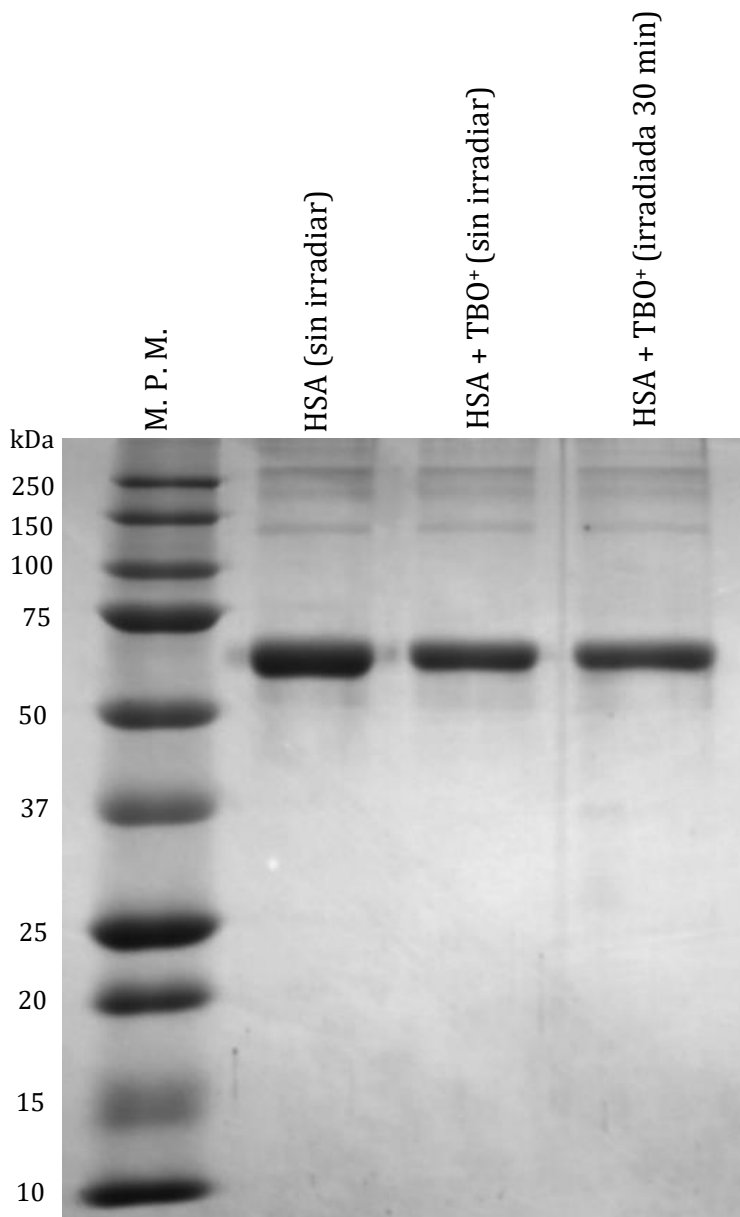


Figura 58. Gel de poliacrilamida reductor al 12 % con HSA (5 μ M) sin irradiar, HSA (5 μ M) con TBO⁺ (5 μ M) a los 0 y 30 min de irradiación. M. P. M. = marcador de peso molecular.

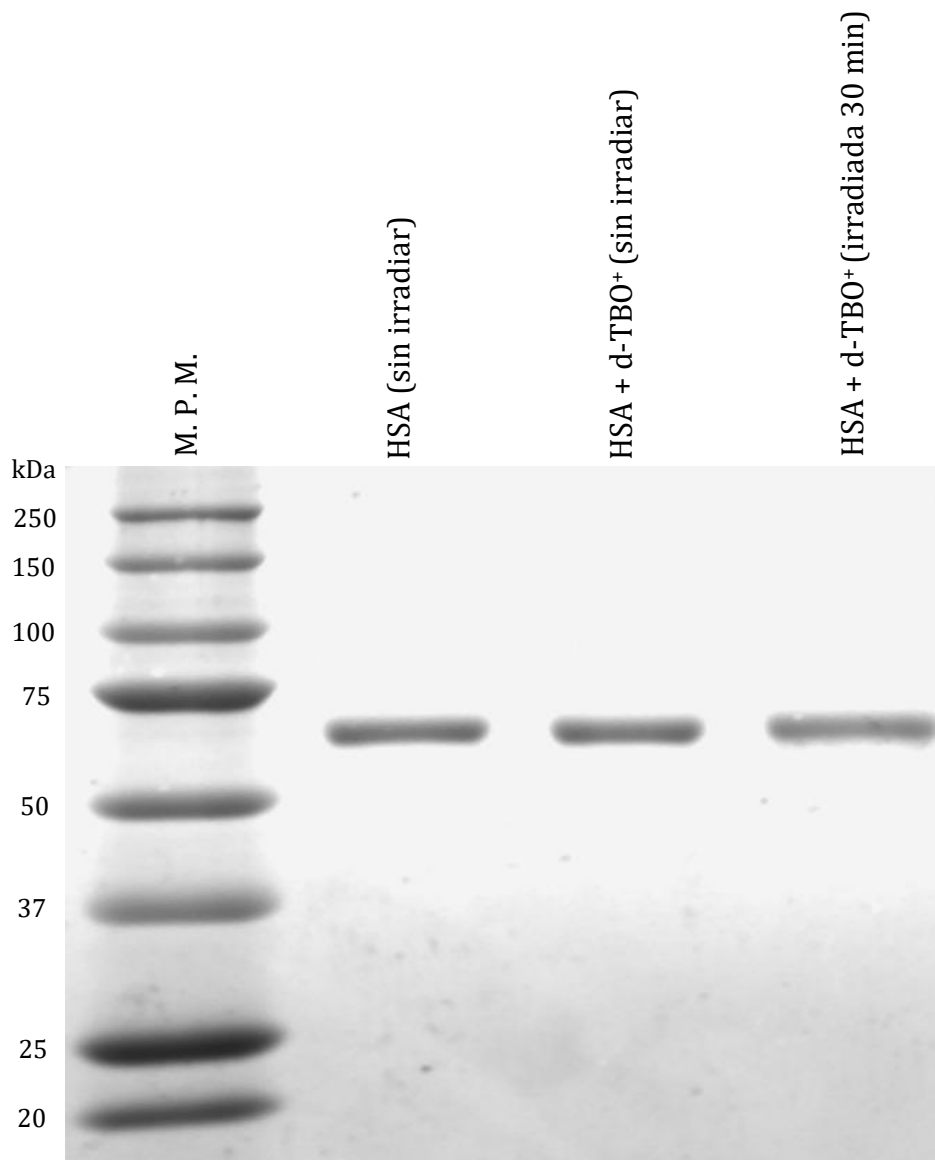


Figura 59. Gel de poliacrilamida reductor al 12 % con HSA (1,25 μM) sin irradiar, HSA (1,25 μM) con d-TBO⁺ (5 μM) a los 0 y 30 min de irradiación. M. P. M. = marcador de peso molecular.

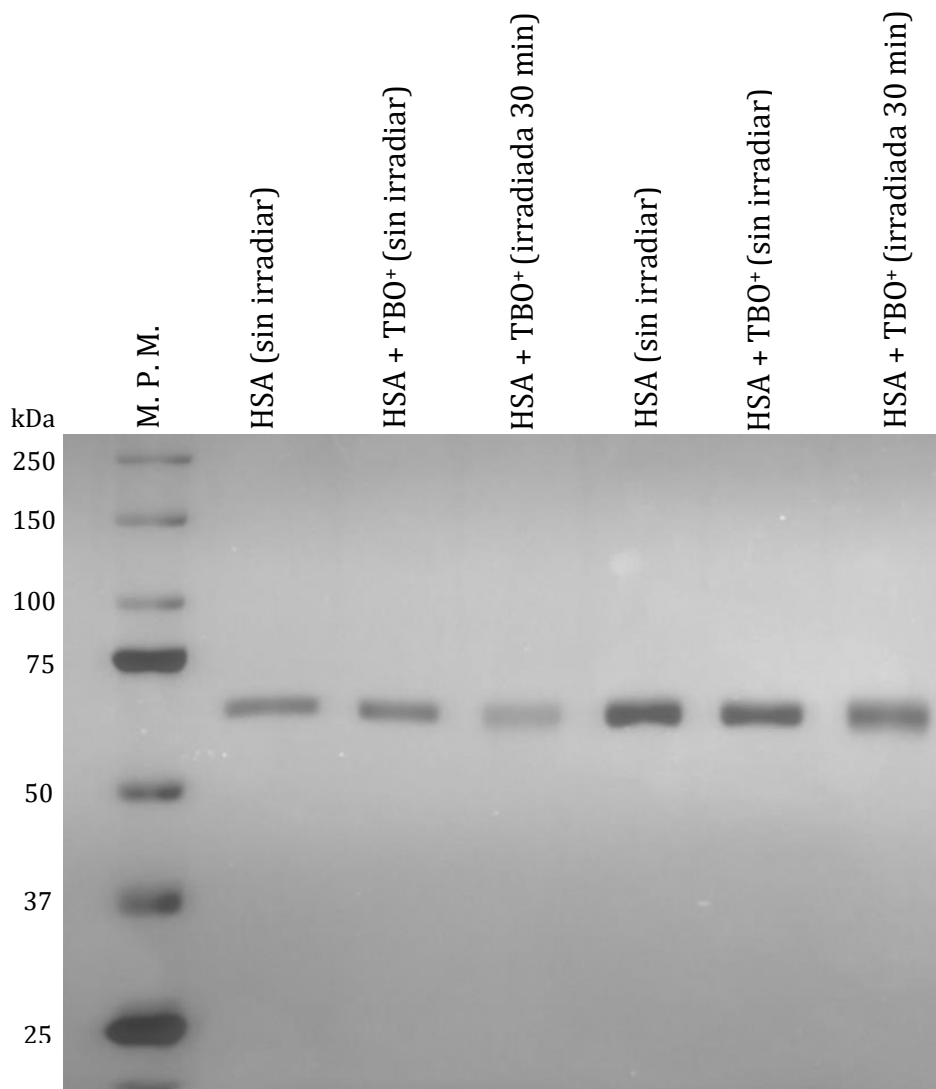


Figura 60. Gel de poliacrilamida reductor al 10 % con HSA (1,25 μM) sin irradiar, HSA (1,25 μM) con TBO⁺ (10 μM) a los 0 y 30 min de irradiación. HSA (2,5 μM) sin irradiar, HSA (2,5 μM) y TBO⁺ (10 μM) a 0 y 30 min de irradiación con luz roja. M. P. M. = marcador de peso molecular.

En la **Figura 59** se observa el gel con d-TBO⁺ 5 μM revelado con Coomassie R-250 y se observó una mayor difusión en la banda de HSA a 1,25 μM irradiada con d-TBO⁺ por lo que se optó por realizar la tinción con plata por su mayor sensibilidad a cantidades menores de proteína. En la **Figura 60** se muestra el gel de poliacrilamida al 10 % revelado con plata y se logró observar la diferencia entre las bandas de HSA a 1,25 μM y 2,50 μM , pero con el doble de TBO⁺ estando a 10 μM irradiando con luz roja, que es más cercana a su máximo de absorción, se observó la difusión de las bandas irradiadas que demuestran la degradación de la proteína por las ERO generadas por el fotosensibilizador. Se observó

una mayor difusión con la HSA a 1,25 μM así que se optó por seguir trabajando con esta concentración.

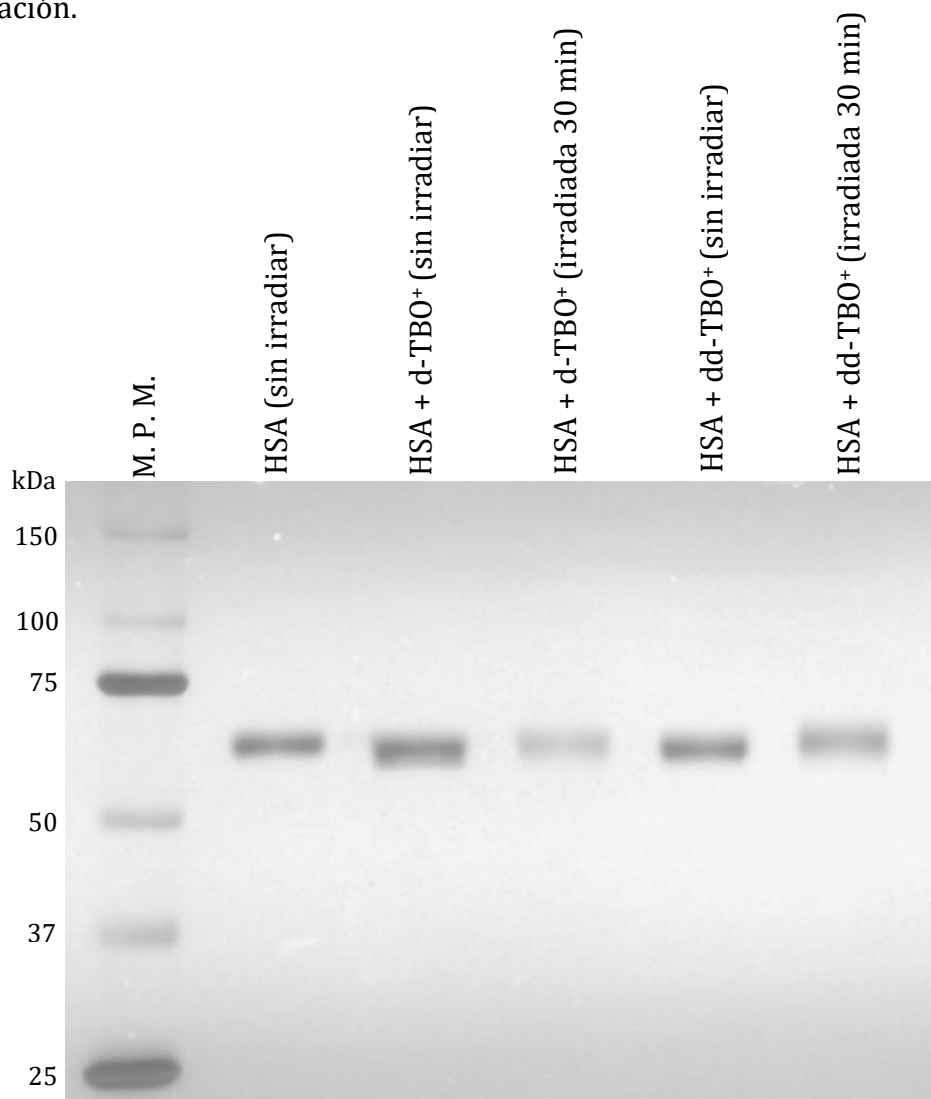


Figura 61. Gel de poliacrilamida reductor al 10 % con HSA (1,25 μM) sin irradiar, HSA (1,25 μM) con d-TBO⁺ (10 μM) a los 0 y 30 min de irradiación, HSA (1,25 μM) y dd-TBO⁺ (10 μM) a 0 y 30 min de irradiación con luz ámbar. M. P. M. = marcador de peso molecular.

El gel con el d-TBO⁺ y dd-TBO⁺ a 10 μM se realizó al 10 % e irradió con luz ámbar por 30 min al ser más cercana a los máximos de absorción de los fotosensibilizadores. En la **Figura 61** la banda irradiada se observó más difusa que la no irradiada para ambas moléculas, demostrando la capacidad de los fotosensibilizadores para fotodegradar la HSA generando una cantidad mayor de ERO que las que puede neutralizar la proteína en una relación 8:1. La degradación de la proteína pudo ocurrir probablemente por fragmentación o cambios estructurales.

Capítulo IV. Conclusiones

- La irradiación del Azul de touluidina por 1 hora genera el derivado monodesmetilado d-TBO⁺ y se puede purificar por el mismo método que el doblemente desmetilado dd-TBO⁺.
- El valor del rendimiento cuántico de fotoluminiscencia sigue el orden decreciente: d-TBO⁺, dd-TBO⁺ y TBO⁺, que corresponde a la intensidad de fluorescencia emitida a la misma concentración. El dd-TBO⁺ es el fotosensibilizador con mayor inclinación a la desactivación energética por transferencia de energía o mecanismo tipo II hacia la generación de oxígeno singulete.
- La encapsulación del d-TBO⁺ en CB[7] y CB[8] se evidencia por cambios en los espectros de absorbancia UV-Vis, emisión por fluorescencia y Espectrometría de Masas ESI⁺ en la formación de complejos 1:1 con CB[7] y 2:1 con CB[8].
- El d-TBO⁺ genera más oxígeno singulete que el TBO⁺ pero menos que el dd-TBO⁺ y los tres fotosensibilizadores pueden generarlo por más de 30 minutos. El d-TBO⁺ encapsulado en CB[7] genera menos oxígeno singulete y mucho menos en CB[8] por autoapagamiento. El d-TBO⁺ tiene predominantemente un mecanismo tipo II estando solo y encapsulado.
- La K_a de los fotosensibilizadores con la HSA sigue el orden decreciente: TBO⁺, d-TBO⁺ y dd-TBO⁺, así como incrementa la hidrofobicidad del triptófano 214 en asociación con los fotosensibilizadores. Los derivados desmetilados se unen al sitio de Sudlow I de la HSA, el mismo que el TBO⁺ y la warfarina. Los tres fotosensibilizadores alteran el valor de K_a de la warfarina, indicando la competencia por sitio de unión por medio de autoapagamiento estático.
- Los tres fotosensibilizadores tienen la capacidad de fotooxidar la HSA a una concentración 8 veces mayor.

Recomendaciones

- Para evitar que el d-TBO⁺ se desmetile hay que mantenerlo en estado sólido y un entorno seco.
- Al determinar los tipos de mecanismos de desactivación energética con aditivos es mejor utilizar la azida de sodio a 2 mM para evitar que interfiera en la desactivación del oxígeno singulete por las ERO generadas por el fotosensibilizador.
- Cuando se realice una comparación entre varios fotosensibilizadores, procurar que estos estén a la misma concentración para obtener resultados confiables para su comparación.
- Utilizar el método de las 4 curvas para determinar el rendimiento cuántico de fotoluminiscencia para los tres fotosensibilizadores debido a su baja fluorescencia. Ajustar las muestras a bajas concentraciones para evitar el efecto de filtro interior y utilizar filtros de densidad óptica para regular la intensidad de la señal de Rayleigh.
- La tinción con plata es un mejor método de revelación para geles de poliacrilamida por su mayor sensibilidad y facilidad de visualizar la degradación de la Albúmina de suero humano a bajas concentraciones.

Bibliografía

Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J. E., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., & Golab, J. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: an update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250-281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>

Abou-Zied, O. K., & Al-Lawatia, N. (2010). Exploring the Drug-Binding Site Sudlow I of Human Serum albumin: The role of water and TRP214 in Molecular recognition and ligand binding. *ChemPhysChem*, 12(2), 270–274. <https://doi.org/10.1002/cphc.201000742>

Alessi, A., Salvalaggio, M., & Ruzzon, G. (2013). Rhodamine 800 as reference substance for fluorescence quantum yield measurements in deep red emission range. *Journal Of Luminescence*, 134, 385-389. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2012.08.017>

Assaf, K. I., & Nau, W. M. (2015). Cucurbiturils: from synthesis to high-affinity binding and catalysis. *Chemical Society Reviews*, 44(2), 394-418. <https://doi.org/10.1039/c4cs00273c>

Bhasikuttan, A. C., Mohanty, J., Nau, W. M., & Pal, H. (2007). Efficient fluorescence enhancement and cooperative binding of an organic dye in a supra-biomolecular Host-Protein assembly. *Angewandte Chemie*, 46(22), 4120–4122. <https://doi.org/10.1002/anie.200604757>

Boletines de Registro y Estadísticas de la Salud REGES | Instituto Oncológico de Panamá. (2021). <https://www.ion.gob.pa/site/wp-content/uploads/2017/08/boletin-21-1-003.pdf>

Cáceres, J., Robinson-Duggon, J., Tapia, A., Paiva, C., Gómez, M., Bohne, C., & Fuentealba, D. (2017). Photochemical behavior of biosupramolecular assemblies of photosensitizers, cucurbit[n]urils and albumins. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(3), 2574–2582. <https://doi.org/10.1039/c6cp07749h>

Dabrowski, J., Pucelik, B., Regiel-Futyra, A., Brindell, M., Mazuryk, O., Kyzioł, A., Stochel, G., Macyk, W., & Arnaut, L. G. (2016). Engineering of relevant photodynamic processes

through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers. *Coordination Chemistry Reviews*, 325, 67-101. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.06.007>

Da Silva, J. P., Jayaraj, N., Jockusch, S., Turro, N. J., & Ramamurthy, V. (2011b). Aggregates of Cucurbituril Complexes in the Gas Phase. *Organic Letters*, 13(9), 2410-2413. <https://doi.org/10.1021/ol200647j>

Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T. (2021). New Approaches and Procedures for cancer treatment: Current perspectives. *Sage Open Medicine*, 9, 205031212110343. <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>

Dysart, J. S., & Patterson, M. S. (2005). Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. *Physics in Medicine and Biology*, 50(11), 2597-2616. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/50/11/011>

El-Kemary, M., Gil, M., & Douhal, A. (2007). Relaxation dynamics of piroxicam structures within human serum albumin protein. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(12), 2896-2902. <https://doi.org/10.1021/jm061421f>

Elzoghby, A. O., Samy, W. M., & Elgindy, N. A. (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 157(2), 168-182. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.031>

Elsadek, B., & Kratz, F. (2012). Impact of Albumin on drug delivery — new applications on the horizon. *Journal of Controlled Release*, 157(1), 4-28. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.069>

Foote, C. S. (1991). Definition of Type I and Type II Photosensitized Oxidation. *Photochemistry and Photobiology*, 54(5), 659. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1991.tb02071.x>

Freeman, W. A., Mock, W. L., & Shih, N. Y. (1981). Cucurbituril. *Journal Of The American Chemical Society*, 103(24), 7367-7368. <https://doi.org/10.1021/ja00414a070>

Fundacáncer. (2020, 10 marzo). Memoria 2020 - Fundacáncer Panamá. Fundacáncer Panamá. <https://www.fundacancerpanama.org/wp-content/uploads/2021/01/Fundacancer-Memoria-2020.pdf>

Ghogare, A. A., & Greer, A. (2016). Using singlet oxygen to synthesize natural products and drugs. *Chemical Reviews*, 116(17), 9994–10034. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00726>

Greer, A. (2006). Christopher Foote's Discovery of the Role of Singlet Oxygen [1O₂ (1Δg)] in Photosensitized Oxidation Reactions. *Accounts of Chemical Research*, 39(11), 797–804. <https://doi.org/10.1021/ar050191g>

Halford, G. M., Lordkipanidzé, M., & Watson, S. P. (2011). 50th anniversary of the discovery of ibuprofen: An interview with Dr Stewart Adams. *Platelets*, 23(6), 415-422. <https://doi.org/10.3109/09537104.2011.632032>

Hamblin, M. (2008). *Advances in photodynamic therapy: Basic, Translational, and Clinical*. Artech House.

Hasabeldaim, E. H. H., Swart, H. C., & Kroon, R. E. (2023). Luminescence and stability of Tb doped CaF₂ nanoparticles. *RSC Advances*, 13(8), 5353-5366. <https://doi.org/10.1039/d2ra07897j>

Heneweer, C., Holland, J. P., Divilov, V., Carlin, S., & Lewis, J. S. (2011). Magnitude of enhanced permeability and retention effect in tumors with different phenotypes: 89ZR-Albumin as a model system. *The Journal of Nuclear Medicine*, 52(4), 625-633. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.083998>

HORIBA scientific. (2022). *QuantaPhi-2 Integrating Sphere Operation Manual* (N.o 5700034006).

Kashyap, A., Ramasamy, E., Ramalingam, V., & Pattabiraman, M. (2021). Supramolecular control of singlet oxygen generation. *Molecules*, 26(9), 2673. <https://doi.org/10.3390/molecules26092673>

- Kratz, F. (2008). Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 132(3), 171-183. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.05.010>
- Kuok, K. I., Li, S., Wyman, I., & Wang, R. (2017). Cucurbit[7]URil: An Emerging Candidate for Pharmaceutical Excipients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1398(1), 108-119. <https://doi.org/10.1111/nyas.13376>
- Kuznetsova, N. A., Gretsova, N. S., Yuzhakova, O. A., Negrimovskii, V. M., Kaliya, O. L., & Luk'yanets, E. A. (2001). New Reagents for Determination of the Quantum Efficiency of Singlet Oxygen Generation in Aqueous Media. *Russian Journal of General Chemistry*, 71(1), 36-41. <https://doi.org/10.1023/a:1012369120376>
- Lagona, J., Mukhopadhyay, P., Chakrabarti, S., & Isaacs, L. (2005). The Cucurbit[n]uril family. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(31), 4844-4870. <https://doi.org/10.1002/anie.200460675>
- Li, Q., Yang, W., Qu, L., Qi, H., Huang, Y., & Zhang, Z. (2014). Interaction of Warfarin with Human Serum Albumin and Effect of Ferulic Acid on the Binding. *Journal Of Spectroscopy*, 2014, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2014/834501>
- Mariño-Ocampo, N., Dibona-Villanueva, L., Escobar-Álvarez, E., Guerra-Díaz, D., Zúñiga-Núñez, D., Fuentealba, D., & Robinson-Duggon, J. (2022). Recent Photosensitizer Developments, Delivery Strategies and Combination-based Approaches for Photodynamic Therapy†. *Photochemistry And Photobiology*, 99(2), 469-497. <https://doi.org/10.1111/php.13749>
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2018). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica* (7.a ed.). Pearson Educación. <https://www.pearson.es/es/node/343>
- Mishra, V., & Heath, R. J. (2021). Structural and Biochemical Features of Human Serum Albumin Essential for Eukaryotic Cell Culture. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(16), 8411. <https://doi.org/10.3390/ijms22168411>

Montes-Navajas, P., Corma, A., & Garcia, H. (2008). Supramolecular ionic liquids based on host-guest cucurbituril imidazolium complexes. *Journal Of Molecular Catalysis A Chemical*, 279(2), 165-169. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2007.08.007>

Otero, J. O. (2023). Estudio de la Encapsulación Supramolecular de un Derivado del Azul de Toluidina en Cucurbit[7]urilo y Cucurbit[8]urilo, su Efecto Fotosensibilizador y Asociación con la Albúmina de Suero Humano (Universidad de Panamá, Ed.) [Tesis de Licenciatura]. Universidad de Panamá.

Patel S, Singh R, Preuss CV, Patel N. Warfarin. 2023 Mar 24. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 29261922.

Roberts, W. G., Smith, K. M., Mcculiough, J. L., & Berns, M. W. (1989). SKIN PHOTSENSITIVITY AND PHOTODESTRUCTION OF SEVERAL POTENTIAL PHOTODYNAMIC SENSITIZERS. *Photochemistry And Photobiology*, 49(4), 431-438. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1989.tb09191.x>

Robinson-Duggon, J., Mariño-Ocampo, N., Barrias, P., Zúñiga-Núñez, D., Günther, G., Edwards, A. M., Greer, A., & Fuentealba, D. (2019). Mechanism of Visible-Light Photooxidative Demethylation of Toluidine Blue O. *The Journal Of Physical Chemistry A*, 123(23), 4863-4872. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.9b03588>

Robinson-Duggon, J., McTiernan, C. D., Muñoz, M., Guerra, D., Álvarez, E. E., Andrade-Villalobos, F., Fierro, A., Edwards, A. M., Alarcon, E. I., & Fuentealba, D. (2021). 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*, 223, 112284. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112284>

Robinson-Duggon, J., Pérez-Mora, F., Valverde-Vásquez, L., Cortés-Arriagada, D., De la Fuente, J. R., Günther, G., & Fuentealba, D. (2017). Supramolecular Reversible On-Off Switch for Singlet Oxygen Using Cucurbit[n]uril Inclusion Complexes. *Journal Of Physical Chemistry. C*, 121(39), 21782-21789. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b07736>

Schilling, U., Friedrich, E., Sinn, H., Schrenk, H., Clorius, J., & Maier-Borst, W. (1992). Design of compounds having enhanced tumour uptake, using serum albumin as a carrier—part II. In vivo studies. *International Journal Of Radiation Applications And Instrumentation Part B Nuclear Medicine And Biology*, 19(6), 685-695. [https://doi.org/10.1016/0883-2897\(92\)90103-6](https://doi.org/10.1016/0883-2897(92)90103-6)

Scholtbach, K.; Venegas, I.; Bohne, C.; Fuentealba, D. Time Resolved Fluorescence Anisotropy as a Tool to Study Guest Cucurbit[n]uril-Protein Ternary Supramolecular Interactions. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2015, 14, 842–852.

Sharma, A. S., Anandakumar, S., & Ilanchelian, M. (2014b). 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*, 151, 206-218. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2014.02.009>

Sridharan, G., & Shankar, A. A. (2012). Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal Of Oral And Maxillofacial Pathology*, 16(2), 251. <https://doi.org/10.4103/0973-029x.99081>

Sudlow, G., Birkett, D. J., & Wade, D. N. (1975). The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *PubMed*, 11(6), 824-832. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1207674>

Sudlow, G., Birkett, D. J., & Wade, D. N. (1976, 1 noviembre). *Further Characterization of Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin*. *Molecular Pharmacology*. <https://molpharm.aspetjournals.org/content/12/6/1052>

Tang, H.; Fuentealba, D.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; Kim, K.; Bohne, C. Guest Binding Dynamics with Cucurbit[7]uril in the Presence of Cations. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 20623–20633.

Walker, S., Oun, R., McInnes, F., & Wheate, N. J. (2011). The potential of cucurbit[n]urils in drug delivery. *Israel Journal of Chemistry*, 51(5-6), 616-624. <https://doi.org/10.1002/ijch.201100033>

Wang, Z., Ho, J. X., Ruble, J. R., Rose, J. P., Rüker, F., Ellenburg, M., Murphy, R. C., Click, J., Soistman, E., Wilkerson, L., & Carter, D. C. (2013). Structural studies of several clinically important oncology drugs in complex with human serum albumin. *Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(12), 5356-5374. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.032>

Wagner, S. J. (2002). Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes. *Transfusion Medicine Reviews*, 16(1), 61-66. <https://doi.org/10.1053/tmrv.2002.29405>

WCRF International. (2022, 14 abril). Worldwide Cancer Data | World Cancer Research Fund International. <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/#:~:text=The%20four%20most%20common%20cancers,7.8%20million%20in%20Omen>

WHO. (2020). WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240001299>

Yi, S., & Kaifer, A. E. (2011). Determination of the Purity of Cucurbit[n]uril (n = 7, 8) Host Samples. *The Journal Of Organic Chemistry*, 76(24), 10275-10278. <https://doi.org/10.1021/jo2018312>

Firmas:

_____ Fecha _____

Firma del Estudiante

_____ Fecha _____

Firma del Asesor

_____ Fecha _____

Firma del Co-Asesor