



Universidad de Panamá

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

Escuela de Química

Evaluación de la Encapsulación Supramolecular del Derivado Desmetilado de Azul de Toluidina en el Cucurbit[7]urilo y el Cucurbit[8]urilo y su Evaluación de sus Procesos Fotosensibilizados sobre la Enzima Superóxido Dismutasa *In Vitro*.

Director De Tesis :

Dr. José Luis Robinson Duggon

Elaborado Por :

Jennifer Michelle Otero González

8-963-49

**Trabajo de Graduación para optar por el título
de Licenciado en Química**

Panamá, junio de 2023

Evaluación de la Encapsulación Supramolecular del Derivado Desmetilado de Azul de Toluidina en el Cucurbit[7]urilo y el Cucurbit[8]urilo y su Evaluación de sus Procesos Fotosensibilizados sobre la Enzima Superóxido Dismutasa *In Vitro*.

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN QUÍMICA

PRESENTADO POR:

Jennifer Michelle Otero González

APROBADO POR:

José Luis Robinson Duggon _____

Mario Miranda Montenegro _____

Marcos Salazar _____

Damian Crespo _____

PANAMÁ

2023

A mi madre amada, Vicenta González.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios por la vida, por concederme las capacidades necesarias para formarme profesionalmente, por guiarme en cada paso que doy.

A la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología de la Universidad de Panamá por la oportunidad de formarme como investigadora. Al Departamento de Bioquímica por las instalaciones y equipos utilizados para la realización de la Tesis. A la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado y el Laboratorio de Bioorgánica Tropical por el apoyo en el uso del equipo UPLC-MS/MS y puesta a punto del método de espectrometría de masas para analizar las muestras.

Al Sistema Nacional de Investigación (SNI) y la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) por financiar el proyecto de investigación número PFID-FID-2021-189 de SENACYT. Al Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET) por brindarme el apoyo con los equipos utilizados para la realización de la tesis.

A mi tutor, José Luis Robinson Duggon, por toda su dedicación y enseñanzas, por apoyarme, animarme, guiarme y aconsejarme en cada momento de la realización de la tesis. A mi cotutor, Mario Miranda, por sus consejos y su apoyo durante la realización de la tesis. A los profesores Daniel Torres y Marcos Salazar por su dedicación y enseñanzas.

A mi colega de laboratorio Whitney Querini Sanguillén, por todo su apoyo, esfuerzo y las largas traspasadas durante la realización de la Tesis. A mi mejor amiga, Tiffany Aparicio, por su apoyo incondicional a lo largo de la carrera y por los momentos inolvidables. A mi madre, por todo su esfuerzo para proporcionarme todo lo que necesito, que me ha brindado su apoyo incondicional, por haberme formado con buenos hábitos y valores, por animarme y creer en que soy capaz de cumplir mis metas, por todo su amor y cariño.

Índice general

Índice de Tablas	iv
Índice de Figuras	v
Resumen	ix
Capítulo I. Introducción	1
1.1 Cáncer: Generalidades y Datos Estadísticos en Panamá	2
1.2 Terapia Fotodinámica	2
1.3 Fotosensibilizadores	4
1.3.1 Azul de Toluidina	6
1.4 Especies Reactivas de Oxígeno	9
1.4.1 Oxígeno Singulete	10
1.5 Los Cucurbiturilos y su Potencial como Transportadores de Fármacos	11
1.6 Enzimas Importantes en la TFD	13
1.6.1 Superóxido Dismutasa y su Rol Protector en la TFD	14
1.7 Hipótesis del Trabajo	15
1.8 Objetivos	15
1.8.1 Objetivo General	15
1.8.2 Objetivo Específico	15
Capítulo II. Metodología	16
2.1 Reactivos	17
2.2 Purificación del Azul de Toluidina	17
2.2.1 Cromatografía en Columna	17
2.3 Síntesis y Purificación del Derivado Doblemente Desmetilado	17

2.3.1 Preparación del Azul de Toluidina	17
2.3.2 Caracterización Fotofísica	18
2.3.3 Purificación del Derivado Doblemente Desmetilado	18
2.3.3.1 Cromatografía de Capa Fina	18
2.4 Espectrometría de Masas	19
2.5 Preparación de las Muestras	20
2.5.1 Preparación del CB[7]	20
2.5.2 Preparación del CB[8]	20
2.6 Irradiación de las Muestras	20
2.7 Espectros de Absorción y de Emisión del Fotosensibilizador y de los	
Complejos de Inclusión	21
2.7.1 Complejo de Inclusión con CB[7]	21
2.7.1.1 Titulación Espectrofotométrica del CB[7]	21
2.7.1.2 Encapsulación Supramolecular del Fotosensibilizador en CB[7]	21
2.7.1.3 Determinación de la Formación del Complejo de Inclusión con el	
Fotosensibilizador	21
2.7.1.4 Determinación de la Constante de Asociación	22
2.7.2 Complejo de Inclusión con CB[8]	22
2.7.2.1 Titulación Espectrofotométrica del CB[8]	22
2.7.2.2 Encapsulación Supramolecular del Fotosensibilizador en CB[8]	22
2.7.2.3 Determinación de la Formación del Complejo de Inclusión con el	
Fotosensibilizador	23
2.8 Determinación del Oxígeno Singulete	23

2.9 Degradación de la Superóxido Dismutasa por el Proceso Fotosensibilizado del dd-TBO ⁺	24
2.9.1 Electroforesis de la Superóxido Dismutasa	24
Capítulo III. Resultados y Discusión	25
3.1 Purificación del Azul de Toluidina	26
3.2 Síntesis y Purificación del Fotosensibilizador	31
3.3 Espectros de Absorción y de Emisión del Fotosensibilizador y de los Complejos de Inclusión	43
3.3.1 Complejo de Inclusión con CB[7] y CB[8]	43
3.3.1.1 Titulación Espectrofotométrica del CB[7]	44
3.3.1.2 Titulación Espectrofotométrica del CB[8]	45
3.3.1.3 Encapsulación Supramolecular del Fotosensibilizador en CB[7] y CB[8]	46
3.3.1.4 Determinación de la Formación del Complejo de Inclusión con el Fotosensibilizador	53
3.3.1.5 Determinación de la Constante de Asociación	53
3.4 Determinación del Oxígeno Singlete	55
3.5 Degradación de la Superóxido Dismutasa por el Proceso Fotosensibilizado del dd-TBO ⁺	60
3.5.1 Electroforesis de la Superóxido Dismutasa	60
Capítulo IV. Conclusiones	65
Recomendaciones	67
Referencias Bibliográficas	68

Índice de Tablas

Tabla 1. Máximos de absorción del TBO ⁺ en diferentes solventes para la evaluación del efecto solvatocrómico.	27
Tabla 2. Masas y abundancia de señales relativas del Azul de Toluidina antes y después de ser purificado.	30
Tabla 3. Intensidad de abundancias relativas de las señales del TBO ⁺ y sus derivados en acetonitrilo a tiempo 0, 1, 2 y 3 h.	39
Tabla 4. Máximos de absorción del dd-TBO ⁺ en diferentes solventes para la evaluación del efecto solvatocrómico.	43
Tabla 5. Resumen de los máximos de absorción y de emisión del dd-TBO ⁺ , de los complejos de inclusión dd-TBO ⁺ @CB[7] y dd-TBO ⁺ @CB[8] en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7.0.	49
Tabla 6. Valores obtenidos del software Scientist para la determinación de la constante de asociación del dd-TBO ⁺ @CB[7].	55

Índice de Figuras

Figura 1. Representación de la TFD y cómo el FS induce muerte celular (Adaptado de Robinson-Duggon <i>et al.</i> , 2018).	3
Figura 2. Diagrama de Jablonski de un FS en donde se representa su desactivación de estados excitados y reacciones fotoquímicas (Adaptado de Robinson-Duggon <i>et al.</i> , 2018).	5
Figura 3. Estructura química del Azul de Toluidina (TBO ⁺).	7
Figura 4. Mecanismo de la desmetilación fotooxidativo con luz visible del Azul de Toluidina (Adaptado de Robinson-Duggon <i>et al.</i> , 2019).	8
Figura 5. Cucurbit[n]urilos.	12
Figura 6. Espectro de absorbancia UV-Vis del Azul de Toluidina obtenido de sigma sin purificar en distintos solventes.	26
Figura 7. Espectro de masas del Azul de Toluidina obtenido de Sigma sin purificar en acetonitrilo.	28
Figura 8. Espectro de masas del Azul de Toluidina purificado, en acetonitrilo.	30
Figura 9. Espectro de absorbancia UV-Vis del TBO ⁺ purificado, en acetonitrilo.	31
Figura 10. Espectro de absorción UV-Vis del TBO ⁺ en acetonitrilo irradiado durante 3 horas.	32
Figura 11. Espectro de absorbancia UV-Vis de la degradación del Azul de Toluidina por 3 horas.	33
Figura 12. Cinética de fotodegradación del Azul de Toluidina para la síntesis del dd-TBO ⁺ irradiado por 3 horas con luz visible en acetonitrilo.	34

Figura 13. Espectro de masas del Azul de Toluidina en acetonitrilo en oscuro sin irradiar durante el transcurso del experimento como control.	35
Figura 14. Espectro de masas del Azul de Toluidina en acetonitrilo tras una hora de irradiación.	36
Figura 15. Espectro de masas del Azul de Toluidina en acetonitrilo tras dos horas de irradiación. Estructura del d-TBO ⁺ .	37
Figura 16. Espectro de masas del Azul de Toluidina en acetonitrilo tras tres horas de irradiación. Estructura del dd-TBO ⁺ .	38
Figura 17. Espectro de masas del Azul de Toluidina irradiado 5 horas en acetonitrilo.	40
Figura 18. Cromatografía de capa fina del derivado doblemente desmetilado.	41
Figura 19. Espectro de masas del derivado doblemente desmetilado (dd-TBO ⁺) en acetonitrilo purificado por cromatografía en capa fina.	42
Figura 20. Espectro de absorbancia del dd-TBO ⁺ en diferentes solventes.	43
Figura 21. Determinación de la concentración del CB[7] con Cob ⁺ en agua grado masas.	44
Figura 22. Titulación espectrofotométrica del CB[7] con Cob ⁺ en agua grado masas.	45
Figura 23. Determinación de la concentración del CB[8] con Cob ⁺ en agua grado masas.	46
Figura 24. Titulación espectrofotométrica del CB[8] con Cob ⁺ en agua grado masas.	46
Figura 25. Espectro de absorción de UV-Vis del derivado doblemente desmetilado de Azul de Toluidina y de los complejos de inclusión.	47
Figura 26. Espectro de emisión de fluorescencia del derivado doblemente desmetilado de Azul de Toluidina y de los complejos de inclusión.	48

Figura 27. Espectro de masas del cucurbit[7]urilo en agua grado masas.	50
Figura 28. Espectro de masas del derivado dd-TBO ⁺ encapsulado en CB[7] (dd-TBO ⁺ @CB[7]) en agua grado masas grado masas.	51
Figura 29. Espectro de masas del cucurbit[8]urilo en agua grado masas.	52
Figura 30. Espectro de masas del derivado dd-TBO ⁺ encapsulado en CB[8] (dd-TBO ⁺ @CB[8]) en agua grado masas.	53
Figura 31. Curva de unión del complejo dd-TBO ⁺ @CB[7].	54
Figura 32. Espectro de absorbancia de UV-Vis del ABMA antes y después de ser irradiado con luz blanca.	56
Figura 33. Fluorescencia normalizada de ABMA.	57
Figura 34. Fluorescencia normalizada del ABMA con dd-TBO ⁺ irradiado con luz visible durante 30 min en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7.0.	59
Figura 35. Fluorescencia normalizada del ABMA con dd-TBO ⁺ @CB[7] irradiado con luz visible durante 30 min en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7.0.	59
Figura 36. Fluorescencia normalizada del ABMA con dd-TBO ⁺ @CB[8] irradiado con luz visible durante 30 min en Solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7.0.	60
Figura 37. Gel de poliacrilamida no reductor al 8 % con SOD (25 μM) a 0 y 30 min de irradiación.	61
Figura 38. Gel de poliacrilamida reductor al 8 % con SOD (25 μM) sin irradiar, y SOD con dd-TBO ⁺ a 0 y 30 min de irradiación.	62

- Figura 39.** Gel de poliacrilamida reductor al 12 % con SOD (10 μM) sin irradiar, y SOD con dd-TBO⁺ a 0 y 30 min de irradiación. 63
- Figura 40.** Gel de poliacrilamida reductor al 12 % con SOD (2.5 μM) sin irradiar, y SOD con dd-TBO⁺ a 0 y 30 min de irradiación. 63
- Figura 41.** Gel de poliacrilamida reductor al 12 % con SOD (0.5 μM) sin irradiar, y SOD con dd-TBO⁺ a 0 y 30 min de irradiación. 64

Resumen

El cáncer es una enfermedad que se presenta cuando las células se multiplican sin control y se diseminan a los tejidos que las rodean. Es la principal causa de muerte en el mundo, y por esto los médicos y científicos buscan mejores métodos para el tratamiento de las personas que padecen de esta enfermedad.

Una de las alternativas terapéuticas es la Terapia Fotodinámica. En este contexto, la realización de esta tesis tiene como finalidad proponer un nuevo fotosensibilizador, mediante la síntesis y caracterización fotofísica y fotoquímica de un derivado de la molécula Azul de Toluidina, que sea estable y que su encapsulación en macrociclos potencie su fototoxicidad. A su vez, se evaluarán los procesos fotosensibilizados sobre la enzima Superóxido Dismutasa.

Queda evidenciado que este derivado tiene la capacidad de generar una mayor cantidad de oxígeno singulete, que la molécula madre. Se demostró que encapsulado en CB[7] no solo genera casi la misma cantidad oxígeno singulete que la molécula sola, al cabo de 30 min, sino que se protege de la fotodegradación. Adicionalmente, queda evidenciado que el mecanismo predominante para este derivado es el Tipo II, mecanismo deseado en la Terapia Fotodinámica. Por otra parte, el derivado puede causar un ligero cambio en la enzima Superóxido Dismutasa, pero se requieren de técnicas más sensibles para la evaluación del efecto causado sobre la misma.

Capítulo I.

Introducción

1.1 Cáncer: Generalidades y Datos Estadísticos en Panamá

El cáncer es una enfermedad por la que algunas células del cuerpo se multiplican sin control y se diseminan a otras partes del cuerpo (Instituto Nacional del Cáncer, 2021). En el 2020 se atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de defunciones y alrededor de 19.3 millones de nuevos casos a nivel mundial (Ferlay J. *et al.*, 2020). De acuerdo con el Boletín No. 18 del Departamento de Registros y Estadísticas de Salud del Instituto Oncológico Nacional, que comprende de enero a diciembre del 2021, la incidencia de casos en Panamá fue de 4.591 y la mortalidad reportada fue de 562 (REGISTROS & SALUD, 2021). Esta enfermedad es la principal causa de muerte en el mundo, por esta razón, los médicos y los científicos buscan mejores métodos para el tratamiento de las personas que padecen de cáncer.

Actualmente se formulan y se estudian nuevos medicamentos y, también se investigan nuevas maneras de utilizar aquellos que ya están disponibles para el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, las pruebas clínicas para los diversos tipos de fármacos que han demostrado potencial actividad, lamentablemente, no han tenido el resultado esperado (Bergh, 2009).

Hay diversos tipos de tratamiento para esta enfermedad, pero muchos de estos no tienen especificidad hacia las células tumorales, sino que bloquean o destruyen tanto las células sanas como las anormales, tal es el caso de la quimioterapia. He aquí la importancia de desarrollar alternativas de tratamientos locales para potenciar la eficiencia de las terapias y de esta manera, mejorar la calidad de vida de los pacientes.

1.2 Terapia Fotodinámica

La Terapia Fotodinámica (TFD) es una alternativa de tratamiento local para el cáncer. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) aprobó la terapia

fotodinámica para aliviar los síntomas y tratar diversos tipos de cánceres y cambios precancerosos como la queratosis actínica, cáncer de células basales de la piel, cáncer de esófago, entre otros (Instituto Nacional del Cáncer, 2021). En esta terapia se utiliza un fotosensibilizador (FS), que es incorporado de manera selectiva en el tejido tumoral para su posterior irradiación con luz de energía adecuada, tal como se muestra en la **Figura 1**. De esta manera, la luz logra penetrar el tejido a la longitud de onda de absorción del fotosensibilizador, y con esto, en presencia de oxígeno, se induce la muerte del tejido dañado, es decir, las células cancerosas, al generarse el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y otras especies reactivas de oxígeno (ERO).

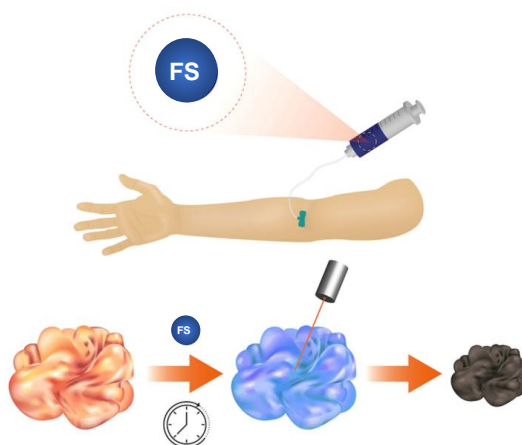


Figura 1. Representación de la TFD y cómo el FS induce muerte celular (Adaptado de Robinson-Duggon *et al.*, 2018).

El mecanismo de la TFD se basa en la excitación electrónica del fotosensibilizador por la acción de la luz, desde su estado basal (S_0) al primer estado singulete excitado (S_1). Luego ocurre un cruce entre sistemas del fotosensibilizador del estado S_1 a un estado triplete excitado (T_1), que es desde el cual se llevan a cabo las reacciones químicas, tal como se muestra en la **Figura 2**. En la ausencia de un cruce entre sistemas, o bajo rendimiento cuántico del estado triplete, el

fotosensibilizador retorna a su estado basal, ya sea con la emisión de luz, proceso denominado como fluorescencia; por procesos de desactivación no radiativa o por conversión interna.

El uso de esta terapia limita el daño a las células sanas ya que los fotosensibilizadores se suelen acumular en las células cancerosas y la luz se enfoca en estas de forma directa (Instituto Nacional del Cáncer, 2021). La principal ventaja de la TFD sobre otros tipos de terapias es el hecho de que la misma no induce resistencia como muchos fármacos, además puede administrarse en un único tratamiento en comparación con la radioterapia o la quimioterapia.

1.3 Fotosensibilizadores

Parte fundamental para la adecuada aplicación de la TFD son los fotosensibilizadores. Los FS son agentes que generan especies reactivas de oxígeno tras la irradiación óptica, y pueden utilizarse para inactivar proteínas seleccionadas o para la muerte celular inducida por la luz (Fang-Yen, C, *et al.*, 2012). Los principales fotosensibilizadores empleados en esta terapia son los derivados de porfirina y del ácido 5-amino levulínico (ALA), sin embargo, se continúa en la búsqueda de nuevas estructuras con el fin de obtener mayor eficacia en los tratamientos (Comini, 2016). Un buen FS para Terapia Fotodinámica presenta un alto rendimiento cuántico de cruce entre sistemas, denominado como CIS, como se muestra en la **Figura 2**.

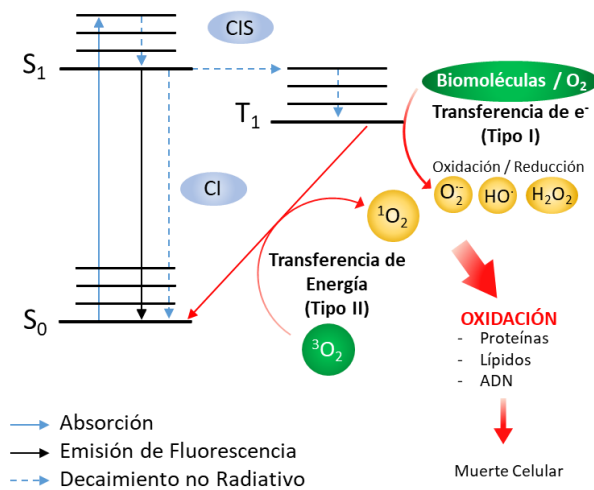


Figura 2. Diagrama de Jablonski de un FS en donde se representa su desactivación de estados excitados y reacciones fotoquímicas (Adaptado de Robinson-Duggon *et al.*, 2018).

Es a partir de T₁, de cruce entre sistemas, que se generan especies reactivas de oxígeno, principalmente oxígeno singlete (¹O₂). El oxígeno molecular (O₂) en su estado basal existe como estado triplete (³O₂) y al recibir la energía del fotosensibilizador genera ¹O₂, proceso denominado mecanismo del Tipo II. Una característica a destacar es que en este tipo de mecanismo se regenera el FS, por lo que es ideal en terapia fotodinámica. Adicionalmente, algunos fotosensibilizadores pueden reaccionar directamente con moléculas orgánicas por procesos de transferencia de carga y formar radicales, a este proceso se le conoce como mecanismo del Tipo I, como se muestra en la **Figura 2** (Buytaert *et al.*, 2007).

Los fotosensibilizadores deben tener características específicas para maximizar su utilidad y potenciar sus efectos. Entre estas características deben tener:

- (1) un rendimiento cuántico alto de formación de oxígeno singlete;
- (2) alto coeficiente de absorción, de 600 a 800 nm;
- (3) no debe presentar toxicidad en oscuro y sólo debe ser citotóxico en presencia de luz;
- (4) no debe generar metabolitos tóxicos;

- (5) debe acumularse selectivamente en el tejido tumoral y ser eliminado eficientemente;
- (6) debe distribuirse de manera adecuada, lo cual se favorece al ser anfifílico para que sea soluble en agua y también pueda cruzar la membrana de la célula;
- (7) debe ser químicamente estable y soluble para la preparación en formulaciones farmacéuticas inyectables;
- (8) debe ser sintetizado fácilmente y ser químicamente puro;
- (9) de bajo costo y disponible de manera comercial y
- (10) no debe ser agente mutagénico o cancerígeno (Castano *et al.*, 2004).

Los fotosensibilizadores de primera generación incluyen el derivado de la Hematoporfirina (HpD) y Photofrin[®]. Aquellos de segunda generación como las ftalocianinas, metaloporfirinas, protoporfirinas, clorinas y otros, fueron desarrollados debido a problemas de fotosensibilidad cutánea y poca penetración de la luz requerida en el tejido por los fotosensibilizadores de primera generación (O'Connor *et al.*, 2009). El nombre de fotosensibilizadores de tercera generación es utilizado para describir a aquellos de segunda generación asociados a transportadores tales como anticuerpos y liposomas, para potenciar su acumulación selectiva en el tejido tumoral (Juzeniene *et al.*, 2007).

A pesar de que los fotosensibilizadores del tipo porfirina son los más utilizados, también se han realizados estudios para caracterizar y obtener fotosensibilizadores del tipo no porfirina, como lo son las cianinas, antraciclina, Azul de Metileno, Azul de Toluidina y otros (Dichiara *et al.*, 2017).

1.3.1 Azul de Toluidina.

El Azul de Toluidina (TBO⁺) es un colorante orgánico catiónico de la familia de las fenotiazinas. Se compone de una estructura de tres anillos en el que, dos anillos de benceno se unen con un

átomo de azufre y de nitrógeno en posiciones no adyacentes, como se puede observar en la **Figura 3**. Se ha reportado que una vez irradiado puede erradicar varios agentes microbianos *in vitro* (Wilson *et al.*, 1995; Wilson & Mia, 1993; Wilson & Yianni, 1995) y tiende a acumularse en las células tumorales *in vivo* (Eliezri, 1988; Epstein *et al.*, 1997; Herlin *et al.*, 1983). El TBO⁺ ha sido utilizado en aplicaciones tópicas por más de treinta años para ayudar en la detección de ciertos tipos de cáncer de la cavidad oral y de la parte superior del tracto gastrointestinal (Eliezri, 1988; Epstein *et al.*, 1997; Herlin *et al.*, 1983). Es utilizado como fotosensibilizador en Terapia Fotodinámica porque ha presentado baja toxicidad en oscuro (sin irradiar), selectividad hacia el tejido neoplásico y puede inducir apoptosis, las cuales son características deseables en dicha terapia (Tremblay *et al.*, 2002).

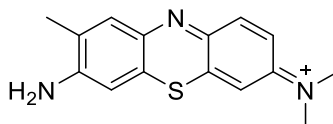


Figura 3. Estructura química del Azul de Toluidina (TBO⁺).

Se ha reportado que el rendimiento cuántico de oxígeno singlete para el TBO⁺, es dependiente del pH y puede variar de 0.2 a 0.9 cuando se realizan experimentos de pH ácidos hasta alcalinos (Redmond & Gamlin, 1999). Por otra parte, el rendimiento cuántico del oxígeno singlete fue de 0.18 al caracterizar las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del TBO⁺ en solución amortiguadora a pH 7 (Robinson-Duggon *et al.*, 2017).

En la literatura se han reportado diversos métodos para tratar de mejorar el desempeño del TBO⁺ en la terapia fotodinámica. Uno de estos métodos es utilizar la derivatización para tratar de mejorar la selectividad por el tejido tumoral (Robinson-Duggon *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2016).

De igual manera, se ha tratado de mejorar la bioacumulación y biodistribución por medio de la utilización de vehículos de transporte (Graciano *et al.*, 2015; Sztandera *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2016). Sin embargo, todos los métodos que han sido reportados, para tratar de optimizar el desempeño del TBO⁺ en la terapia fotodinámica, no han tomado en consideración la posibilidad del proceso fotooxidativo, que fue reportado en el 2019 por Robinson-Duggon *et al.*, descrito en la **Figura 4**.

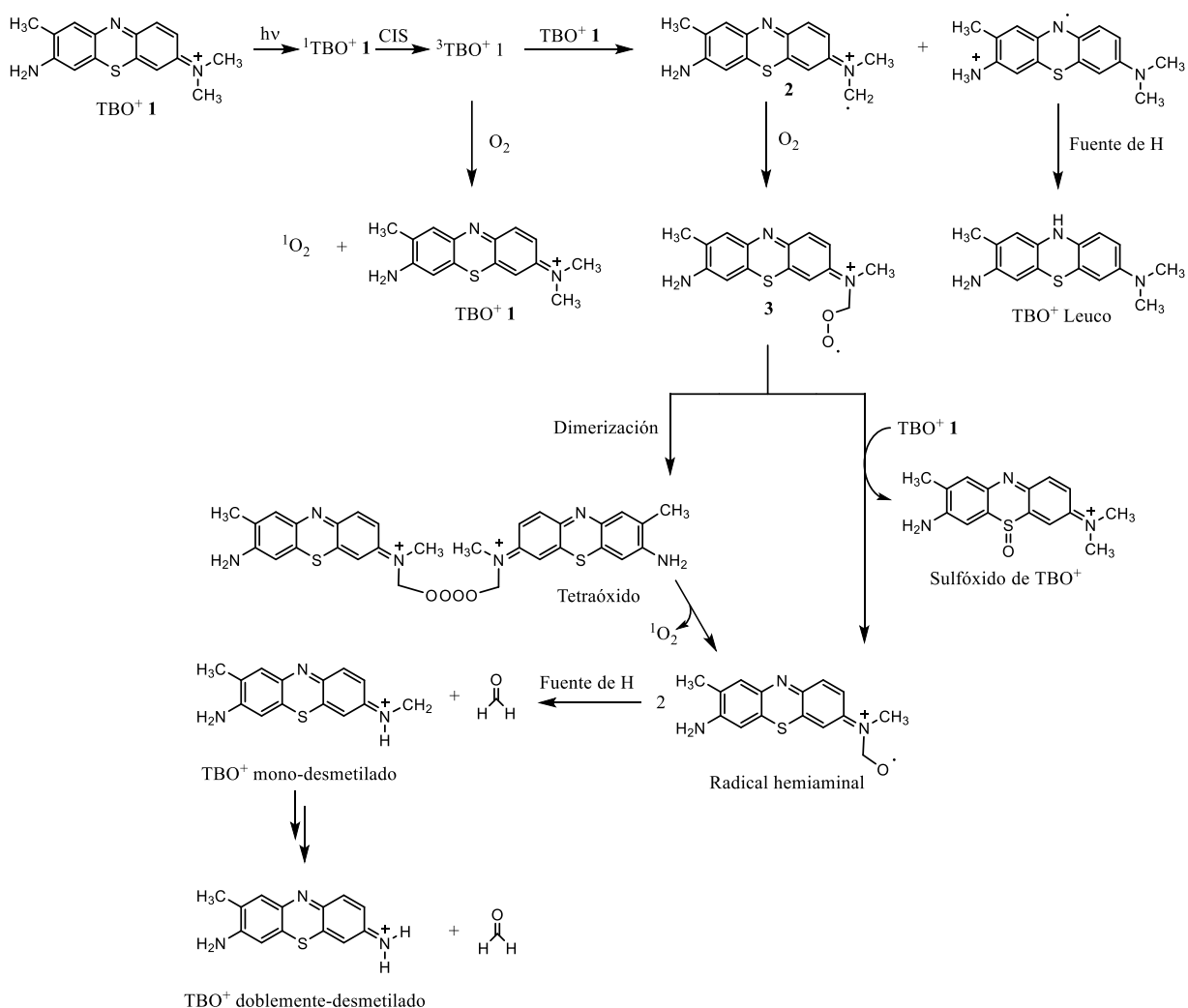


Figura 4. Mecanismo de la desmetilación fotooxidativo con luz visible del Azul de Toluidina (Adaptado de Robinson-Duggon *et al.*, 2019).

Como se mencionó anteriormente, el TBO⁺ es usado como FS en TFD, sin embargo, Robinson-Duggon *et al.* Han estudiado el mecanismo de desmetilación fotooxidativo con luz visible, en donde la generación de oxígeno singulete no es el único fotoproceso que se está llevando a cabo. Como se puede observar en la **Figura 4**, la irradiación conlleva a la formación de otros productos a partir de N,N-Dimetilamina (DMA), entre ellos el TBO⁺ doblemente desmetilado, molécula de interés sintético en esta tesis. La síntesis, caracterización y evaluación de los procesos fotosensibilizados de esta molécula se debe a que la ausencia del extremo DMA, potenciará la formación de oxígeno singulete al eliminar los demás procesos fotooxidativos que están ocurriendo de manera simultánea.

1.4 Especies Reactivas de Oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son los productos generados por los FS en la TFD. Estos son un tipo de molécula inestable que contiene oxígeno y que reacciona fácilmente con otras moléculas de una célula. La acumulación de ERO en las células puede dañar el ADN, el ARN y las proteínas, provocando la muerte celular (NCI Dictionary of Cancer Terms, s. f.). Las ERO se producen durante una variedad de reacciones bioquímicas dentro de los orgánulos celulares, como el retículo endoplásmico, las mitocondrias y los peroxisomas. Naturalmente, las ERO también se forman como subproductos del metabolismo normal del oxígeno (Reactive Oxygen Species, 2022).

A partir de varios estudios experimentales, se informa que las ERO actúan como agente supresor de tumores. El nivel elevado de ERO puede detener el crecimiento de tumores a través del aumento persistente en la inhibición del ciclo celular. Este aumento de las especies reactivas de oxígeno puede inducir la apoptosis, por lo que se considera un agente supresor de tumores ya

que la producción de estas se debe al uso de la mayoría de los agentes quimioterapéuticos para activar la muerte celular (Reactive Oxygen Species, 2022).

Las ERO incluyen: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido ($\cdot O_2^-$), oxígeno singulete (1O_2), y radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Yang H, *et al.*, 2018). Estos actúan como segundos mensajeros en la señalización celular y son esenciales para varios procesos biológicos en células normales y cancerosas (Chio IIC *et al.*, 2017).

Las especies reactivas de oxígeno secundarias, como los peróxidos, son menos reactivas, por tanto, tienen mayores coeficientes de difusión, transportando el daño hacia otras partes de la célula y aumentando el estrés oxidativo (Hamblin & Mróz, 2008; Davies *et al.*, 1995).

Desde el punto de vista de la terapia fotodinámica, el efecto sobre las células se atribuye principalmente al oxígeno singulete. Sin embargo, debido a la corta vida de esta especie, su acción se limita al entorno del fotosensibilizador (Hamblin & Mróz, 2008; Allison *et al.*, 1995).

1.4.1 Oxígeno Singulete.

El oxígeno singulete es un oxidante muy fuerte que oxida fácilmente componentes celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Se produce por activación fotoquímica, térmica, química o enzimática del O_2 . La mayor parte del oxígeno singulete, en biología, se genera mediante reacciones de fotosensibilización (Halliwell, 2006b) en las que un fotosensibilizador apropiado se excita electrónicamente y luego transfiere energía al oxígeno.

La producción fotosensibilizada de oxígeno singulete tiene mucha importancia para las áreas de síntesis orgánica, fotooxidación, daño al ADN, terapia fotodinámica del cáncer y para la ciencia de los polímeros (DeRosa & Crutchley, 2002; Ghogare & Greer, 2016). Cada molécula de fotosensibilizador usualmente puede producir 10^3 - 10^5 moléculas de 1O_2 antes de ser degradadas por fotoblanqueo por el 1O_2 o por otros procesos (DeRosa & Crutchley, 2002).

Una vez formado el oxígeno singlete este puede ser desactivado por otras especies a su estado basal por medio de una desactivación física, en la cual solo se desactiva el oxígeno singlete sin generar la formación de productos. Otra manera, es la desactivación química, donde el desactivador reacciona con el oxígeno singlete para generar nuevos productos (DeRosa & Crutchley, 2002).

El tiempo de vida del oxígeno singlete es de corta duración, en agua de aproximadamente 4 μ s, esto limita su difusión a 200 nm y por ende su daño se da en la proximidad de su generación (Redmond & Kochevar, 2006). Hay que señalar, que no puede ser interconvertida a otras especies reactivas de oxígeno de manera directa, pero sí de manera indirecta. Mientras que las otras ERO se pueden formar por reacciones en cascada (Hamblin & Mróz, 2008).

En la terapia fotodinámica, un fotosensibilizador es excitado por la irradiación para producir oxígeno singlete, que luego se utiliza para destruir las células cancerosas (Manda *et al.*, 2009).

1.5 Los Cucurbiturilos y su Potencial como Transportadores de Fármacos

Como ya se mencionó, se ha tratado de mejorar la bioacumulación y biodistribución de fármacos por medio de la utilización de vehículos de transporte, tales como los cucurbiturilos.

Los cucurbiturilos, (CB[n] = 5-8, 10), son una familia de contenedores moleculares que se denominan así por su forma parecida a la de una calabaza, como se muestra en la **Figura 5**. Los mismos son macrociclos sintéticos, los cuales se encuentran constituidos por la condensación de unidades de glicolurilos, unidas a través de puentes de metileno para formar un macrociclo con una cavidad hidrofóbica, la cual es accesible a las moléculas huésped por medio de dos portales idénticos (Murray *et al.*, 2017). Estos macrociclos han generado mucha discusión y trabajo en la última década por sus propiedades de unión a moléculas con carga positiva y

neutras (Assaf & Nau, 2015). Estas moléculas interactúan con los CB[n] por medio de interacciones hidrofóbicas o por cationes metálicos y las aril o alquilaminas a través de interacciones ion-dipolo con los carbonilos del portal del macrociclo (Isaacs, 2009).

Los cucurbiturilos han sido estudiado por sus aplicaciones como vehículo para el transporte de fármacos, ya que tienen la capacidad de secuestrar las moléculas en su interior generando una barrera estérica que evita la degradación y desactivación de las propiedades terapéuticas de los fármacos (Macartney, 2011; Walker *et al.*, 2011). Además de esto, evitan la agregación de fármacos mejorando su solubilidad (Macartney, 2011; Montes-Navajas *et al.*, 2008), característica que es muy deseada para la formulación (Macartney, 2011; Walker *et al.*, 2011).

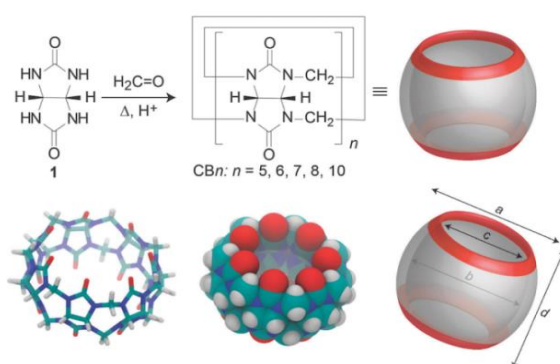


Figura 5. Cucurbit[n]urilos. Las dimensiones son: (a) ancho externo 13.1-20.0 Å, (b) ancho de cavidad 4.4-11.7 Å, (c) ancho del portal 2.4-10.0 Å y (d) altura 9.1 Å (Robinson-Duggon, 2018).

El tamaño del portal incrementa a lo largo de la serie de los cucurbiturilos, lo cual les confiere propiedades de reconocimiento. El CB[7] es el macrociclo dentro de esta familia de contenedores moleculares, que ha generado mayor interés por su elevada solubilidad en agua y en fluidos biológicos, además de que su tamaño permite el ingreso de moléculas de interés para formar complejos 1:1 (Isaacs, 2009). Por otra parte, el CB[8] tiene una cavidad más grande por

lo cual forma complejos del tipo 1:2 ó complejos ternarios 1:1:1 (Kim *et al.*, 2007; Ling *et al.*, 2007; Mohanty *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007).

Estudios reportados por diversos investigadores demuestran que los cucurbiturilos no presentan toxicidad intrínseca y, se ha demostrado que pueden atravesar la membrana celular, potenciar la actividad terapéutica de los fármacos, evitar la degradación enzimática y proteger de la fotodegradación (Hettiarachchi *et al.*, 2010; Macartney, 2011; Montes-Navajas *et al.*, 2009; Uzunova *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2011).

1.6 Enzimas Importantes en la TFD

Las células dependen de mantener la homeostasis redox del organismo para su supervivencia. Se pueden presentar algunos casos donde las especies reactivas de oxígeno inducen estrés, lo cual conlleva a una modificación de las funciones. Esta situación en particular se denomina estrés oxidativo, la cual se caracteriza por el incremento de las especies reactivas de oxígeno con la afectación o discapacidad de los mecanismos de defensa celular. Para evitar o disminuir esta situación las células contienen una serie de enzimas antioxidantes como la Superóxido Dismutasa (SOD), Glutatión peroxidasa y la Catalasa (CAT), para garantizar el balance de las ERO en las células. Aunado a esto, moléculas pequeñas como la vitamina E, carotenoides y vitamina C ayudan a las enzimas antioxidantes a mantener los niveles adecuados de ERO en las células (Uzunova *et al.*, 2010).

Se consideran como antioxidantes de primera línea a la SOD y CAT, ya que ellas no requieren de glutatión para su función, mientras que los antioxidantes secundarios dependen de su disponibilidad (González-Béjar, M. *et al.*). Existen múltiples estudios que han reportado la sobreexpresión de estas enzimas antioxidantes como mecanismo de citoprotección de las células

tumorales que han sido sometidas a la TFD (Agostinis, P., *et al.*, 2011; Scholtbach, K., *et al.*, 2015; Cáceres, J. *et al.*, 2017).

Este proyecto va dirigido hacia el estudio fotooxidativo de una de estas enzimas antioxidantes de primera línea, la cual es la SOD.

1.6.1 Superóxido Dismutasa y su Rol Protector en la TFD.

La Superóxido Dismutasa (SOD) fue la primera enzima de la cual se conoció que actuaba sobre un radical libre. Su descubrimiento en 1968 por McCord y Fridovich, constituyó una prueba de la existencia de estos radicales en los organismos vivos (García Triana, 1995). Son una familia de enzimas que están presentes en el metabolismo aeróbico y tienen la función biológica de descomponer el radical anión superóxido, (O_2^-) (Miller, 2012; Miller, 2004; Perry *et al.*, 2010) por lo cual son parte importante del sistema de protección enzimática, para garantizar que se minimice el daño por las especies reactivas de oxígeno que se puedan generar durante procesos metabólicos aeróbicos y de esta manera evitar que se genere el estrés oxidativo (Perry *et al.*, 2010). La SOD cataliza la conversión del radical anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (Hamblin & Mróz, 2008).

La enzima está presente en la mayor parte de los tejidos a una concentración de aproximadamente 1×10^{-5} M (Torre, R, 2000). Además, se ha reportado que la actividad catalítica de las SOD a 25 °C es cercana a $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Horton, 2008) y se encuentra presente en diferentes patologías en las que está involucrado el estrés oxidativo (Salvemini *et al.*, 2002).

1.7 Hipótesis del Trabajo

La síntesis fotoquímica del derivado doblemente desmetilado de Azul de Toluidina, dd-TBO⁺, junto a su encapsulación supramolecular en los macrociclos CB[7] y CB[8] modificará tanto sus propiedades fotofísicas como las fotoquímicas y, a su vez potenciará su fotoactividad.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo General.

Evaluar la encapsulación supramolecular de dd-TBO⁺ en CB[7] y CB[8] para mejorar su fototoxicidad a través de la formación de complejos de inclusión.

1.8.2 Objetivo Específico.

- Sintetizar fotoquímicamente el derivado desmetilado de Azul de Toluidina.
- Caracterizar fotofísica y fotoquímicamente el derivado desmetilado de Azul de Toluidina.
- Caracterizar fotofísica y fotoquímicamente el complejo de inclusión del derivado desmetilado de Azul de Toluidina con el CB[7] y CB[8].
- Determinar la asociación del derivado desmetilado de Azul de Toluidina con el CB[7].
- Evaluar el efecto de los procesos fotosensibilizados por el derivado desmetilado de Azul de Toluidina sobre la enzima Superóxido Dismutasa *in vitro*.

Capítulo II.

Metodología

2.1 Reactivos

Azul de Toluidina (TBO⁺), etanol absoluto, ácido clorhídrico, cucurbit[n]urilos (CB[n], n = 7, 8), hexafluorofosfato de bis(ciclopentadienil)cobalto(III) (Cob⁺), metanol hipergrado para LC-MS, acetonitrilo, ácido clorhídrico, ácido 9,10-antracenediil-bis(metileno)dimalónico (ABMA), fosfato disódico, fosfato monosódico, agua grado masas, dimetilsulfóxido (DMSO), hexacianoferrato de tripotasio (FeCy), azida de sodio (NaN₃), agua deuterada, enzima Superóxido Dismutasa (SOD), TEMED, persulfato de amonio, 2-propanol.

2.2 Purificación del Azul de Toluidina

2.2.1 Cromatografía en Columna.

El Azul de Toluidina (TBO⁺) (CAS: 92-31-9, Sigma-Aldrich) se purificó en una columna abierta de vidrio de 15 cm de largo × 10 mm de diámetro. Se utilizó sílica gel 60, (CAS: 7631-86-9, Merck Millipore) de 35 – 70 μm de poro, como fase estacionaria y una mezcla de etanol y ácido clorhídrico (99:1) como fase móvil constante (Robinson-Duggon, J, *et al.*, 2019).

2.3 Síntesis y Purificación del Derivado Doblemente Desmetilado

2.3.1 Preparación del Azul de Toluidina.

En un vial ámbar que contenía 5 mL del eluyente, el cual es una mezcla de etanol y ácido clorhídrico (99:1), se disolvieron 5 mg de Azul de Toluidina. Se sometió tres veces a sonicación, cada una duró un minuto.

2.3.2 Caracterización Fotofísica.

Para la caracterización del dd-TBO⁺ se utilizó la ecuación de Lambert-Beer para conocer la absorbancia de TBO⁺, en la cual la concentración fuese de 12.5 μM. El máximo de absorción del TBO⁺ es 626 nm, por esta razón todas las muestras se ajustaron a 0.5 de absorbancia en esta longitud de onda utilizando acetonitrilo como disolvente. Los datos fueron colectados en un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis y se utilizó una celda de cuarzo, con una longitud de paso de luz de 1 cm. Las muestras se leyeron en un rango de 200 a 850 nm con intervalo de 1 nm entre lectura y se realizó la corrección de la línea base.

Se preparó un control de TBO⁺ guardado en oscuridad durante el tiempo de irradiación de las demás muestras, las cuales se irradiaron en celdas de cuarzo, con una longitud de paso de luz de 1 cm. Las muestras se irradiaron a tiempos de 1 h, 2 h, 3 h y 5 h en un fotorreactor hecho a la medida con una lámpara de diodo emisor de luz (LED) blanca de 150 mm × 27.2 mm × 150 mm y 30 W, con una iluminancia de aproximadamente 32369 lux.

2.3.3 Purificación del Derivado Doblemente Desmetilado.

2.3.3.1 Cromatografía de Capa Fina

Para realizar la cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC por sus siglas en inglés), todas las muestras se secaron con nitrógeno y se redisolvieron en la fase móvil, la cual fue una mezcla de etanol y ácido clorhídrico (99:1); como fase estacionaria se utilizó una placa de sílica gel F₂₅₄ (Merck, Supelco) 20 × 20 cm. Se dejó eluir por 3 horas la TLC siguiendo el método utilizado por Robinson-Duggon en el 2019.

2.4 Espectrometría de Masas

El TBO⁺ antes y después de la purificación se disolvió en acetonitrilo (grado LC-MS) hasta una concentración de 2 µM y se determinó su pureza inyectando por infusión directa en el espectrómetro de masas de la Universidad de Panamá. De igual manera la pureza del derivado doblemente desmetilado de Azul de Toluidina se determinó antes y después de su purificación, evaporando el solvente de la muestra purificada, obtenida de la TLC, y concentrándola en acetonitrilo (grado LC-MS) hasta 2 µM para su posterior inyección directa en el espectrómetro de masas.

Las condiciones del rotaevaporador son: temperatura del baño de agua 47 °C, rotación del balón 105 rpm y presión de la bomba 600 mmHg.

También se determinó la encapsulación supramolecular del dd-TBO⁺@CB[7], preparado como se describe en la sección **3.3.1.3 Encapsulación supramolecular del fotosensibilizador en CB[7] y CB[8]**. Todas las muestras preparadas para inyectar por infusión directa en el espectrómetro de masas fueron filtradas utilizando un filtro de 0.22 µm y se inyectaron por infusión directa en un espectrómetro Waters XEVO® TQD (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.). Se utilizó una fuente de ionización por electrospray (ESI) positivo. Para el TBO⁺ antes y después de ser purificado, las diferentes fracciones obtenidas de la purificación y del dd-TBO⁺ antes y después de ser purificado, en acetonitrilo, se utilizaron las siguientes condiciones para colectar los diferentes espectros de masas: temperatura de la sonda 150 °C, tensión del cono de 30 V, tensión de la corona capilar de 3.70 kV, temperatura de desolvatación 450 °C, flujo de gas de desolvatación 400 L/h, flujo de gas del cono 30 L/h, flujo de infusión de 5.0 mL/min. La detección se realizó en modo de barrido completo en el intervalo 230-290 m/z. Para la medición de espectrometría de masas del dd-TBO⁺@CB[7] y el dd-TBO⁺@CB[8] en agua grado masas

se cambiaron las siguientes condiciones: tensión de la corona capilar de 3.50 kV, flujo de gas del cono 60 L/h y la detección se realizó en modo de barrido completo en el intervalo 200-1500 m/z.

2.5 Preparación de Muestras

2.5.1 Preparación del CB[7].

Se pesó la cantidad necesaria de CB[7] y se diluyó en agua grado masas en proporción de 1.5 mg/mL. Posteriormente, se dejó en agitación durante 24 horas y se filtró con un filtro de 0.22 μm .

2.5.2 Preparación del CB[8].

Se pesó la cantidad necesaria de CB[8] y se diluyó en agua grado masas en proporción de 1.5 mg/10 mL. Posteriormente, se dejó en agitación durante 24 horas. Se sonicó cada 3 minutos durante 15 minutos y se filtró con un filtro de 0.22 μm .

2.6 Irradiación de las Muestras

Para los experimentos de caracterización del derivado doblemente desmetilado de Azul de Toluidina se irradió la muestra en un fotorreactor hecho a la medida. El mismo cuenta con una lámpara de diodo emisor de luz (LED), la cual tiene una iluminancia de aproximadamente 32369 lux. Por otra parte, los experimentos con el dd-TBO⁺ se realizaron utilizando un iluminador de Luzchem. Para ello se utilizó el cabezal multicolor, haciendo uso de la luz LED blanca e irradiando con 0.01 de intensidad. Las muestras fueron agitadas con el agitador magnético acoplado en el iluminador durante todas las irradiaciones.

2.7 Espectros de Absorción y de Emisión del Fotosensibilizador y de los Complejos de Inclusión

2.7.1 Complejo de Inclusión con CB[7].

2.7.1.1 Titulación Espectrofotométrica del CB[7]

Se preparó una alícuota de 3 mL de Cob⁺ 17.54 μM, la cual fue ajustada en la longitud de onda máxima (261 nm) a una absorbancia de 0.6. Se añadió en incrementos de 8 μL el CB[7] hasta un volumen de 120 μL, y en cada adición de dicho volumen se colectaron los datos en el espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis.

2.7.1.2 Encapsulación Supramolecular del Fotosensibilizador en CB[7]

Para evaluar la encapsulación del dd-TBO⁺ en el CB[7], se preparó una solución de dd-TBO⁺ 2 μM con el CB[7] a 50 μM hasta un volumen de 3 mL utilizando solución amortiguadora de fosfato 10 mM con pH 7. Adicionalmente se preparó una solución que no contiene el CB[7] hasta un volumen final de 3 mL. A cada una de estas muestras preparadas se le hace un barrido en el espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis en un rango de 200 nm a 850 nm.

2.7.1.3 Determinación de la Formación del Complejo de Inclusión con el Fotosensibilizador

Para evaluar la formación del complejo se colectó el espectro de absorbancia del dd-TBO⁺ en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7.0, antes y después de añadirle el CB[7], en el espectrofotómetro UV-Vis haciendo un barrido de 200 nm a 850 nm. De igual manera se colectó el espectro de fluorescencia, excitando las muestras al máximo de absorción para las moléculas solas y en un punto donde no cambia la absorbancia cuando se forma el complejo con el CB[7], en un fluorímetro Fluoromax[®]-4 de HORIBA. Adicionalmente se inyectó por infusión directa en el espectrómetro de masas la molécula sola y encapsulada en agua grado

masas y se tomó el espectro de masas de 200 a 1500 m/z con las condiciones descritas en la sección **2.4 Espectrometría de Masas**.

2.7.1.4 Determinación de la Constante de Asociación

La determinación de la constante de asociación se realizó mediante una curva de unión, en la cual se prepararon 2 soluciones: una con el dd-TBO⁺ a 2 μM; y la otra con el complejo dd-TBO⁺@CB[7], con el dd-TBO⁺ a 2 μM y el CB[7] a 50 μM. Ambas soluciones en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7. Se realizaron varios puntos de 1 mL de volumen total, en donde se mantiene constante la concentración del dd-TBO⁺ (2 μM) y varía la concentración del CB[7] de 0 hasta 50 μM. Se midieron los puntos en un fluorímetro Fluoromax[®]-4 de HORIBA, excitando a la longitud donde la absorbancia no cambia en el espectro de absorbancia del dd-TBO⁺ antes y luego de ser encapsulado.

2.7.2 Complejo de Inclusión con CB[8].

2.7.2.1 Titulación Espectrofotométrica del CB[8]

Se preparó una alícuota de 3 mL de Cob⁺ 4.39 μM, la cual fue ajustada en la longitud de onda máxima (261 nm) a una absorbancia de 0.15. Se añadió CB[8] en incrementos de 30 μL hasta un volumen de 390 μL, y en cada adición de dicho volumen se colectaron los datos en el espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis.

2.7.2.2 Encapsulación Supramolecular del Fotosensibilizador en CB[8]

Para evaluar la encapsulación del dd-TBO⁺ en el CB[8], se preparó una solución de dd-TBO⁺ 2 μM con el CB[7] a 50 μM hasta un volumen de 3 mL utilizando solución amortiguadora de fosfato 10 mM con pH 7. Adicionalmente se preparó una solución que no contiene el CB[8]

hasta un volumen final de 3 mL. A cada una de estas muestras preparadas se le hace un barrido en el espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis en un rango de 200 nm a 850 nm.

2.7.2.3 Determinación de la Formación del Complejo de Inclusión con el Fotosensibilizador

Para evaluar la formación del complejo se leyó el dd-TBO⁺ en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7.0, antes y después de añadirle el CB[8], en el espectrómetro UV-Vis haciendo un barrido de 200 nm a 850 nm. De igual manera se colectó el espectro de fluorescencia, excitando las muestras al máximo de absorción para las moléculas solas y en un punto donde no cambia la absorbancia cuando se forma el complejo con el CB[8], en un fluorímetro Fluoromax[®]-4 de HORIBA. Adicionalmente, se inyectó por infusión directa en el espectrómetro de masas la molécula sola y encapsulada en agua grado masas y se tomó el espectro de masas de 200 a 1500 m/z con las condiciones descritas en la sección **2.4 Espectrometría de masas**.

2.8 Determinación del Oxígeno Singulete

El oxígeno singulete se determinó de manera indirecta siguiendo la disminución del espectro de fluorescencia del ABMA cuya concentración fue de 1.6 µM. Se utilizó un iluminador LED de Luzchem y se irradió el dd-TBO⁺, cuya concentración fue de 4 µM, a 630 nm con una intensidad del LED de 0.01 y a 20 mm de distancia, cada 3 minutos durante 30 minutos. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

2.9 Degradación de la Superóxido Dismutasa por el Proceso Fotosensibilizado del dd-TBO⁺

Para evaluar la degradación de la enzima Superóxido Dismutasa se preparó una solución madre de SOD de 300 μM . Se hizo una mezcla de la enzima con el dd-TBO⁺ en solución amortiguadora de fosfato 10 mM a pH 7, variando la concentración de la enzima (25 μM , 10 μM , 2.5 μM y 0.5 μM) y manteniendo constante la concentración del derivado doblemente desmetilado (2.5 μM) para las 3 primeras concentraciones de SOD, y utilizando 6 μM del derivado doblemente desmetilado para la última concentración de SOD. Se realizó un gel de poliacrilamida para evaluar por separado cada una de las muestras preparadas de SOD a concentraciones diferentes.

2.9.1 Electroforesis de la Superóxido Dismutasa.

Para evaluar el efecto de la luz blanca sobre la SOD se preparó un gel de poliacrilamida al 8%, con los siguientes componentes: 1.5 mL de Lower Buffer, 1.6 mL de solución de acrilamida, 3.18 mL de agua desionizada, 5 μL de TEMED y 20 μL de persulfato de amonio al 10%. Para evaluar el efecto del dd-TBO⁺ sobre la SOD se preparó un gel de poliacrilamida al 12% con los siguientes componentes: 1.5 mL de Lower Buffer, 2.4 mL de solución de acrilamida, 2.09 mL de agua desionizada, 5 μL de TEMED y 30 μL de persulfato de amonio al 10%. Para cada muestra preparada a distintas concentraciones se utilizó 7 μL para colocarlas en los pocillos de cada gel. La electroforesis se realizó en una cámara Mini-Protean II de Bio-Rad (Richmond, CA, USA) aplicando 50 V por 30 min y luego 100 V por 1 h. Al finalizar la corrida, los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie R-250 y posteriormente se decoloraron con una solución decolorante de Coomassie R-250.

Capítulo III. Resultados y Discusión

3.1 Purificación del Azul de Toluidina

Primeramente, se tomó 1 mg de TBO⁺ y se disolvió en tres solventes diferentes: metanol, agua y acetonitrilo con el fin de ver el comportamiento solvatocrómico en los distintos solventes.

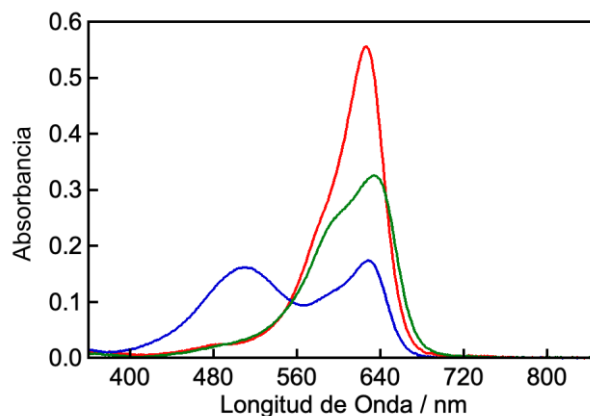


Figura 6. Espectro de absorción UV-Vis del Azul de Toluidina obtenido de sigma sin purificar en distintos solventes. La línea roja es el TBO⁺ en metanol, la línea verde es el TBO⁺ en agua y la línea azul es el TBO⁺ en acetonitrilo.

En la **Figura 6** se puede observar que en metanol tiene un máximo de absorción a 629 nm y se ve una sola señal, mientras que en agua se observa un máximo de absorción a 636 nm y se puede observar que en acetonitrilo hay 2 señales con máximos a 519 nm y 630 nm, tal como se muestra en la **Tabla 1**. Estas diferencias de los espectros de absorción son debidas a que el TBO⁺ es soluble en metanol y agua dependiendo de la concentración (aproximadamente 1 mg/mL), pero en acetonitrilo a esta misma concentración logramos ver las impurezas que contiene la muestra obtenida de sigma con una pureza del 80%.

La polaridad de los solventes utilizados es la siguiente: Agua > Acetonitrilo > Metanol (*Los Eluyentes en HPLC – cromlab-instruments.es*, s.f.). Esto explica las diferencias en el desplazamiento del máximo de absorción, del agua y acetonitrilo con respecto al metanol, hacia

el rojo del espectro visible. Este desplazamiento se conoce como efecto batocrómico, el mismo se debe a la polaridad del solvente, mientras más polar sea, el máximo de absorción se desplazará más hacia el rojo del espectro visible.

Tabla 1. Máximos de absorción del TBO⁺ en diferentes solventes para la evaluación del efecto solvatocrómico.

Solvente	Máximo de absorción
Agua	636 nm
Acetonitrilo	519 y 630 nm
Metanol	629 nm

Una vez visto el espectro del TBO⁺ por espectroscopía UV-Vis, se filtró utilizando un filtro de 0.22 μm e inyectó por infusión directa en el espectrómetro de masas aquella muestra disuelta en acetonitrilo. Como se puede ver en la **Figura 7**, la muestra contiene la especie mono desmetilada del Azul de Toluidina, d-TBO⁺, un derivado Sulfóxido del TBO⁺, y el derivado doblemente desmetilado, dd-TBO⁺, los cuales son los productos de la fotodegradación de TBO⁺.

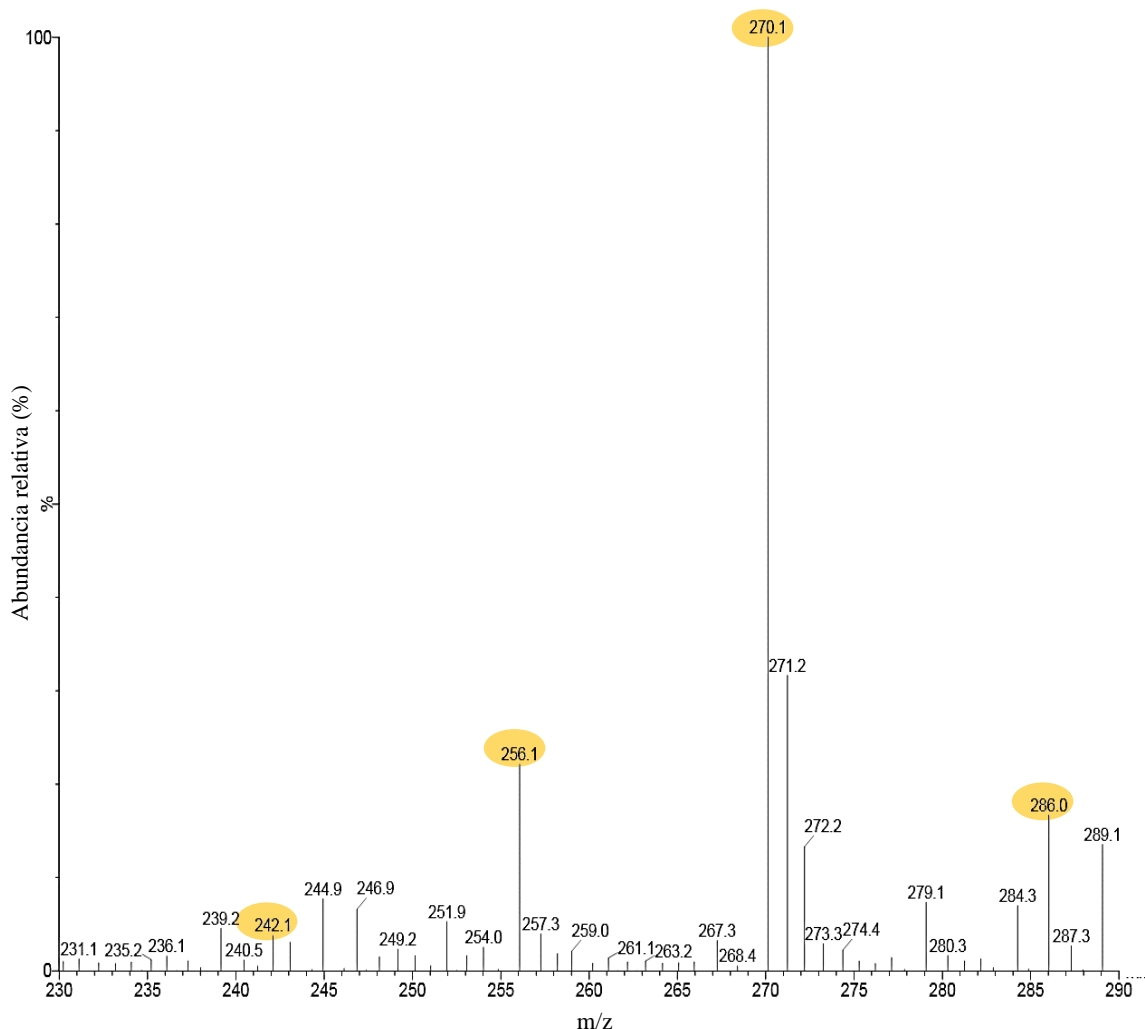


Figura 7. Espectro de masas del Azul de Toluidina obtenido de Sigma sin purificar en acetonitrilo.

Las intensidades relativas de estas señales se encuentran tabuladas en la **Tabla 2**, estas intensidades, aunque no sean un dato cuantitativo, sugieren que la molécula madre no está completamente pura. Debido a estas impurezas se realizaron una serie de seis purificaciones para obtener el compuesto puro y utilizarlo para la síntesis del derivado doblemente desmetilado del Azul de Toluidina, dd-TBO⁺.

La purificación del TBO⁺ se realizó en una columna abierta de vidrio. Se utilizó sílica gel como fase estacionaria, y como eluyente una mezcla de etanol y ácido clorhídrico (99:1) de 500 mL.

La columna fue empacada en húmedo. Se utilizaron 5 mg de TBO⁺ disueltos en 5 mL de la fase móvil.

De la purificación se obtuvieron 7 fracciones: fracción 1, fracción 2, fracción 3, fracción 4.1, fracción 4.2, fracción 4.3 y fracción 5. A cada fracción se le eliminó el solvente utilizando un rotaevaporador, con las condiciones descritas en la sección **2.4 Espectrometría de Masas**.

Posteriormente se redisolviéron las fracciones añadiéndole 1 mL de acetonitrilo y se sonicaron para una mejor dilución. Cada una de las fracciones recuperadas fue filtrada usando un filtro de 0.22 µm e inyectada por infusión directa en el espectrómetro de masas con las condiciones anteriormente descritas en la sección **2.4 Espectrometría de Masas**. La fracción 4.3 corresponde a la molécula madre pura, como se observa en la **Figura 8**, en donde se ve una diferencia notable con respecto a las abundancias relativas de las señales de los derivados. En la **Tabla 2** se puede ver como disminuyen las abundancias relativas de las especies desmetiladas del TBO⁺ y del TBO⁺ Sulfóxido luego de haber realizado la purificación. Sin embargo, estas señales siguen apareciendo debido a que la molécula se puede degradar con el tiempo, en acetonitrilo y por la acción de la luz ambiente .

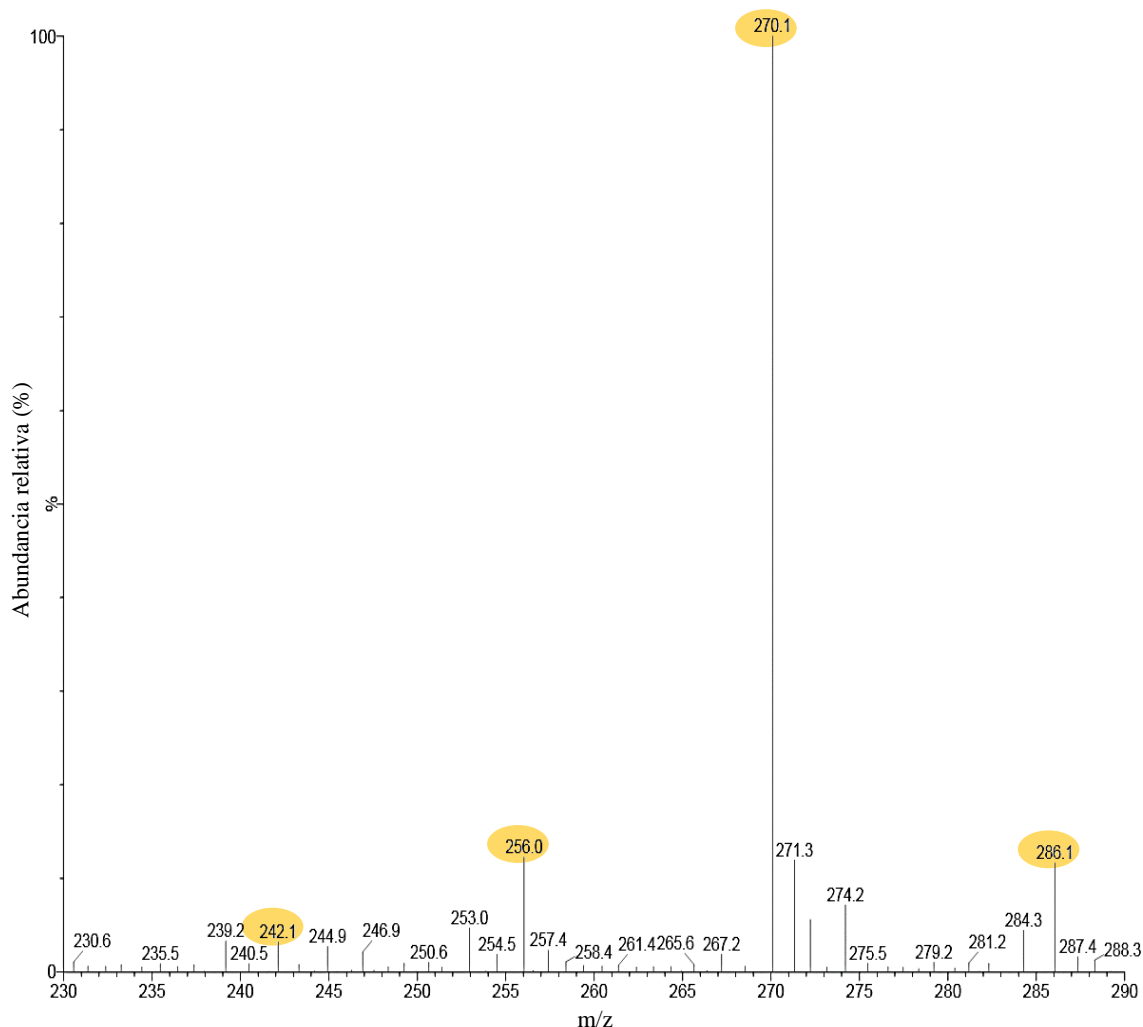


Figura 8. Espectro de masas del Azul de Toluidina purificado, en acetonitrilo.

Tabla 2. Masas y abundancia de señales relativas del Azul de Toluidina antes y después de ser purificado.

Condiciones	Ion	m/z	Abundancia de señal relativa (%)
Azul de Toluidina antes de ser purificado	dd-TBO ⁺	242.1	4.91
	d- TBO ⁺	256.1	22.03
	TBO ⁺	270.1	100.00
	TBO ⁺ Sulfóxido	286.0	17.23
Azul de Toluidina purificado	dd-TBO ⁺	242.1	2.16
	d- TBO ⁺	256.0	2.31
	TBO ⁺	270.1	100.00
	TBO ⁺ Sulfóxido	286.1	8.63

Leyenda de las masas: Azul de Toluidina (TBO⁺) = 270.1; mono desmetilado (d-TBO⁺) = 256.1; doblemente desmetilado (dd-TBO⁺) = 242.1.

Una vez se obtuvo el TBO⁺ puro se procedió a leer nuevamente su espectro de absorción en acetonitrilo. Como se puede observar en la **Figura 9**, aquella señal que aparecía en 519 nm en la **Figura 6** ya no aparece debido a la purificación.

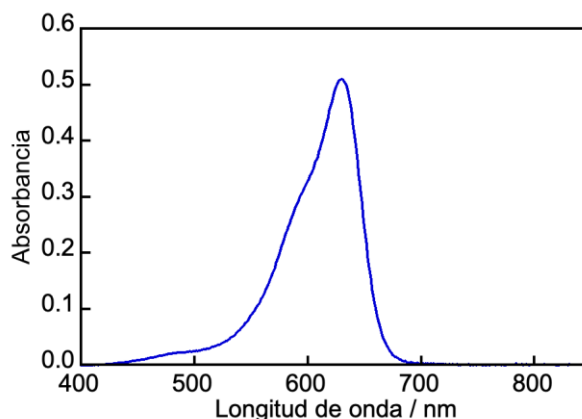


Figura 9. Espectro de absorción UV-Vis del TBO⁺ purificado, en acetonitrilo.

3.2 Síntesis y Purificación del Fotosensibilizador

Una vez obtenido el TBO⁺ puro se procedió a preparar muestras en acetonitrilo a una concentración de aproximadamente 12.5 μ M utilizando el coeficiente de absorción molar para ajustar la absorbancia a 0.5 en 626 nm, el cual es el máximo de absorción como se puede observar en la **Figura 9**. Se realizó un barrido de 200 nm a 850 nm en el espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis, en donde el máximo de absorción resultante para la muestra purificada fue de 629 nm antes de ser irradiada, como se puede observar en la **Figura 10** y **Figura 11**. Se preparó una muestra de control de TBO⁺, la misma se guardó en oscuridad durante el tiempo de irradiación de las demás muestras, con el fin de conocer cómo estaba la muestra inicialmente y comparar la generación de los derivados de Azul de Toluidina. Seguidamente se prepararon las muestras para irradiación (a tiempos de 1, 2, 3 y 5 horas) en un fotorreactor hecho a la medida,

con una lámpara de diodo emisor de luz (LED) blanca de 150 mm × 27.2 mm × 150 mm y 30 W. La temperatura de calor fue de 6500 K y 2100 lúmenes (Lm). Las muestras se irradiaron con una iluminancia de aproximadamente 32369 lux, la cual se midió con un registrador de datos HOBO ($1 \text{ lx} = 1 \text{ lm/m}^2 = 1 \text{ cd-sr/m}$). Con ello se determinaron las condiciones óptimas para generar la mayor cantidad del derivado doblemente desmetilado.

Se midió el espectro de absorción cada 5 minutos durante la primera hora de irradiación, y cada 10 minutos durante la segunda, tercera y quinta hora. Con esto se observa un fotoblanqueo de la muestra, el cual es la disminución de la absorbancia (eje Y) de la muestra antes de ser irradiada (línea roja) a lo largo de la irradiación como se muestra en la **Figura 11**. Adicionalmente, hay un desplazamiento del máximo de absorción de 629 nm hacia 610 nm, longitud de absorción máxima del derivado mono desmetilado (d-TBO⁺) al cabo de 2 horas. Luego de haber transcurrido tres horas de irradiación, hay un desplazamiento de 610 nm a 595 nm, la cual corresponde a la longitud máxima de absorción del derivado doblemente desmetilado (dd-TBO⁺) como fue descrito por Robinson-Duggon *et al.* en 2019, esto se observa en la **Figura 11**.

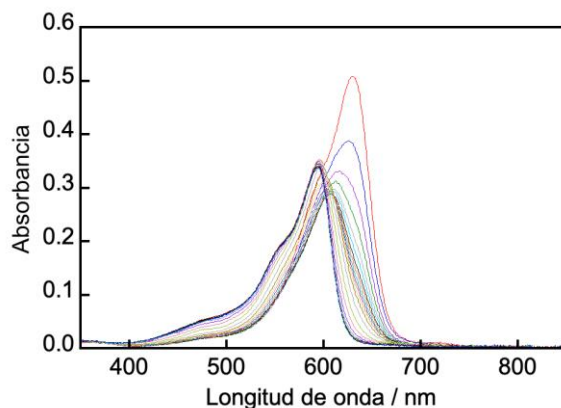


Figura 10. Espectro de absorción UV-Vis del TBO⁺ en acetnitrilo irradiado durante 3 horas. La línea roja muestra el máximo de absorción en 629 nm del TBO⁺ puro antes de la irradiación.

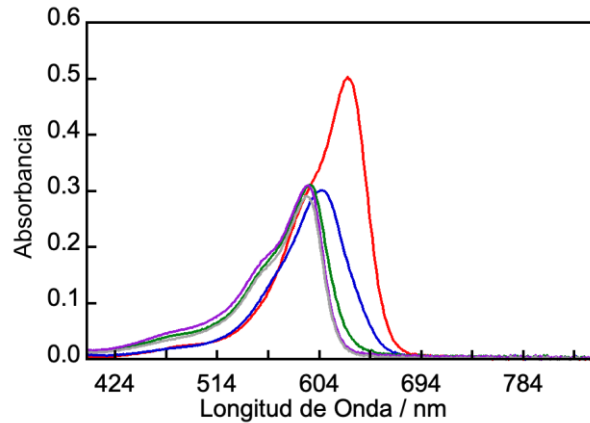


Figura 11. Espectro de absorbancia UV-Vis de la degradación del Azul de Toluidina por 3 horas. La línea roja muestra el tiempo 0; la azul 1 hora; la verde 2 horas; la morada 3 horas; y la gris 5 horas.

La cinética de degradación del TBO^+ se obtuvo graficando la absorbancia a 595 nm, 610 nm y 650 nm, correspondientes a la especie doblemente desmetilada, mono desmetilada y el TBO^+ a una longitud de onda donde los derivados de este no absorben, así como se observa en la **Figura 12**. En la misma se puede ver que durante una hora de irradiación el TBO^+ empieza a demetilarse, a su vez la absorbancia a 650 disminuye. Por otra parte, la especie mono desmetilada se mantiene constante y la especie doblemente desmetilada comienza a formarse, esto se ve en las absorbancias de 610 nm y 595 nm respectivamente. Después de la primera hora se puede observar que el TBO^+ (650 nm) se mantiene constante, la disminución de la absorbancia de la especie mono desmetilada (610 nm) y la generación de la especie doblemente desmetilada (595 nm) se mantiene en el tiempo. Esto indica que la especie mono desmetilada se está desmetilando para la formación del derivado doblemente desmetilado.

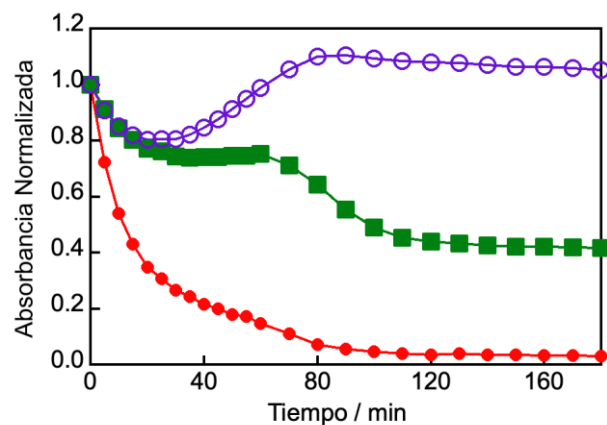


Figura 12. Cinética de fotodegradación del Azul de Toluidina para la síntesis del dd-TBO⁺ irradiado por 3 horas con luz visible en acetonitrilo. Los círculos morados representan la generación del dd-TBO⁺ a 594 nm, los círculos verdes la generación del derivado mono desmetilado d-TBO⁺ a 609 nm y, los círculos rojos la fotodegradación del TBO⁺ medido a 650 nm.

Tanto las muestras de irradiación como la de control en oscuro se analizaron mediante espectrometría de masas con las condiciones descritas en la sección **2.4 Espectrometría de Masas**. En el espectro de masas del control en oscuro, **Figura 13**, se puede observar el ion molecular de 270.1 m/z con una intensidad de señal relativa del 100 % correspondiente a la molécula madre de TBO⁺. También está presente en pequeñas cantidades la señal de 256.0 m/z del derivado mono desmetilado de TBO⁺ (d-TBO⁺) y, el pico de 242.1 m/z del derivado doblemente desmetilado, dd-TBO⁺, ambos productos de la fotodegradación de la molécula madre (ver **Tabla 2**).

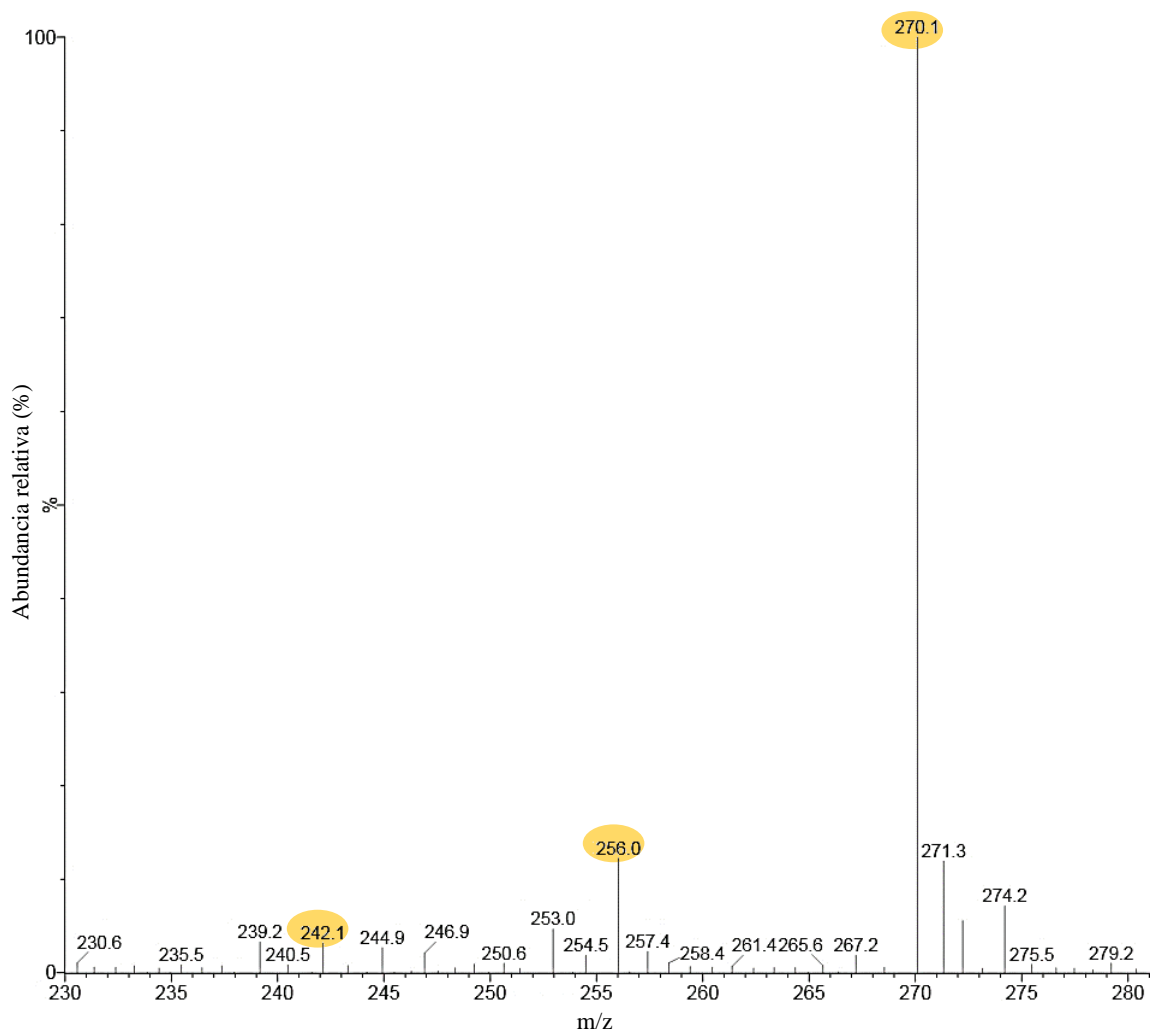


Figura 13. Espectro de masas del Azul de Toluidina en acetonitrilo en oscuro sin irradiar durante el transcurso del experimento como control.

Tras una hora de irradiación hay una aparición de las especies desmetilada y doblemente desmetilada como fotoproductos de la degradación de TBO^+ , tal aparición se puede observar en la **Figura 14**, en donde el ion molecular 270.1 m/z, correspondiente a la molécula de TBO^+ sigue siendo el ion molecular con una intensidad de señal relativa del 100%; y, los derivados mono desmetilado y doblemente desmetilado, 256.0 m/z y 242.1 m/z respectivamente tienen abundancia de señal relativas más altas que en la **Figura 13**, como se muestra en la **Tabla 3**.

Esto quiere decir que al cabo de una hora la molécula madre se está fotodegradando y comienzan a formarse las especies desmetiladas.

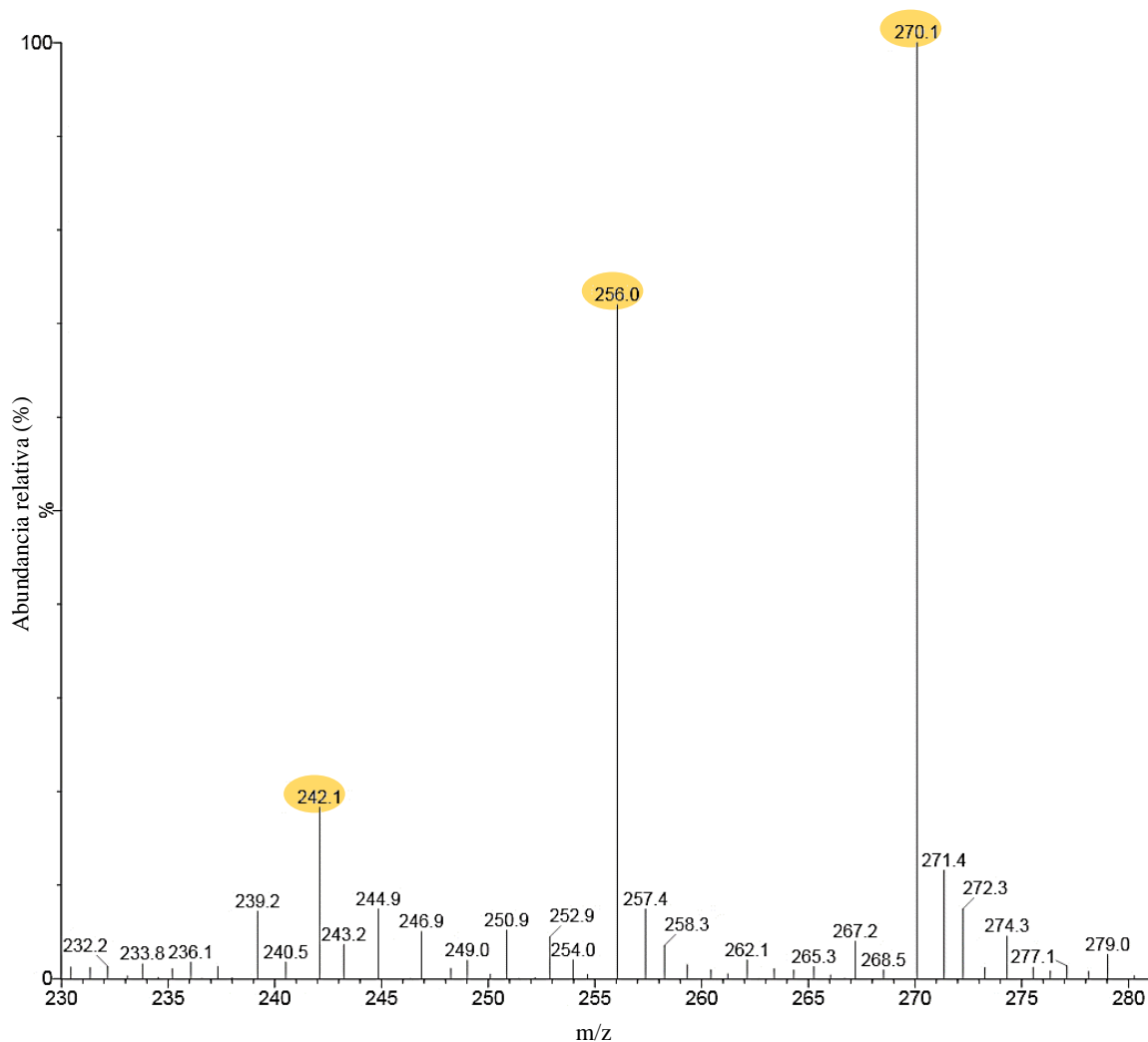


Figura 14. Espectro de masas del Azul de Toluidina en acetonitrilo tras una hora de irradiación.

Al cabo de dos horas de irradiación se observa, en la **Figura 15**, un incremento en las intensidades relativas de 256.0 m/z, correspondiente al derivado mono desmetilado, y 242.1 m/z del derivado doblemente desmetilado. A su vez, la intensidad relativa de 270.1 m/z del TBO⁺ disminuye, esto sugiere que el Azul de Toluidina continua desmetilandose y que sus derivados

continúan formándose, siendo el mono desmetilado el fotoproducto mayoritario durante este periodo de irradiación.

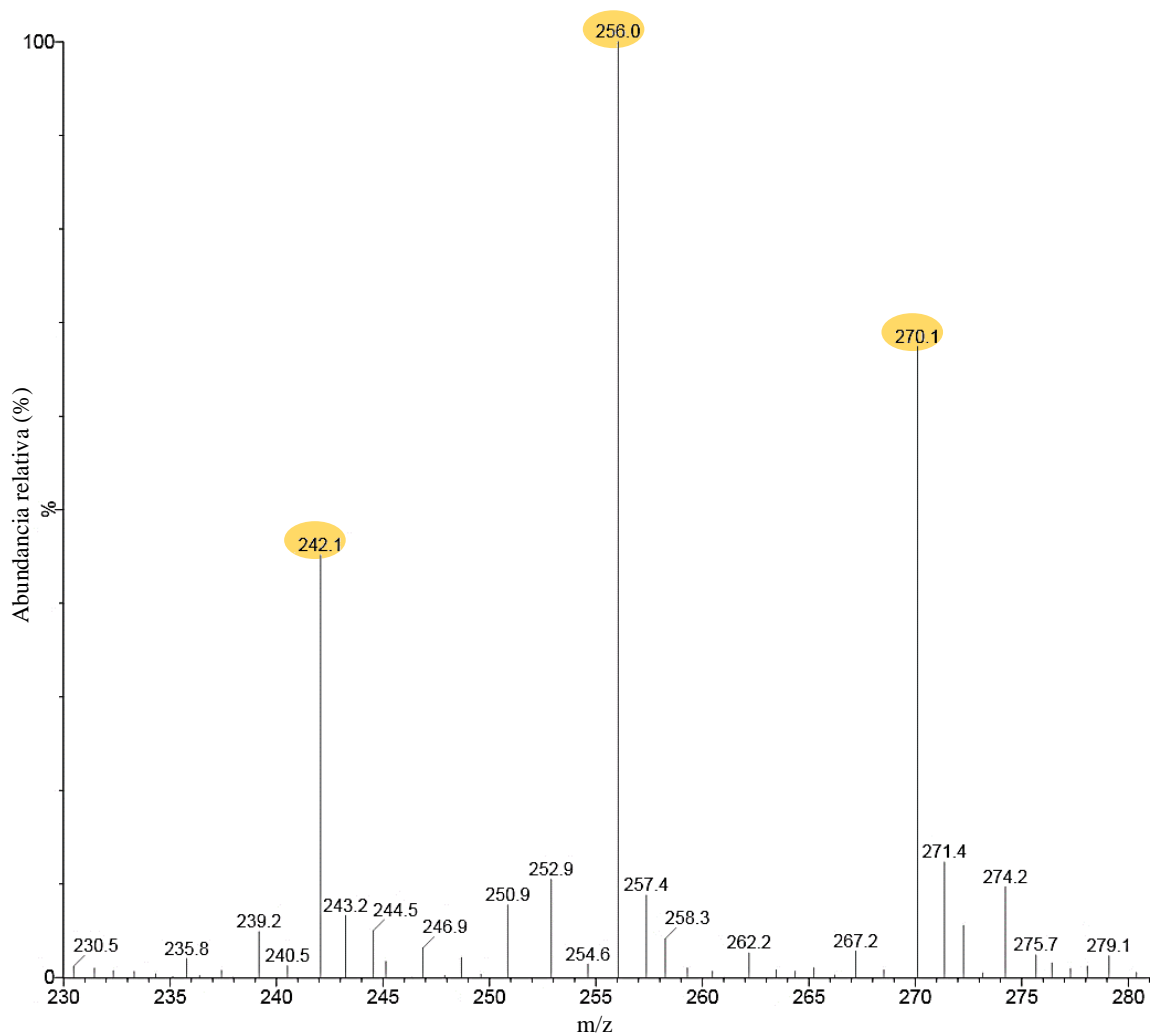


Figura 15. Espectro de masas del Azul de Toluidina en acetonitrilo tras dos horas de irradiación. Estructura del d-TBO⁺.

Luego de haber transcurrido tres horas de irradiación se observa un aumento en la abundancia de la señal del derivado doblemente desmetilado, 242.0 m/z junto con una disminución en las abundancias de las señales del derivado mono desmetilado y del Azul de Toluidina 255.9 m/z y

270.1 m/z, respectivamente, como se muestra en la **Figura 16**. Esto sugiere que ambas especies, TBO⁺ y d-TBO⁺, se están desmetilando y con ello se produce el dd-TBO⁺ las señales entre 274 y 285 m/z corresponden al blanco utilizado. Estas intensidades de las señales que se muestran en los espectros de masas de 1 a 3 horas y, en oscuro, se encuentran tabuladas en la **Tabla 3**.

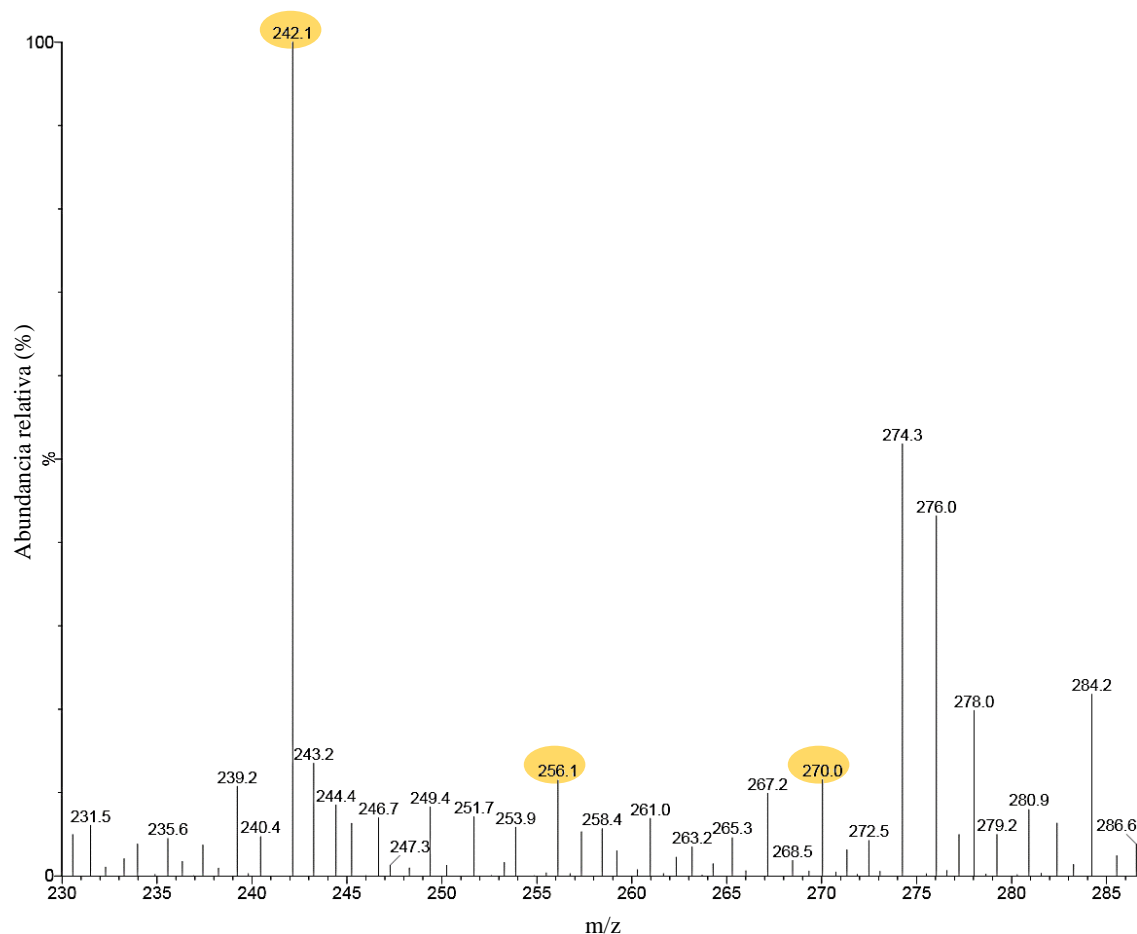


Figura 16. Espectro de masas del Azul de Toluidina en acetonitrilo tras tres horas de irradiación. Estructura del dd-TBO⁺.

Tabla 3. Intensidad de abundancias relativas de las señales del TBO⁺ y sus derivados en acetonitrilo a tiempo 0, 1, 2 y 3 h.

Condiciones	Ion	m/z	Abundancia de señal relativa (%)
Azul de Toluidina en acetonitrilo en oscuridad	dd-TBO ⁺	242.1	3.19
	d- TBO ⁺	256.0	12.23
	TBO ⁺	270.1	100.00
	TBO ⁺ Sulfóxido	286.1	11.61
Azul de Toluidina luego de una hora de irradiación	dd-TBO ⁺	242.1	18.29
	d- TBO ⁺	256.0	71.99
	TBO ⁺	270.1	100.00
	TBO ⁺ Sulfóxido	286.1	9.84
Azul de Toluidina luego de dos horas de irradiación	dd-TBO ⁺	242.1	45.13
	d- TBO ⁺	256.0	100.00
	TBO ⁺	270.1	67.46
	TBO ⁺ Sulfóxido	286.1	6.32
Azul de Toluidina luego de tres horas de irradiación	dd-TBO ⁺	242.0	100.00
	d- TBO ⁺	256.1	10.01
	TBO ⁺	270.0	11.32
	TBO ⁺ Sulfóxido	286.6	1.38

Finalmente, al cabo de 5 horas se puede observar en la **Figura 17**, la aparición de otras señales de masas como productos de la fotodegradación del TBO⁺. Esta formación puede deberse a la exposición de manera prolongada de la luz policromática sobre el TBO⁺ generado la formación de otros fotoproductos no deseados dentro de esta investigación.

Una vez obtenido los espectros de masas de cada muestra irradiada a tiempos diferentes, se opta por seguir irradiando a tiempo de 3 horas, ya que es la condición óptima de irradiación para que el dd-TBO⁺ sea el producto mayoritario.

Se irradió TBO⁺ hasta obtener aproximadamente 500 mL. Se procedió a eliminar el solvente, acetonitrilo, haciendo uso del rotaevaporador con las condiciones descritas en la **2.4 Espectrometría de Masas**. Posteriormente, se redisolvió el dd-TBO⁺ en 1 mL el eluyente

etanol:ácido clorhídrico (99:1). El dd-TBO⁺ redissuelto se colocó en un vial ámbar para su posterior purificación.

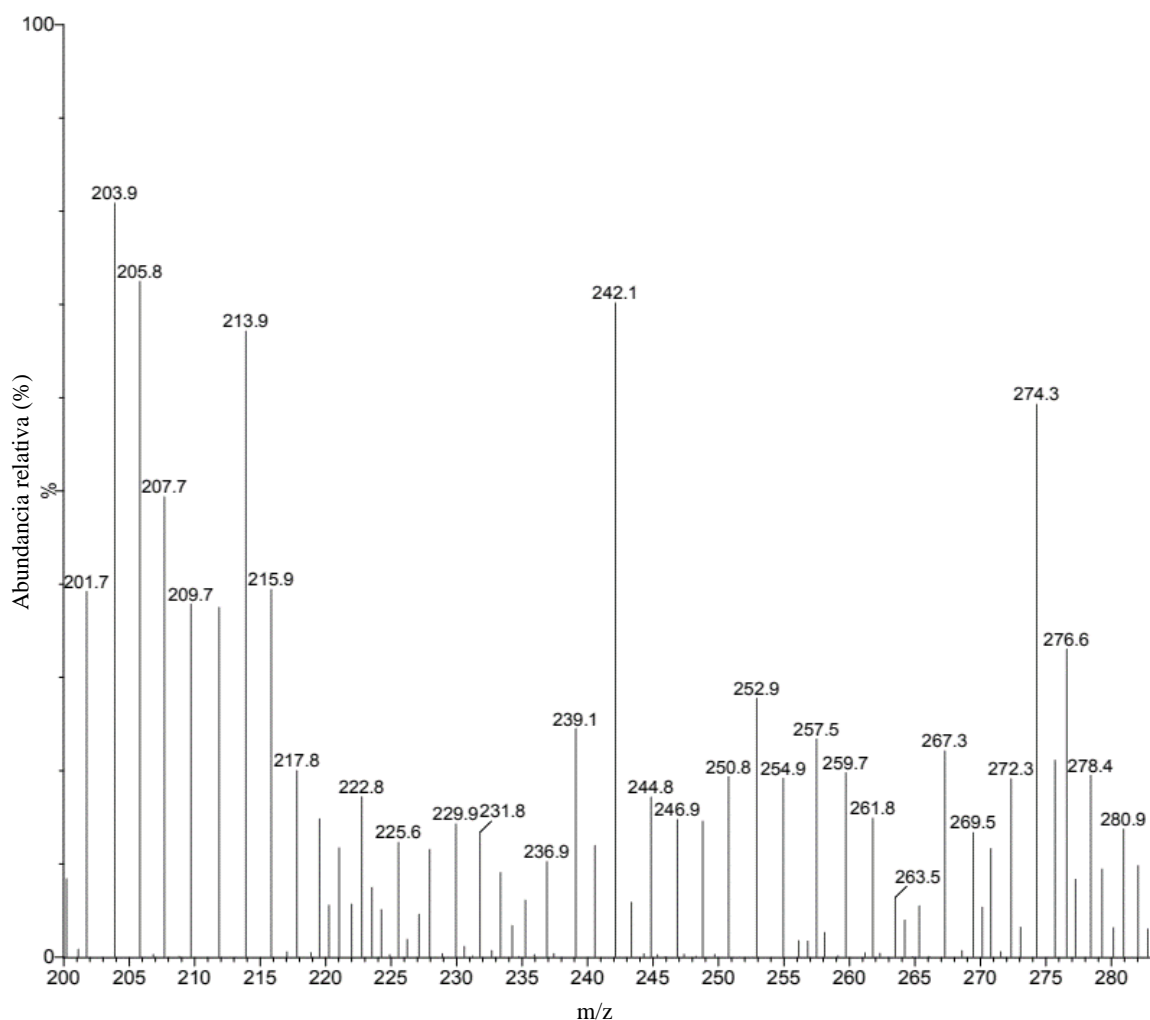


Figura 17. Espectro de masas del Azul de Toluidina irradiado 5 horas en acetonitrilo.

El dd-TBO⁺ se purificó mediante cromatografía de capa fina. Para esto se sembró 1 mL del dd-TBO⁺ guardado en un vial ámbar con el eluyente. La cámara para realizar la TLC se cubrió completamente con papel de aluminio para evitar la incidencia de la luz, y se dejó correr por 3 horas. Una vez culminado el tiempo de corrida de la TLC la placa de sílica se sacó de la cámara y se dejó secar, como se observa en la **Figura 18**. Posteriormente se raspó la franja lila, se adicionó acetonitrilo para redissolver la muestra, y se filtró haciendo uso de un filtro de 0.22 μm

para recuperar el dd-TBO⁺.

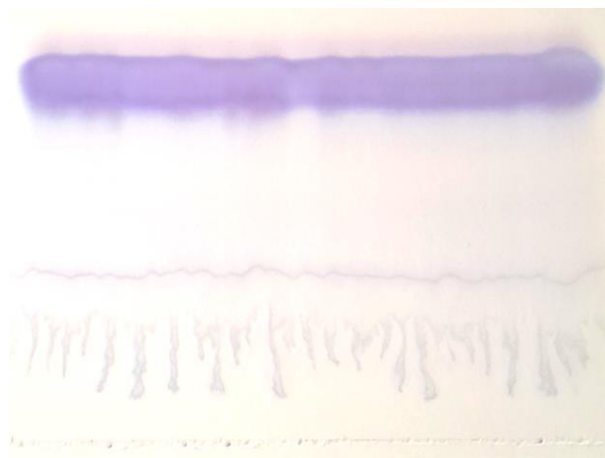


Figura 18. Cromatografía de capa fina del derivado doblemente desmetilado.

Una vez se obtuvo el filtrado se volvió a filtrar utilizando el filtro de 0.22 μm , y 1 ml del filtrado se inyectó por infusión directa en el espectrómetro de masas siguiendo las condiciones descritas en la sección **2.4 Espectrometría de masas**, el resto del filtrado se secó con nitrógeno y se guardó en un vial ámbar en refrigeración hasta su uso.

El dd-TBO⁺ puro se puede observar en la **Figura 19**, donde el ion molecular es 242.0 m/z con una abundancia de la señal relativa de 100 %. También se observa que el resto de las señales presentes se encuentran por debajo del 20 % en abundancia relativa, entre ellas, las señales de la molécula madre y el derivado mono desmetilado. Esto es debido a que el rf es pequeño y por lo tanto hay presencia de estas especies aún.

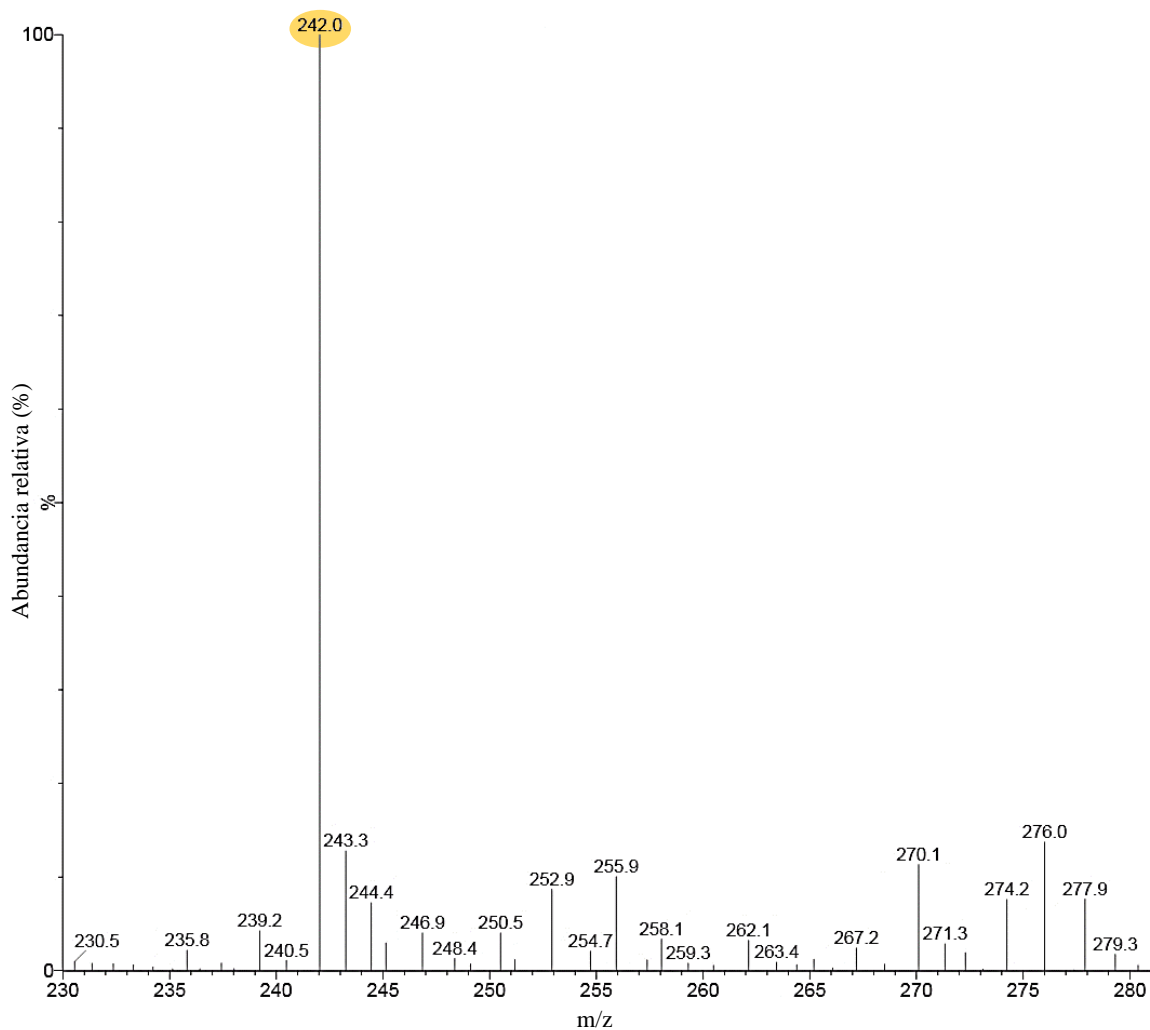


Figura 19. Espectro de masas del derivado doblemente desmetilado (dd-TBO⁺) en acetonitrilo purificado por cromatografía en capa fina.

Luego de haber realizado la purificación del derivado de Azul de Toluidina, dd-TBO⁺, este se diluyó en varios solventes: acetonitrilo, metanol, agua grado masas y solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7. En la **Tabla 4** están descritos los distintos máximos de absorción de cada solvente y en la **Figura 20** se observa el efecto bato e hipocrómico de los distintos solventes respecto al acetonitrilo.

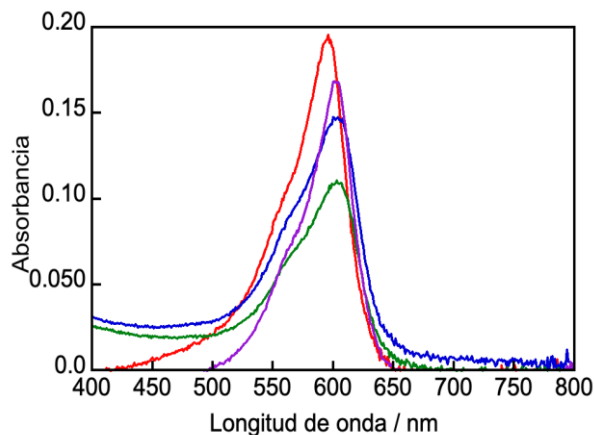


Figura 20. Espectro de absorción del dd-TBO⁺ en diferentes solventes. La línea roja es en acetónitrilo, la línea morada en metanol, la línea azul en agua grado masas, la línea verde en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7.

Tabla 4. Máximos de absorción del dd-TBO⁺ en diferentes solventes para la evaluación del efecto solvatoocrómico.

Solvente	Máximo de absorción
Acetonitrilo	595 nm
Agua	603 nm
Solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7.0	602 nm
Metanol	600 nm

3.3 Espectros de Absorción y de Emisión del Fotosensibilizador y de los Complejos de Inclusión

3.3.1 Complejo de Inclusión con CB[7] y CB[8].

Para evaluar la encapsulación del dd-TBO⁺ en el CB[7] y CB[8] primero se preparó una solución de Cob⁺ para determinar las concentraciones de los macrociclos. En un vial ámbar de 5 mL, con 3 mL de agua grado masas, se diluyeron 2.1 mg de Cob⁺ y se dejó en agitación por 5 minutos para una mejor dilución.

3.3.1.1 Titulación Espectrofotométrica del CB[7]

Se preparó una alícuota de 3 mL de Cob^+ 17.54 μM , ajustada en la longitud de onda máxima (261 nm) a una absorbancia de 0.6. Se añadió en incrementos de 8 μL el CB[7], preparado como esta descrito en la sección 2.5.1 *Preparación del CB[7]*, hasta un volumen de 120 μL , y en cada adición de dicho volumen se colectaron los datos en el espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis de acuerdo con el protocolo previamente descrito por Yi, S., & Kaifer, A. E. 2011 y se puede observar en la **Figura 22**. Utilizando las ecuaciones de la recta se obtuvo el punto de equivalencia y con ello se determinó la concentración del CB[7], la cual resultó ser 1.097 mM, como se observa en la **Figura 21**. Esto fue necesario para determinar la concentración exacta del macrociclo para la posterior preparación de las soluciones de trabajo.

Volumen CB[7] (μL)	A 261 nm	
0	0.60627	
8	0.57693	
16	0.55237	
24	0.52594	
32	0.49894	
40	0.46931	
48	0.44583	
56		0.44443
64		0.44322
72		0.44067
80		0.44191
88		0.44017
96		0.44029
104		0.43923
112		0.43758
120		0.43644

Epsilon Cob^+ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	3.42E+04	Punto de equivalencia (μL)	48.50
Concentración Cob^+ (M)	1.77E-05	Pendiente azul	-0.0033
		Intercepto azul	0.6054
Concentración CB[7]	1.097E-03 M	Pendiente roja	-1.00E-04
		Intercepto roja	0.4502

Figura 21. Determinación de la concentración del CB[7] con Cob^+ en agua grado masas. Los datos de absorbancia se colectaron a 621 nm, longitud de onda máxima del Cob^+ .

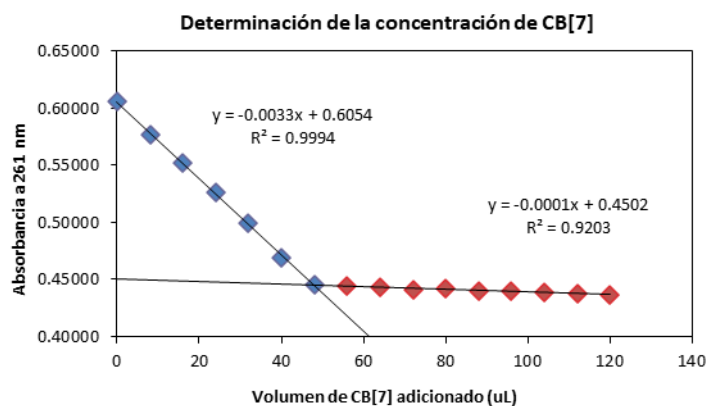


Figura 22. Titulación espectrofotométrica del CB[7] con Cob²⁺ en agua grado masas.

3.3.1.2 Titulación Espectrofotométrica del CB[8]

Se preparó una alícuota de 3 mL de Cob²⁺ 4.39 µM, la cual fue ajustada en la longitud de onda máxima (261 nm) a una absorbancia de 0.15. Se añadió CB[8], preparado como se indica en la sección 2.5.2 *Preparación del CB[8]*, en incrementos de 30 µL hasta un volumen de 390 µL, y en cada adición de dicho volumen se colectaron los datos en el espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis, de acuerdo con el protocolo previamente descrito por Yi, S., & Kaifer, A. E. 2011, y se puede observar en la **Figura 24**. Utilizando las ecuaciones de la recta de la absorbancia corregida, se obtuvo el punto de equivalencia y con ello se determinó la concentración del CB[8], la cual resultó ser 0.111 mM, como se observa en la **Figura 23**. Esto fue necesario para determinar la concentración exacta del macrociclo para la posterior preparación de las soluciones de trabajo.

V CB[8] (μL)	A 261 nm	A 261 nm (corregida)	
0	0.15028	0.15028	
30	0.14083	0.14224	
60	0.12930	0.13189	
90	0.11907	0.12264	
120	0.11058	0.11500	
150		0.10916	0.11462
180		0.10872	0.11524
210		0.10732	0.11483
240		0.10702	0.11558
270		0.10634	0.11591
300		0.10528	0.11581
330		0.10463	0.11614
360		0.10292	0.11527
390		0.10214	0.11542

Epsilon Cob ⁺ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	3.42E+04	Punto de eq. (μL)	118.48
Concentración Cob ⁺ (M)	4.394E-06	Pendiente azul	-0.0003
		Intercepto azul	0.1504
Concentración CB[8]	1.11E-04 M	Pendiente roja	3.00E-06
		Intercepto roja	0.1145

Figura 23. Determinación de la concentración del CB[8] con Cob⁺ en agua grado masas. Los datos de absorbancia se colectaron a 621 nm, longitud de onda máxima del Cob⁺.

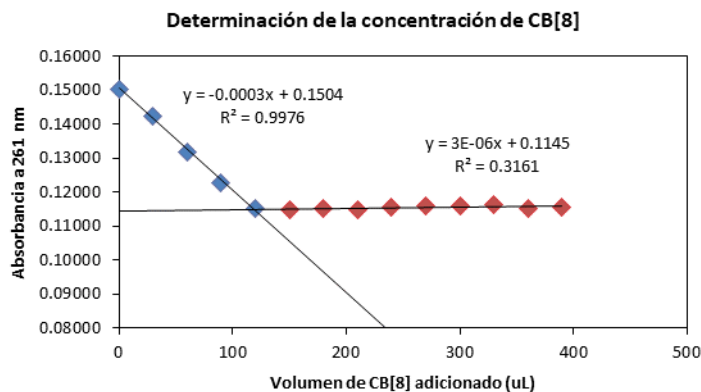


Figura 24. Titulación espectrofotométrica del CB[8] con Cob⁺ en agua grado masas.

3.3.1.3 Encapsulación Supramolecular del Fotosensibilizador en CB[7] y CB[8]

Para evaluar la encapsulación del dd-TBO⁺ en el CB[7] y en el CB[8] se prepararon en dos celdas de cuarzo utilizando solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7 una solución de 3 mL son dd-TBO⁺ con una concentración de 2 μM y, una solución de 3 mL de dd-TBO⁺ 2 μM con el CB[7] a 50 μM, de igual manera se preparan estas mismas condiciones para el CB[8]. A

cada una se le hace un barrido en el espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis en un rango de 200 nm a 850 nm.

En la **Figura 25** se puede observar que el dd-TBO⁺ sin encapsular tiene un máximo de absorción en 602 nm, cuando se colecta el espectro de la muestra preparada con CB[7] se ve un desplazamiento del máximo de absorción hacia 594 nm, lo que evidencia que parte del dd-TBO⁺ está dentro del macrociclo CB[7]. Por otra parte, al colectar los datos de absorbancia de la molécula (dd-TBO⁺) con el CB[8] se ve un desplazamiento mayor del máximo de absorción. Como el macrociclo tiene una mayor cavidad, esto indica que entran dos moléculas de dd-TBO⁺ en vez de una dentro de la cavidad.

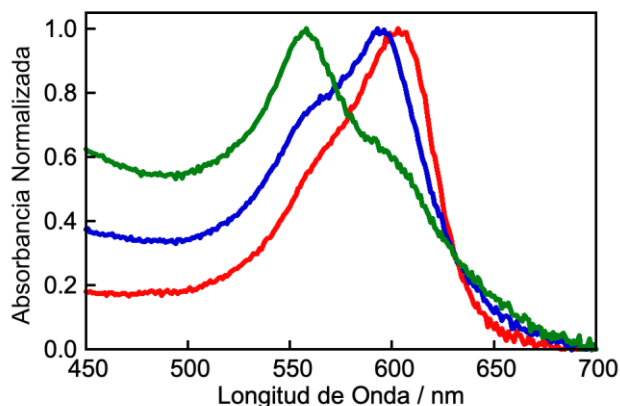


Figura 25. Espectro de absorción de UV-Vis del derivado doblemente desmetilado de Azul de Toluidina y de los complejos de inclusión. La línea roja representa el dd-TBO⁺, la línea azul el complejo de inclusión dd-TBO⁺@CB[7] y la línea verde el complejo de inclusión dd-TBO⁺@CB[8] en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7.0.

Posteriormente estas soluciones fueron leídas en el fluorímetro Fluoromax[®]-4. Las mismas fueron excitadas en el máximo de absorción de cada una, dichos máximos se encuentran descritos en la **Tabla 5**. La **Figura 26** muestra el espectro de emisión del dd-TBO⁺ solo, y de los complejos dd-TBO⁺@CB[7] y dd-TBO⁺@CB[8]. En la misma se puede ver que el complejo

formado con el CB[7] emite mayor fluorescencia que la molécula (dd-TBO⁺) sola, esto se debe al cambio en el ambiente de la molécula al insertarse dentro de la cavidad hidrofóbica del macrociclo y porque la formación del complejo de inclusión con el CB[7] restringe la movilidad de la molécula disminuyendo los decaimientos no radiativos (Ver Diagrama de Jablonski presentado en la **Figura 2**). Por otro lado, el complejo con CB[8] emite una menor fluorescencia, esto es debido a que por el hecho de que dos moléculas entran en la cavidad del macrociclo, cuando estas son excitadas por la proximidad se produce un autoapagamiento y como resultado se emite una menor fluorescencia.

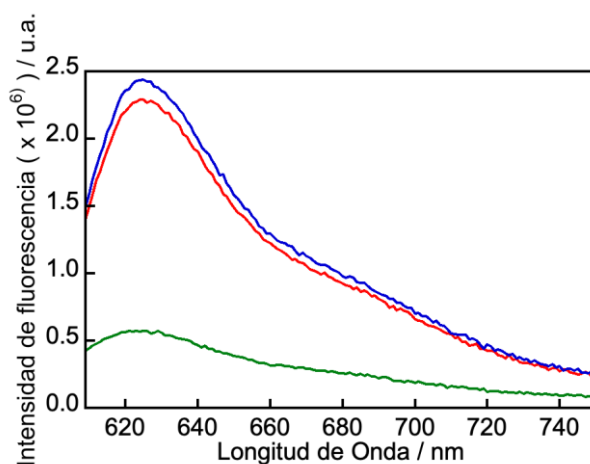


Figura 26. Espectro de emisión de fluorescencia del derivado doblemente desmetilado de Azul de Toluidina y de los complejos de inclusión. La línea roja representa el dd-TBO⁺, la línea azul el complejo de inclusión dd-TBO⁺@CB[7] y la línea verde el complejo de inclusión dd-TBO⁺@CB[8] en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7.0.

Tabla 5. Resumen de los máximos de absorción y de emisión del dd-TBO⁺, de los complejos de inclusión dd-TBO⁺@CB[7] y dd-TBO⁺@CB[8] en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7.0.

Muestra	Máximo de absorción	Máximo de emisión
dd-TBO ⁺	602 nm	625 nm
dd-TBO ⁺ @CB[7]	594 nm	625 nm
dd-TBO ⁺ @CB[8]	558 nm	626 nm

Una vez vista la evidencia por espectroscopía UV-Vis y por emisión de fluorescencia, se prepararon las muestras en las mismas condiciones, pero utilizando Agua, grado masas, como disolvente. Las muestras fueron filtradas haciendo uso de un filtro de 0.22 μm y se inyectaron por infusión directa en el espectrómetro de masas con las condiciones descritas en la sección

2.4 Espectrometría de masas.

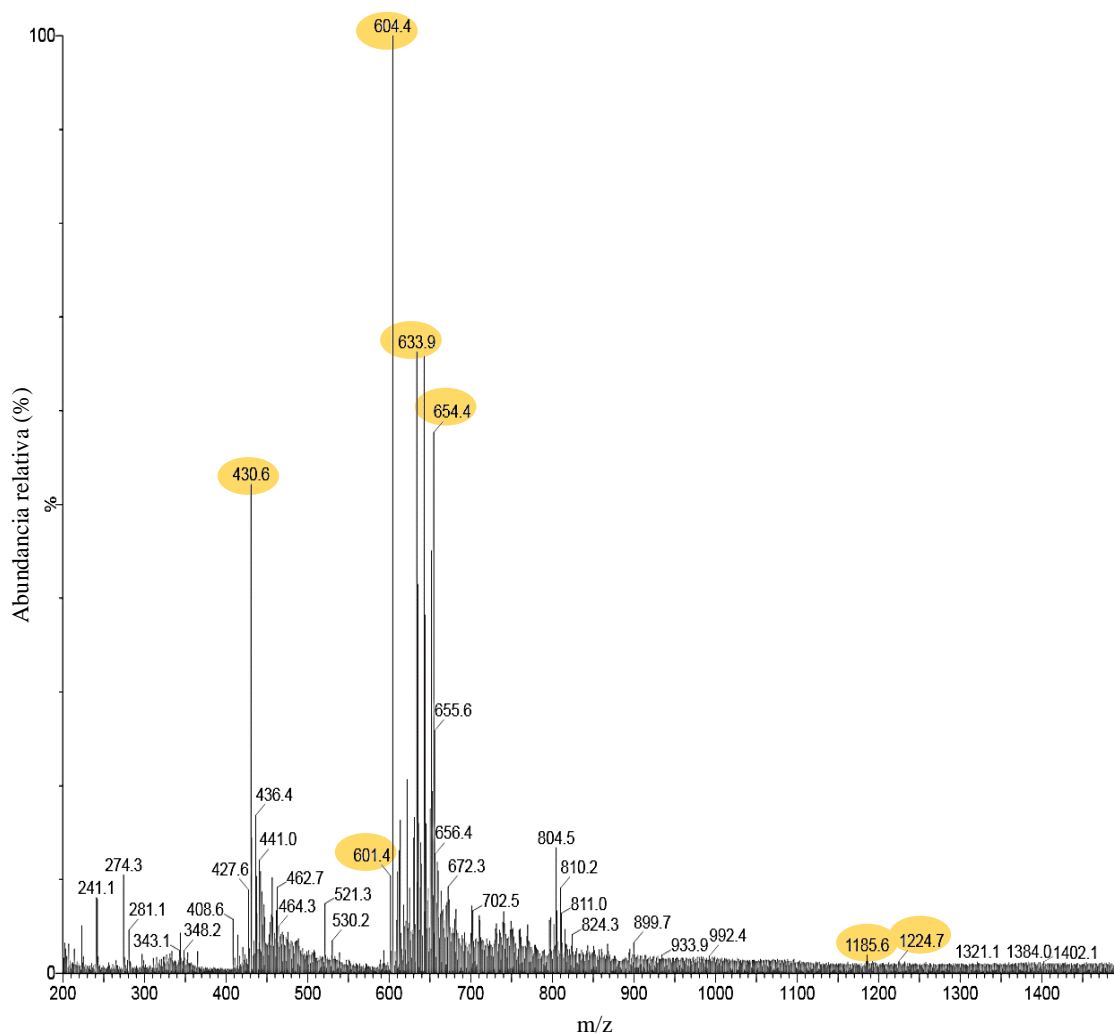


Figura 27. Espectro de masas del cucurbit[7]urilo en agua.

En la **Figura 27** se observa el espectro de masas del macrociclo CB[7] en agua. En el espectro se ve que el ion molecular con la intensidad de la señal relativa más abundante es el 604.4 m/z, el cual corresponde al $[\text{CB7} + 2\text{Na}]^{2+}$ cuando se fragmenta en dos. Otras señales características del macrociclo son: 633.9 m/z, $[\text{CB7} + \text{Na} + 2\text{K} + 4\text{H}]^{7+}$, cuando se fragmenta en dos; 654.4 m/z, $[\text{CB7} + 2\text{Na} + 2\text{K} + 3\text{H} + \text{NH}_4]^{8+}$, cuando se fragmenta en 2; 430.6 m/z, $[\text{CB7} + 2\text{Na} + 2\text{K} + \text{H}]^{5+}$, cuando se fragmenta en tres; 601.4 m/z, $[\text{CB7} + \text{K}]^+$, cuando se fragmenta en dos; 1185.6 m/z, $[\text{CB7} + \text{Na}]^+$; 1224.7 m/z, $[\text{CB7} + \text{Na} + \text{K}]^{2+}$. Estas señales concuerdan con aquellas ya reportadas por Da Silva *et al.*, en el 2011. Por otra parte, en la **Figura 28** se verifica que la

formación del complejo debido a que la señal 721.8 m/z corresponde al $[\text{CB7} + \text{dd-TBO} + \text{K}]^{2+}$ cuando se fragmenta en dos; la señal 741.0 m/z, $[\text{CB7} + \text{dd-TBO} + 2\text{K}]^{3+}$, cuando se fragmenta en dos. Estas señales tienen una abundancia relativa baja debido a la diferencia de concentraciones que se utilizó para el experimento, 50 μM de CB[7] y 2 μM de dd-TBO⁺.

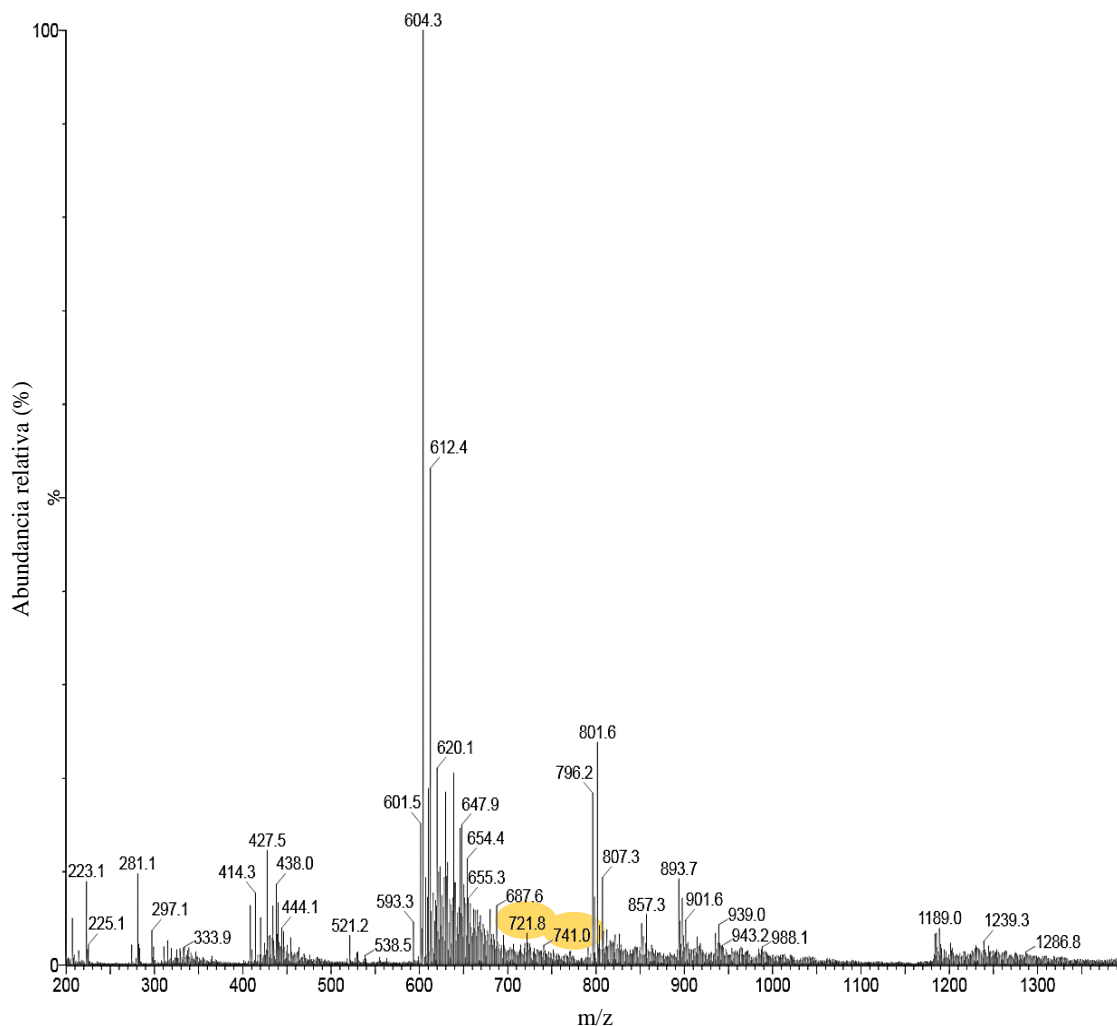


Figura 28. Espectro de masas del derivado dd-TBO⁺ encapsulado en CB[7] (dd-TBO⁺@CB[7]) en agua.

En la **Figura 29** se observa el espectro de masas del macrociclo CB[8] en agua grado masas. En el mismo aparecen señales características de este macrociclo son: 687.4 m/z, $[\text{CB8} + \text{Na}]^+$, cuando se fragmenta en dos; 469.6 m/z, $[\text{CB8} + 2\text{K}]^{2+}$, cuando se fragmenta en tres; 695.4 m/z,

$[\text{CB8} + \text{K} + \text{Na}]^{2+}$, cuando se fragmenta en dos; 703.2 m/z , $[\text{CB8} + 2\text{Na}]^{2+}$, cuando se fragmenta en dos. Como se reportó anteriormente por Da Silva *et al.*, en el 2011.

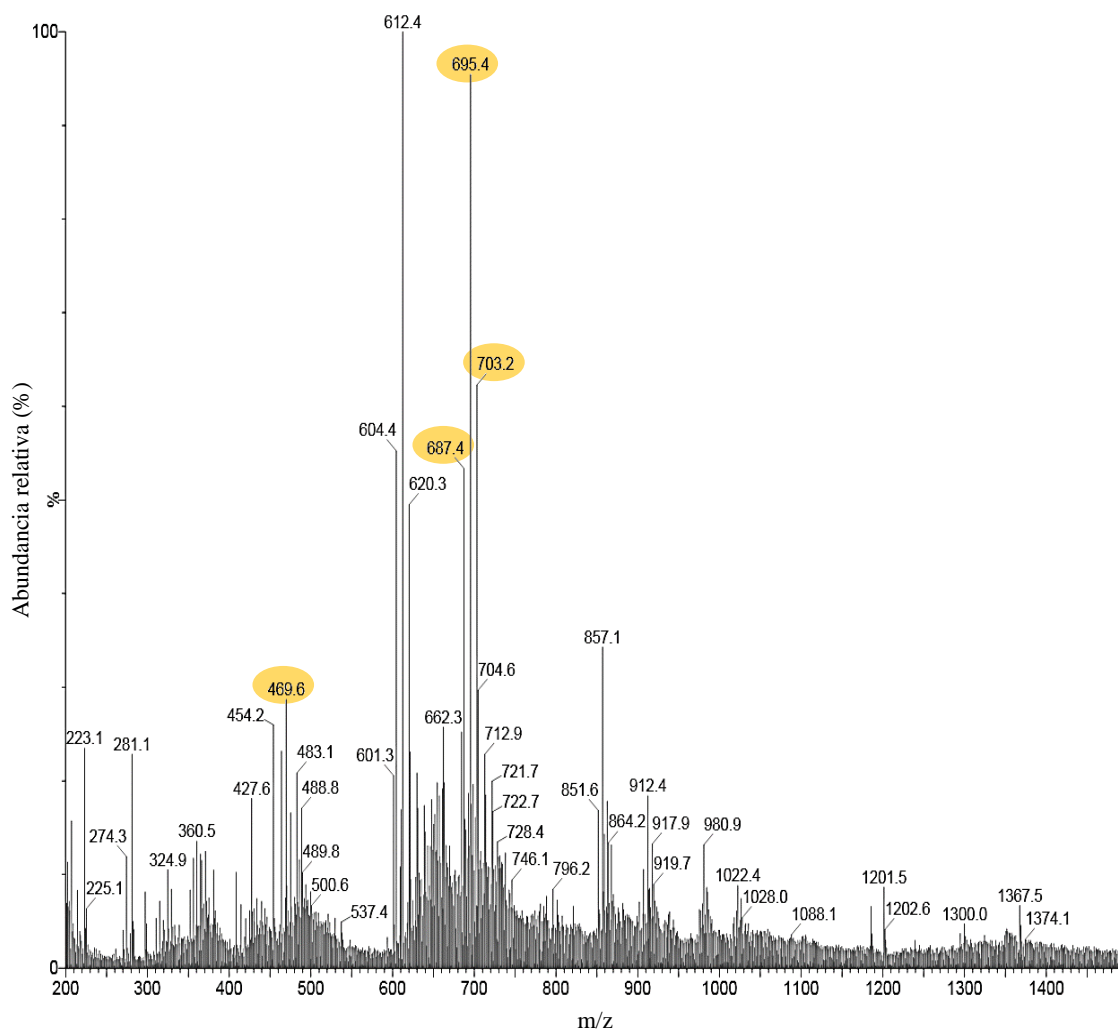


Figura 29. Espectro de masas del cucurbit[8]urilo en agua.

También se verifica la encapsulación del dd-TBO⁺ en el CB[8] por espectrometría de masas, en la **Figura 30** aparece la señal 914.9 m/z , correspondiente al $[\text{CB8} + 2\text{dd-TBO} + \text{NH}_4]^{3+}$, cuando se fragmenta en dos; y la señal 954.0 m/z , $[\text{CB8} + 2\text{dd-TBO} + 2\text{K} + \text{NH}_4]^{5+}$, cuando se fragmenta en dos.

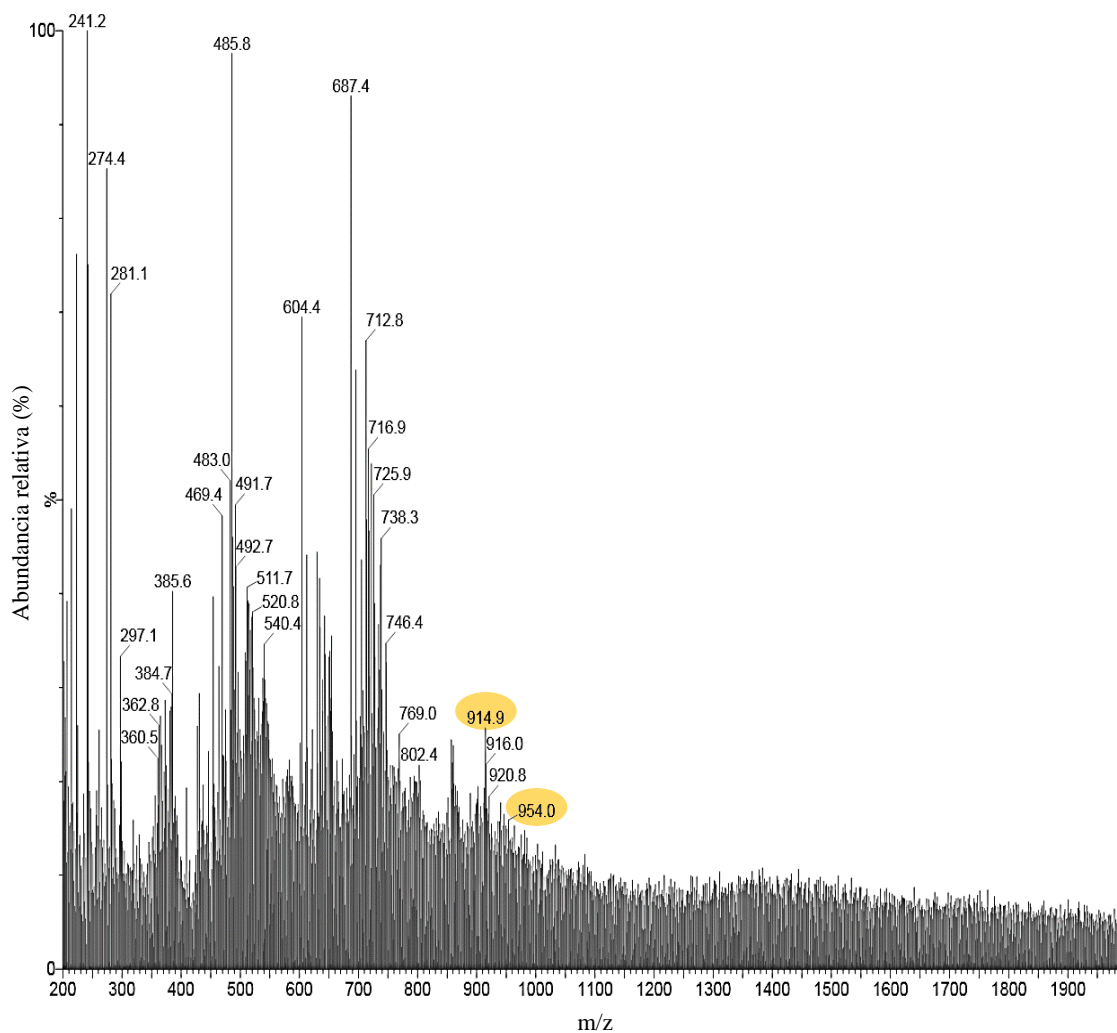


Figura 30. Espectro de masas del derivado dd-TBO⁺ encapsulado en CB[8] (dd-TBO⁺@CB[8]) en agua.

3.3.1.4 Determinación de la Formación del Complejo de Inclusión con el

Fotosensibilizador

3.3.1.5 Determinación de la Constante de Asociación

Debido a que por fluorescencia se vio una disminución en el espectro del dd-TBO⁺@CB[8], causado por autoapagamiento de la molécula, se optó por determinar la constante de asociación del dd-TBO⁺@CB[7], ya que las condiciones experimentales actuales en Panamá nos permiten evidenciar la formación del complejo de inclusión con el CB[8], pero no determinar la constante

de asociación. Para determinar la constante de asociación se prepararon dos soluciones descritas en la sección **2.7.1.4 Determinación de la constante de asociación**. Todas las muestras preparadas fueron excitadas a 580 nm porque es el punto en la absorbancia que se mantiene constante cuando el dd-TBO⁺ se encuentra solo y encapsulado. Los datos se colectaron en un rango de 590 nm a 750 nm, utilizando un slit de excitación y de emisión de 3 nm y la corrección de la señal de la muestra. En la **Figura 31** se muestra la curva de unión normalizada obtenida. Estos datos fueron cargados al software Scientist y por medio de análisis numérico se determinó la constante de asociación para un modelo de 1:1 de acuerdo con protocolos previamente reportados (Robinson-Duggon *et al*, 2017; Robinson-Duggon *et al*, 2021) para obtener los datos de la constante de asociación. Dichos datos se encuentran tabulados en la **Tabla 6**, en donde C11 corresponde al cociente entre los rendimientos cuánticos de fluorescencia en presencia y ausencia de CB[7], β 11 corresponde a la constante de equilibrio para la formación del complejo 1:1 con CB[7] y GT se refiere al CB[7] libre del huésped, es decir, del dd-TBO⁺.

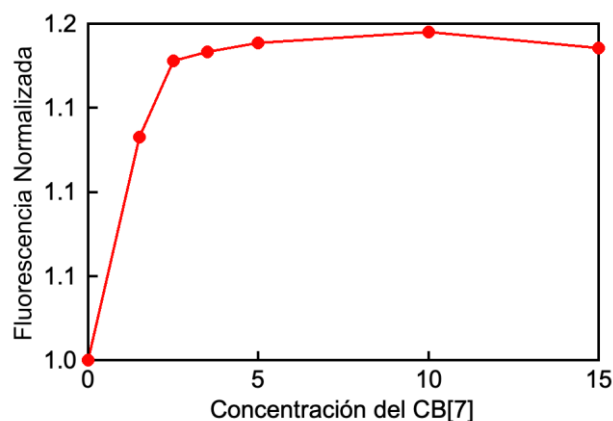


Figura 31. Curva de unión del complejo dd-TBO⁺@CB[7].

Los datos obtenidos por el software sugieren que la constante de asociación es alta, $2.056 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, y esta constante es un orden de magnitud mayor que la reportada para la molécula madre TBO^+ ($5.5 \pm 0.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) (Robinson-Duggon, 2017).

Tabla 6. Valores obtenidos del software Scientist para la determinación de la constante de asociación del $\text{dd-TBO}^+ @ \text{CB}[7]$.

Nombre	Valor
C11	1.191
β 11	$2.056 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$
GT	2×10^{-6}

3.4 Determinación del Oxígeno Singulete

Para determinar la generación de oxígeno singulete se preparó una sonda del ABMA. Para ello se disolvieron, en 2 mL de dimetilsulfóxido, 5.3 mg ABMA, y se sometió a agitación para una mejor disolución. Se prepararon soluciones de hexacianoferrato de tripotasio y azida de sodio a 1 mM y 10 mM respectivamente. La concentración del dd-TBO^+ utilizado fue de 4 μM .

Inicialmente se preparó, en una celda de cuarzo, 3 mL del ABMA a 100 μM , sin embargo, esta concentración resultó ser alta para determinar la generación de oxígeno singulete por absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis, pero se presentaron problemas de solubilidad por la elevada concentración de la sonda por lo que se realizaron ajustes de concentración hasta que finalmente se utilizó 1.6 μM de la sonda y tuvimos que determinarlo por medio de fluorescencia ya que es una técnica más sensible.

En una celda de cuarzo se preparó la sonda a 1.6 μM y se irradió durante 30 min como control, para demostrar que la misma no se degrada por sí sola. Para esto se graficó la absorbancia de

esta vs el tiempo de irradiación, como se puede ver en la **Figura 32**, la sonda se mantiene igual a tiempo 0 y luego de los 30 min de irradiación con luz blanca.

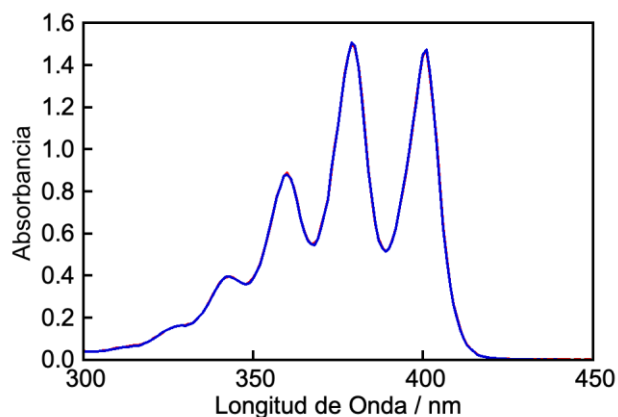


Figura 32. Espectro de absorbancia de UV-Vis del ABMA antes y después de ser irradiado con luz blanca.

En la **Figura 33** se encuentran graficadas las fluorescencias normalizadas emitida de cada solución preparada para determinar el oxígeno singlete siguiendo la disminución del ABMA, la cual es una sonda específica para esta especie a determinar. Estas determinaciones se realizaron excitando en 395 nm, longitud de onda con menor energía del ABMA. Los espectros de fluorescencia se colectaron de 400 a 550 nm con un slit de excitación y de emisión de 1 nm para las muestras del dd-TBO⁺ solo y encapsulado en presencia de la azida de sodio, con slit de excitación y de emisión de 4 nm para el dd-TBO⁺ solo con el aditivo FeCy, y un slit excitación y de emisión de 2 nm de para el dd-TBO⁺ encapsulado en CB[7] y CB[8] en presencia del aditivo FeCy.

En la **Figura 33** se puede observar que el dd-TBO⁺@CB[7] en solución amortiguadora de fosfato de pH 7 (círculos verdes) a tiempo de 5 a 20 min, genera menor cantidad de oxígeno

singlete que el dd-TBO⁺ solo en solución amortiguadora de fosfato de pH 7 (círculos rojos), pero al cabo de 30 min generan la misma cantidad. Aunque esto suceda así, está la ventaja de que el dd-TBO⁺ encapsulado se protege de la fotodegradación, lo cual no sucede si está la molécula sola. Por otro lado, se tiene la fluorescencia normalizada de ABMA con el dd-TBO⁺ solo en una solución enriquecida con agua deuterada (cuadrados azules), como es en este medio la vida media del oxígeno singlete es ~20 veces mayor (4 μs en agua y 60 μs en D₂O) (Cáceres, J. *et al.*, 2017). por ende, persiste más tiempo y la sonda se degrada más como se muestra en la **Figura 33**. También se ve que el dd-TBO⁺@CB[7] en una solución enriquecida con agua deuterada (cuadrados morados) genera aún más cantidad de oxígeno singlete que estando la molécula sola.

El hecho de que se vea una mayor degradación del ABMA, visto por la disminución de la fluorescencia, es un indicativo de que predomina el mecanismo de Tipo II, en donde el fotosensibilizador se regenera, esto es deseable para la TFD.

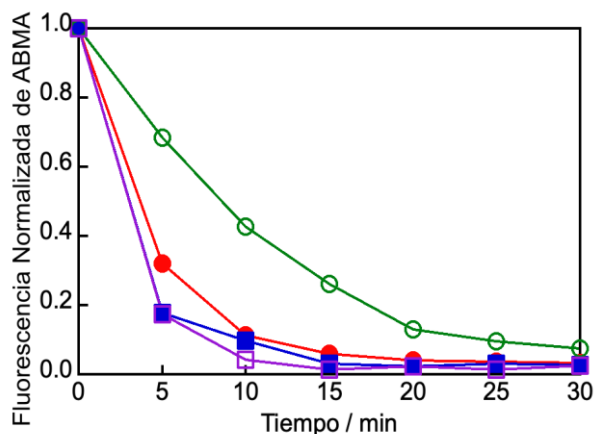


Figura 33. Fluorescencia normalizada de ABMA. A (1.6 μM) a 407 nm cuando fue irradiada con el derivado dd-TBO⁺ en ausencia (círculos rojos) y en presencia de 50 μM CB[7] (círculos verdes) en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7.0. Fluorescencia normalizada de ABMA (1.6 μM) a 407 nm cuando fue irradiada con el derivado dd-TBO⁺ en ausencia (cuadrados azules) y en presencia de 50 μM CB[7] (cuadrados morados) en solución enriquecida con agua deuterada (D₂O). Las muestras fueron irradiadas con luz blanca.

Para conocer el mecanismo predominante del fotosensibilizador, dd-TBO⁺, se prepararon soluciones con FeCy (para saber si hay transferencia de electrones) y NaN₃ (un apagador físico del oxígeno singulete). En la **Figura 34** se puede observar que el dd-TBO⁺ en presencia del FeCy tiene variaciones de intensidades de fluorescencia mayores al del dd-TBO⁺ solo y así como con la azida. Esto se debe a que hay mecanismos de transferencia de electrones, es decir, sucede el mecanismo de Tipo I. Por otro lado, la disminución de la fluorescencia con la azida es indicativo de que, aunque ella es un apagador del oxígeno singulete, se puede estar generando tanto oxígeno singulete como un mecanismo tipo I como se ha reportado anteriormente (Cáceres, J., *et al.*, 2017).

Este mismo comportamiento se puede observar cuando el dd-TBO⁺ está encapsulado con el CB[7] y con el CB[8], con la diferencia de que, al estar encapsulado se degrada más lento el AMBA que al estar el dd-TBO⁺ solo, indicativo de una menor generación de oxígeno singulete con respecto al dd-TBO⁺ solo.

Comparando la degradación del ABMA en la presencia de los macrociclos, es notable que con el CB[7] el ABMA se degrada en mayor cantidad que con el CB[8], como se puede apreciar en la **Figura 35** y la **Figura 36** respectivamente. Como ya se mencionó anteriormente, en el CB[8] entran dos moléculas del fotosensibilizador, por lo que se genera oxígeno singulete pero debido al autoapagamiento no se genera tanta cantidad como cuando el fotosensibilizador está formando un complejo de inclusión 1:1 con el CB[7]. En este caso se puede observar que al cabo de 30 min la degradación del ABMA causada por la generación del oxígeno singulete de la molécula sola y en CB[7] es la misma. Esto no sucede con el CB[8].

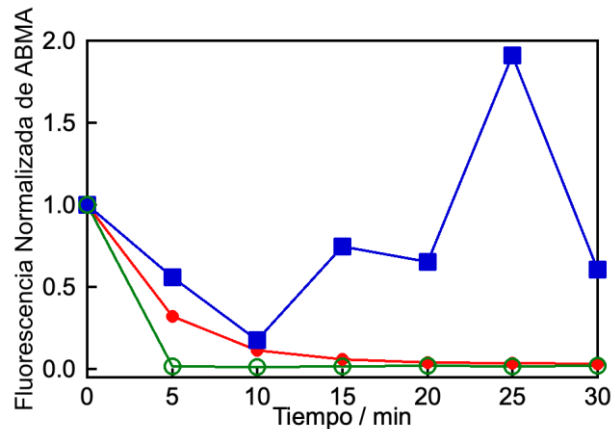


Figura 34. Fluorescencia normalizada del ABMA con dd-TBO⁺ irradiado con luz visible durante 30 min en solución amortiguadora 10 mM de pH 7. La línea azul representa el dd-TBO⁺ con FeCy; La línea roja el dd-TBO⁺ solo; y la línea verde el dd-TBO⁺ con NaN₃.

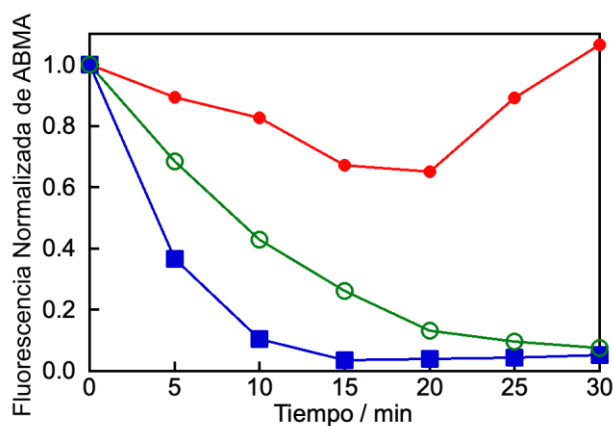


Figura 35. Fluorescencia normalizada del ABMA con dd-TBO⁺@CB[7] irradiado con luz visible durante 30 min en solución amortiguadora 10 mM de pH 7. La línea roja representa el dd-TBO⁺@CB[7] con FeCy; la línea verde el dd-TBO⁺@CB[7] solo; y la línea azul el dd-TBO⁺@CB[7] con NaN₃.

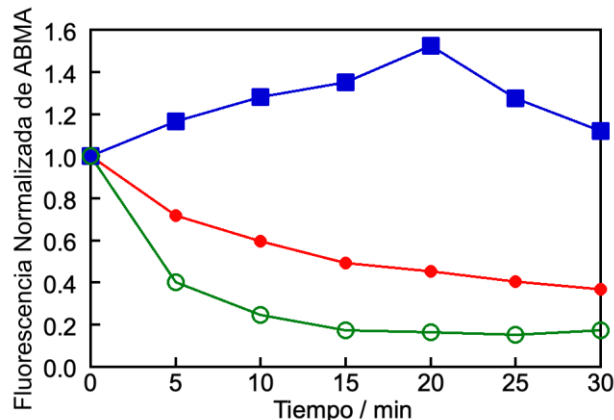


Figura 36. Fluorescencia normalizada del ABMA con dd-TBO⁺@CB[8] irradiado con luz visible durante 30 min en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7. Línea azul: dd-TBO⁺@CB[8] con FeCy; Línea roja: dd-TBO⁺@CB[8] solo; Línea verde: dd-TBO⁺@CB[8] con NaN₃.

3.5 Degradación de la Superóxido Dismutasa por el Proceso Fotosensibilizado del dd-TBO⁺

Para evaluar la degradación de la SOD por el proceso fotosensibilizado del dd-TBO⁺ se prepararon varias soluciones de SOD, a diferentes concentraciones como está descrito en la sección **2.9 Degradación de la Superóxido Dismutasa por el Proceso Fotosensibilizado del dd-TBO⁺**, sola y con el derivado, en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7. Para cada muestra preparada se sacó en un vial eppendorf 5 μ L de la enzima sola, con el derivado antes y después de ser irradiado durante 30 min con luz blanca.

La enzima utilizada fue la Superóxido dismutasa de eritrocitos bovino, esta tiene una masa molecular de 32.5 kDa y es una proteína homodimérica con dos subunidades de 16.3 kDa (Superoxide Dismutase (S7571) - Datasheet).

3.5.1 Electroforesis de la Superóxido Dismutasa.

Para determinar la degradación de la SOD se hicieron varios geles de poliacrilamida con distintas concentraciones de SOD y dd-TBO⁺. Primeramente, se realizó un gel no reductor al 8

%, en esta condición se evaluó si la intensidad de radiación con luz blanca tendría un efecto sobre la SOD. Como se puede observar en la **Figura 37**, los pesos moleculares de la SOD irradiada y sin irradiar son los mismos, esto quiere decir que la radiación sola no es suficiente para causar algún efecto sobre la enzima. Sin embargo, los pesos moleculares que se observan son cercanos a 100 kDa, es decir que la enzima está formando agregados.

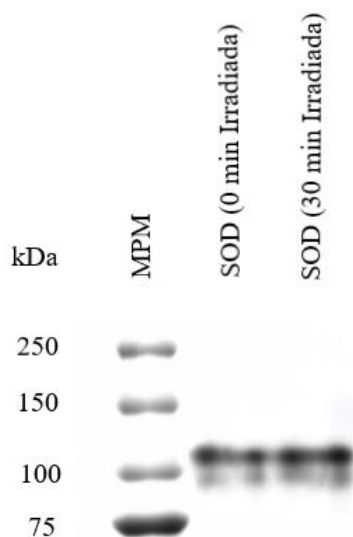


Figura 37. Gel de poliacrilamida no reductor al 8 % con SOD (25 μ M) a 0 y 30 min de irradiación.

Una vez visto la SOD en condiciones no reductoras, se opta por probar las condiciones reductoras y se utiliza el dd-TBO⁺ a 2.5 μ M en donde el homodímero se fragmenta en las subunidades de 16.3 kDa como se muestra en la **Figura 38**, donde se ve la última banda, que corresponde a la SOD con el dd-TBO⁺ a 30 min de irradiación. Ligeramente por debajo de las otras dos. Esto es indicativo de que la enzima se puede estar degradando. Sin embargo, la tinción con Coomassie no es lo suficientemente sensible para ver los cambios mínimos que sufre la enzima, La tinción con azul de Coomassie R-250 puede detectar una banda de 0.5 μ g/cm² de

proteína presente en una matriz de gel (*Thermo Scientific™ Pierce™ Coomassie Brilliant Blue Dyes Colorantes para teñir geles de proteínas, s.f.*).

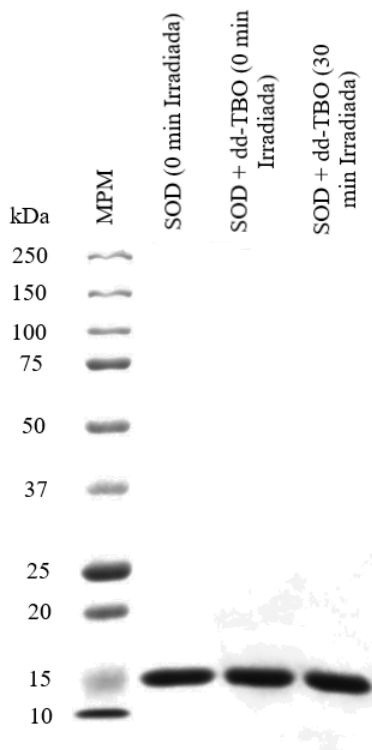


Figura 38. Gel de poliacrilamida reductor al 8 % con SOD (25 μM) sin irradiar, y SOD con dd-TBO⁺ a 0 y 30 min de irradiación.

También se realizaron geles disminuyendo la concentración de la enzima, se probó a 10 μM (**Figura 39**), concentración que está presente en el cuerpo humano, y se disminuyó más la concentración a 2.5 μM (**Figura 40**). Sin embargo, no se notan cambios notables en el gel y nuevamente se ven las masas moleculares cerca de los 15 kDa.

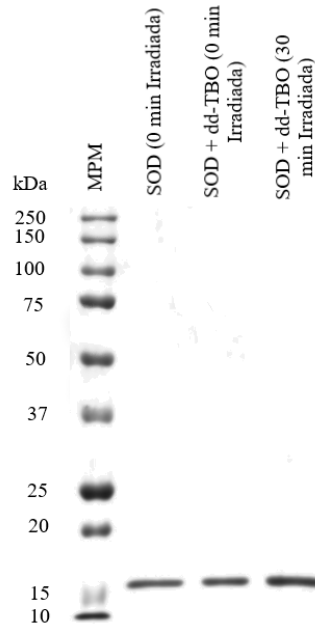


Figura 39. Gel de poliacrilamida reductor al 12 % con SOD (10 μ M) sin irradiar, y SOD con dd-TBO⁺ a 0 y 30 min de irradiación.

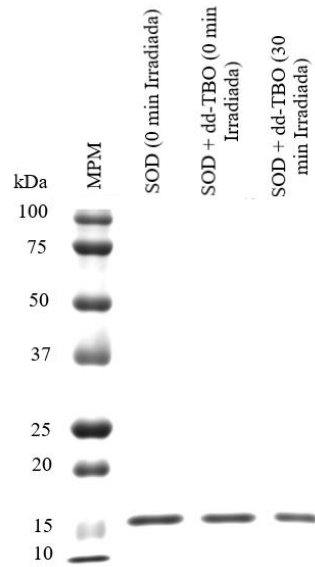


Figura 40. Gel de poliacrilamida reductor al 12 % con SOD (2.5 μ M) sin irradiar, y SOD con dd-TBO⁺ a 0 y 30 min de irradiación.

Debido a que no se notaron cambios en los geles, se optó por disminuir aún más la concentración de la SOD, a 0.5 μM y aumentar la concentración del dd-TBO⁺ a 6 μM . En la **Figura 41** se puede ver una pequeña variación en la última banda de la SOD con el dd-TBO⁺ luego de 30 min de irradiación, con respecto a las demás. Pero como ya se mencionó, puede ser que haya fragmentación, pero la tinción con Coomassie R-250 no lo revele debido al rango de concentración para el que éste es sensible.

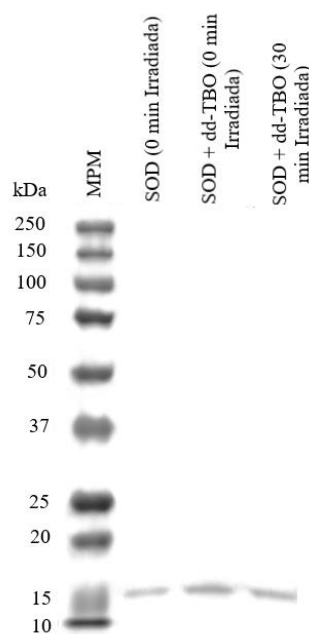


Figura 41. Gel de poliacrilamida reductor al 12 % con SOD (0.5 μM) sin irradiar, y SOD con dd-TBO⁺ a 0 y 30 min de irradiación.

Capítulo IV.

Conclusiones

- El derivado doblemente desmetilado, dd-TBO⁺ es fácil de sintetizar fotoquímicamente, ya se demostró que al irradiar durante 3 horas es el producto mayoritario de la fotodegradación de la molécula madre Azul de Toluidina.
- Se pudo evidenciar la encapsulación en los macrociclos CB[7] y CB[8] por medio de espectroscopía UV-Vis, Fluorescencia y se verificó por espectrometría de masas. Por esta última técnica utilizada se evidenció que el derivado doblemente desmetilado dd-TBO⁺ forma complejos de inclusión 1:1 con el CB[7], el cual tiene una constante de asociación alta, de $2.056 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, obtenida del software Scientist. También se demostró por espectrometría de masas que el dd-TBO⁺ con el CB[8] forma complejos de inclusión 2:1.
- El dd-TBO⁺ genera mayor cantidad de oxígeno singlete que la molécula madre TBO⁺. Cuando el dd-TBO⁺ es encapsulado en CB[7] este genera oxígeno singlete, y se protege de la fotodegradación. Sin embargo, cuando es encapsulado en CB[8] la formación de oxígeno singlete es menor.
- El fotosensibilizador sigue teniendo mecanismos de Tipo I y Tipo II, pero es predominante el mecanismo Tipo II.
- Los procesos fotosensibilizados por el derivado pueden degradar la enzima SOD, sin embargo, se necesitan pruebas más sensibles para determinar en qué magnitud lo hace.
- Se optimizaron las condiciones de la síntesis del fotosensibilizador, de su encapsulación en los macrociclos CB[7] y CB[8], de la generación del oxígeno singlete y aquellas condiciones utilizadas para evaluar su efecto con la SOD.

Recomendaciones

- Para la purificación del Azul de Toluidina usar una columna más grande para poder colocar mayor cantidad de muestra. Adicional a esto, recuperar las fracciones por gravedad, sin hacer uso de presión para lograr una mejor separación de estas.
- Otra recomendación, para determinar la constante de asociación, es hacer los primeros puntos de la curva a concentraciones cercanas, ir de 0.5 en 0.5 μM del macrociclo CB[7] hasta una concentración de 5 μM , y luego de 5 en 5 μM hasta 15 μM .
- Para los experimentos realizados con el fotosensibilizador dd-TBO⁺ en vez de irradiar con luz blanca, se puede irradiar con luz ámbar, ya que la longitud de onda de esta luz es 595 nm, el cual coincide con la longitud de onda máxima para el derivado doblemente desmetilado, y al irradiar en el máximo se puede tener más certeza de la capacidad de generación de oxígeno singulete.
- En cuanto a la evaluación del proceso fotosensibilizado de dd-TBO⁺ hacia la enzima Superóxido Dismutasa, se puede usar menor concentración y revelar los geles de electroforesis con tinción con plata. Adicionalmente, se puede inyectar por infusión directa la SOD inicialmente, cuando se le añade el fotosensibilizador, y luego de ser irradiada para una mejor determinación de degradación por masas en un equipo de espectrometría de masas de mayor resolución.

Referencias Bibliográficas

- 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., 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>
- Allison, R. R., & Sibata, C. H. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 7(2), 61-75.
- Allison R. R., Downie G. H., Cuenca R., Hu X. H., Childs C. J. H., Sibata C. H., Photodiagnosis Photodyn. Ther. (2004), 1, 27–42
- 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>
- Bergh, J. (2009). Quo Vadis With Targeted Drugs in the 21st Century? *Journal of Clinical Oncology*, 27(1), 2-5. <https://doi.org/10.1200/jco.2008.18.8342>
- Buytaert, E., Dewaele, M., & Agostinis, P. (2007). Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1776(1), 86-107.
- Caceres, J., Robinson-Duggon, J., Tapia, A., Paiva, C., Gomez, M., Bohne, C., & Fuentealba, D. (2017). Photochemical behavior of biosupramolecular assemblies of photosensitizers, cucurbit[n]urils and albumins [10.1039/C6CP07749H]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(3), 2574-2582. <https://doi.org/10.1039/C6CP07749H>
- 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.
- Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(4), 279-293.
- Chio IIC, Tuveson DA. ROS en Cáncer: la cuestión candente . *Tendencias Mol Med* . 2017; 23 :411-429.
- Comini, L. (2016, 26 diciembre). Fotosensibilizadores naturales activos en terapia fotodinámica | Bitácora Digital | BIOMEDICINA Y SOCIEDAD
- Davies, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1703(2), 93-109.
- Davies M. J., Fu S. L., Dean R. T., Biochem. J. (1995), 305, 643–649
- Day, A. I., Blanch, R. J., Arnold, A. P., Lorenzo, S., Lewis, G. R., & Dance, I. (2002). A Cucurbituril-Based Gyroscane: A New Supramolecular Form. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(2), 275-277. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020118\)41:2<275::AID-ANIE275>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020118)41:2<275::AID-ANIE275>3.0.CO;2-M)
- Debele, T. A., Peng, S., & Tsai, H.-C. (2015). Drug carrier for photodynamic cancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 22094-22136.
- DeRosa, M. C., & Crutchley, R. J. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233, 351-371. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00034-6](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00034-6)
- Dichiara, M., Prezzavento, O., Marrazzo, A., Pittala, V., Salerno, L., Rescifina, A., & Amata, E. (2017). Recent advances in drug discovery of phototherapeutic non-porphyrinic anticancer agents. *European journal of medicinal chemistry*.

- Dolgachev, V., Oberley, L. W., Huang, T. T., Kraniak, J. M., Tainsky, M. A., Hanada, K., & Separovic, D. (2005). A role for manganese superoxide dismutase in apoptosis after photosensitization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(2), 411-417. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.141>
- Eliezri, Y. D. (1988). The toluidine blue test: an aid in the diagnosis and treatment of early squamous cell carcinomas of mucous membranes. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 18(6), 1339-1349.
- Epstein, J. B., Oakley, C., Millner, A., Emerton, S., van der Meij, E., & Le, N. (1997). The utility of toluidine blue application as a diagnostic aid in patients previously treated for upper oropharyngeal carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 83(5), 537-547.
- Fang-Yen, C., Gabel, C. V., Samuel, A. D. T., Bargmann, C. I., & Avery, L. (2012). Laser Microsurgery in *Caenorhabditis elegans*. *Caenorhabditis Elegans: Cell Biology and Physiology*, 177–206. doi:10.1016/b978-0-12-394620-1.00006-0
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, *et al*. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer
- García Triana, Bárbara, García Morales, Onel, Clapes Hernández, Sonia, Rodes Fernández, Lorenzo, & García Piñeiro, José Carlos. (1995). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*
- Ghogare, A. A., & Greer, A. (2016). Using singlet oxygen to synthesize natural products and drugs. *Chemical reviews*, 116(17), 9994-10034.
- Golab, J., Nowis, D., Skrzycki, M., Czczot, H., Baranczyk-Kuzma, A., Wilczynski, G. M., Makowski, M., Mroz, P., Kozar, K., Kaminski, R., Jalili, A., Kopec, M., Grzela, T., & Jakobisiak, M. (2003). Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol - A superoxide dismutase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 407-414. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209125200>
- González-Béjar, M., Montes-Navajas, P., García, H., & Scaiano, J. C. (2009). Methylene Blue Encapsulation in Cucurbit[7]uril: Laser Flash Photolysis and Near-IR Luminescence Studies of the Interaction with Oxygen. *Langmuir*, 25, 10490-10494.
- Graciano, T. B., Coutinho, T. S., Cressoni, C. B., Freitas, C. d. P., Pierre, M. B. R., Pereira, S. A. d. L., Shimano, M. M., Frange, R. C. d. C., & Garcia, M. T. J. (2015). Using chitosan gels as a toluidine blue O delivery system for photodynamic therapy of buccal cancer: In vitro and in vivo studies. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 12(1), 98-107. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.11.003>
- Halliwell, Barry, and John M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5th edn (Oxford, 2015; online edn, Oxford Academic, 22 Oct. 2015), <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Halliwell, B. (2006). *Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?* *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1634–1658. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x
- Hamblin, M. R., & Mróz, P. (2008). *Advances in Photodynamic Therapy. Basic, Translational, and Clinical*. Artech House.
- Hariharan, P., Courtney, J., & Eleczko, S. (1980). Production of hydroxyl radicals in cell systems exposed to haematoporphyrin and red light. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 37(5), 691-694.
- Herlin, P., Marnay, J., Jacob, J., Ollivier, J., & Mandard, A. (1983). A study of the mechanism of the toluidine blue dye test. *Endoscopy*, 15(01), 4-7.

- Hettiarachchi, G., Nguyen, D., Wu, J., Lucas, D., Ma, D., Isaacs, L., & Briken, V. (2010). Toxicology and Drug Delivery by Cucurbit[n]uril Type Molecular Containers. *PLoS ONE*, 5, 10514.
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*, 13(10), 714-726. <https://doi.org/10.1038/nrc3599>
- Horton, H. R. (2008). Principios de bioquímica 4ED. ISBN: 9789702610250
- Instituto Nacional del Cáncer(2021, 5 mayo). El Cáncer
- Isaacs, L. (2009). Cucurbit[n]urils: from mechanism to structure and function. *Chemical Communications*(6), 619-629. <https://doi.org/Doi 10.1039/B814897j>
- Juzeniene, A., Peng, Q., & Moana, J. (2007). Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(12), 1234-1245. <https://doi.org/10.1039/b705461k>
- Khan, A. U., & Kasha, M. (1963). Red Chemiluminescence of Molecular Oxygen in Aqueous Solution. *The Journal of Chemical Physics*, 39(8), 2105-2106. <https://doi.org/10.1063/1.1734588>
- Kim, K., Selvapalam, N., Ko, Y. H., Park, K. M., Kim, D., & Kim, J. (2007). Functionalized cucurbiturils and their applications [10.1039/B603088M]. *Chemical Society Reviews*, 36(2), 267-279. <https://doi.org/10.1039/B603088M>
- 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/Doi 10.1023/A:1012369120376>
- Ling, Y., Wang, W., & Kaifer, A. E. (2007). A new cucurbit[8]uril-based fluorescent receptor for indole derivatives [10.1039/B611559D]. *Chemical Communications*(6), 610-612. <https://doi.org/10.1039/B611559D>
- Los Eluyentes en HPLC – cromlab-instruments.es.* (s.f.). recuperado de <https://cromlab-instruments.es/los-eluyentes-en-hplc/>
- Macartney, D. H. (2011). Encapsulation of Drug Molecules by Cucurbiturils: Effects on their Chemical Properties in Aqueous Solution. *Isr. J. Chem.*, 51, 600-615.
- Manda, G., Nechifor, M. T., & Neagu, T. M. (2009). Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. *Current Chemical Biology*, 3(1), 22-46.
- Marquez, C., & Nau, W. M. (2001). Two mechanisms of slow host-guest complexation between cucurbit 6 uril and cyclohexylmethylamine: pH-responsive supramolecular kinetics. *Angewandte Chemie-International Edition*, 40(17), 3155-+. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010903\)40:17<3155::aid-anie3155>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010903)40:17<3155::aid-anie3155>3.0.co;2-7)
- McKamey, M. R., & Spitznagle, L. A. (1975). Chromatographic, mass spectral, and visible light absorption characteristics of toluidine blue O and related dyes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64(9), 1456-1462. <https://doi.org/10.1002/jps.2600640907>
- Miller, A.-F. (2012). Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *Febs Letters*, 586(5), 585-595. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.048>
- Miller, A. F. (2004). Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(2), 162-168. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.02.011>
- Mohanty, J., Dutta Choudhury, S., Upadhyaya, H. P., Bhasikuttan, A. C., & Pal, H. (2009). Control of the Supramolecular Excimer Formation of Thioflavin T within a Cucurbit[8]uril Host: A Fluorescence On/Off Mechanism. *Chemistry - A European Journal*, 15(21), 5215-5219. <https://doi.org/10.1002/chem.200802686>

- Montes-Navajas, P., Corma, A., & Garcia, H. (2008). Complexation and Fluorescence of Tricyclic Basic Dyes Encapsulated in Cucurbiturils. *Chem. Phys. Chem.*, 9, 713-720.
- Montes-Navajas, P., Gonzalez-Bejar, M., Scaiano, J. C., & Garcia, H. (2009). Cucurbituril Complexes Cross The Cell Membrane. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 8, 1743-1747.
- Murray, J., Kim, K., Ogoshi, T., Yao, W., & Gibb, B. C. (2017). The aqueous supramolecular chemistry of cucurbit[n]urils, pillar[n]arenes and deep-cavity cavitands [10.1039/C7CS00095B]. *Chemical Society Reviews*, 46(9), 2479-2496. <https://doi.org/10.1039/C7CS00095B>
- NCI Dictionary of Cancer Terms. (s. f.). National Cancer Institute. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>
- O'Connor, A. E., Gallagher, W. M., & Byrne, A. T. (2009). Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*, 85(5), 1053-1074.
- Oberley, L., & Buettner, G. (1979). Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res*, 39, 1141-1149.
- Perry, J. J. P., Shin, D. S., Getzoff, E. D., & Tainer, J. A. (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1804(2), 245-262. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.004>
- Reactive Oxygen Species (ROS): Key Components in Cancer Therapies. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 22(2), 215-222 – 2022. <https://doi.org/10.2174/1871520621666210608095512>
- Redmond, R. W., & Gamlin, J. N. (1999). A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and photobiology*, 70(4), 391-475.
- Redmond, R. W., & Kochevar, I. E. (2006). Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochemistry and photobiology*, 82(5), 1178-1186.
- REGISTROS, D. D., & SALUD, Y. E. D. (2021). *BOLETÍN DEL DEPARTAMENTO DE REGISTROS Y ESTADÍSTICAS DE SALUD*. M. D. SALUD, I. O. NACIONAL, & D. J. D. AROSEMENA”. Recuperado de <https://www.ion.gob.pa/site/wp-content/uploads/2017/08/boletin-21-1-003.pdf>
- Remucal, C. K., & McNeill, K. (2011). Photosensitized amino acid degradation in the presence of riboflavin and its derivatives. *Environmental science & technology*, 45(12), 5230-5237.
- 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., Pérez-Mora, F., Dibona-Villanueva, L., & Fuentealba, D. (2018). Potential Applications of Cucurbit[n]urils Inclusion Complexes in Photodynamic Therapy. *Israel Journal of Chemistry*, 58(3-4), 199-214. <https://doi.org/doi:10.1002/ijch.201700093>
- 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. *The Journal of Physical Chemistry C*, 121(39), 21782-21789. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b07736>
- Robinson-Duggon, J., Pizarro, N., Gunther, G., Zúñiga-Núñez, D., Edwards, A. M., Greer, A., & Fuentealba, D. (2021). Fatty Acid Conjugates of Toluidine Blue O as Amphiphilic Photosensitizers: Synthesis, Solubility, Photophysics and Photochemical Properties†. *Photochemistry and Photobiology*, 97(1), 71-79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/php.13304>

- Salvemini, D., Riley, D. P., & Cuzzocrea, S. (2002). Sod mimetics are coming of age [10.1038/nrd796]. *Nat Rev Drug Discov*, 1(5), 367-374. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd796>
- Scholtbach, K., Venegas, I., Bohne, C., & Fuentealba, D. (2015). Time-resolved fluorescence anisotropy as a tool to study guest-cucurbit[n]uril-protein ternary supramolecular interactions. *Photochem Photobiol Sci*, 14(4), 842-852. <https://doi.org/10.1039/c4pp00479e>
- Superoxide Dismutase (S7571) – Datasheet.
<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/305/124/s7571dat.pdf>
- Spectra, G. H. M., & Structure, M. (1950). Spectra of Diatomic Molecules. *Van Noshtrand Company New York*.
- Sztandera, K., Gorzkiewicz, M., & Klajnert-Maculewicz, B. (2020). Nanocarriers in photodynamic therapy—in vitro and in vivo studies. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12(3), e1509. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wnan.1599>
- Tang, H., Fuentealba, D., Ko, Y. H., Selvapalam, N., Kim, K., & Bohne, C. (2011). Guest binding dynamics with cucurbit[7]uril in the presence of cations. *J Am Chem Soc*, 133(50), 20623-20633. <https://doi.org/10.1021/ja209266x>
- Thermo Scientific™ Pierce™ Coomassie Brilliant Blue Dyes - Thermo Scientific™ Pierce™ Coomassie Brilliant Blue Dyes Colorantes para teñir geles de proteínas. (s. f.). <https://www.fishersci.es/shop/products/pierce-coomassie-brilliant-blue-r-250-g-250-dyes-1/11876744>
- Torre, Rosario (2000). *Determinación de la actividad de superóxido dismutasa en poblaciones humanas normal y patológicas*. ISBN: 978-84-8466-948-7.
- Tremblay, J. F., Dussault, S., Viau, G., Gad, F., Boushira, M., & Bissonnette, R. (2002). Photodynamic therapy with toluidine blue in Jurkat cells: cytotoxicity, subcellular localization and apoptosis induction. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(11), 852-856. <https://doi.org/10.1039/b204385h>
- Uzunova, V. D., Cullinane, C., Brix, K., Nau, W. M., & Day, A. I. (2010). Toxicity of Cucurbit[7]uril and Cucurbit[8]uril: An Exploratory In Vitro and In Vivo Study. *Org. Biomol. Chem.*, 8, 2037-2042.
- Walker, S., Oun, R., McInees, F. J., & Wheate, N. J. (2011). The Potential of Cucurbit[n]urils in Drug Delivery. *Isr. J. Chem.*, 51, 616-624.
- Wang, R., Yuan, L., Ihmels, H., & Macartney, D. H. (2007). Cucurbit[8]uril/Cucurbit[7]uril Controlled Off/On Fluorescence of the Acridizinium and 9-Aminoacridizinium Cations in Aqueous Solution. *Chemistry - A European Journal*, 13(22), 6468-6473. <https://doi.org/10.1002/chem.200700199>
- Wang, X.-Q., Lei, Q., Zhu, J.-Y., Wang, W.-J., Cheng, Q., Gao, F., Sun, Y.-X., & Zhang, X.-Z. (2016). Cucurbit[8]uril Regulated Activatable Supramolecular Photosensitizer for Targeted Cancer Imaging and Photodynamic Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(35), 22892-22899. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b07507>
- Wilson, M., Burns, T., Pratten, J., & Pearson, G. (1995). Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(5), 569-574.
- Wilson, M., & Mia, N. (1993). Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *Journal of oral pathology & medicine*, 22(8), 354-357.
- Wilson, M., & Yianni, C. (1995). Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by low-power laser light. *Journal of medical microbiology*, 42(1), 62-66.

Yang H, Villani RM, Wang H, *et al.* El papel de las especies reactivas de oxígeno celular en la quimioterapia del cáncer . *J Exp Clin Cáncer Res* . 2018; 37 :266.

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.