

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Básicas e Ingeniería

Departamento de Química

Análisis del acoplamiento o interacción de macrociclos
tetrapirrólicos y albumina de suero bovino

Tesis de Doctorado

Presenta:

Jonathan Osiris Vicente Escobar

Director de Tesis:

Dr. Miguel Ángel García Sánchez



Contenido

Glosario.....	5
Capítulo I: Antecedentes.....	10
1.1 Macrociclos Tetrapirrólicos.....	11
1.1.1 Porfirinas.....	11
1.2 Bioconjugados.....	16
1.3 Uso de nanoestructuras.....	17
1.4 Clorofilas y derivados.....	18
1.4.1 Uso de derivados de clorofila o similares en TFD.....	21
1.5 Albumina de suero bovino.....	22
1.6 Acoplamiento molecular.....	27
Objetivo general.....	29
Objetivos particulares:.....	29
Objetivos particulares:.....	29
Capítulo II: Experimentación.....	31
2.1. Materiales y métodos.....	32
2.1.1. Esquema desarrollo experimental.....	32
2.1.2. Esquema Desarrollo computacional.....	33
2.2. Síntesis y purificación de tetra carboxiporfirina, H ₂ T(p-COOH)PP.....	33
2.3 Síntesis y purificación de tetrahidroxi fenilporfirina H ₂ T(p-OH)PP.....	34
2.4 Extracción de clorofila a y b.....	35
2.5 Preparación de clorofilina a y clorina e6.....	36
2.6 Estudios de apagamiento de fluorescencia para el sistema.....	37
2.7 Estudios in silico.....	38
Capítulo III: Resultados y discusión.....	40
3.1. Tetracarboxifenilporfirina H ₂ T(p-COOH)PP.....	41
3.2. Tetrahidroxifenilporfirina H ₂ T(p-OH)PP.....	43
3.4. Caracterización espectroscópica de clorofila a y derivados.....	46
3.4.1 Clorofila a.....	46
3.4.2 Feofitina a.....	49
3.4.3 Clorofilina a.....	51
3.4.5 Clorina e6.....	53

<i>3.5 Estudios de la interacción BSA-H₂T(p-COOH)PP por UV-Vis</i>	59
3.5.1 Estudios espectrofluorométricos de la interacción de BSA- H ₂ T(p-COOH)PP.....	61
3.5.2 Determinación de la constante de unión y estequiometría de la unión del sistema BSA- H ₂ T(p-COOH)PP)	68
3.5.3. Estudios de la interacción BSA-clorina e6-a por UV-Vis.....	69
3.5.4. Estudios espectrofluorométrico de la interacción BSA-Clorifilina a	71
3.5.5 Determinación de la constante de unión y estequiometría de la unión del sistema BSA- Clorina e6	74
3.5.6 Análisis termodinámico de la interacción BSA-H ₂ T(p-COOH)PP y BSA-clorina e6	77
3.6 Enfoque computacional; estudios de acoplamiento molecular.....	78
BSA-H ₂ T(p-COOH)PP	79
BSA-Clorina e6.....	83
Acoplamiento molecular flexible	87
3.7 Cálculos de energía libre	90
Capítulo IV: Conclusiones y perspectivas	98
Conclusiones	99
Perspectivas	100
Referencias.....	101

Glosario

H ₂ TSPc	Tetrasulfoftalocianina libre
H ₂ T(p-COOH)PP	Tetra-carboxifenil porfirina
BSA	Albumina de suero bovino
TFD	Terapia fotodinámica
Pcs	Ftalocianinas
MPC	Sulfoftalocianinas metaladas
EDTA	Ácido tetraetilendiaminotetraácetico
[L] _T	Concentración molar de ligando total
[L]	Concentración molar de ligando libre (sin unirse)
[P] ₀	Concentración total de BSA
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier
UV-Vis	Espectroscopía de absorción electrónica
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
K _u	Constante de unión, BSA-ligando
Φ	Rendimiento cuántico
pI	Punto isoeléctrico
[Q]	Concentración molar del desactivante: H ₂ T (p-COOH)PP o clorina e6
F ₀	Emisión de Fluorescencia de BSA
F	Emisión de fluorescencia de BSA en cada punto de la titulación
f _a	Fluoróforo accesible al desactivante
K _{SV}	Constante de Stern-Volmer para la asociación al-ligando
K _q	Constante de apagamiento bimolecular

n	Número de sitios de unión en la lisozima
APBS	<i>Adaptative Poisson Boltzman Solver</i>
ASA	Área de superficie accesible al disolvente
ΔASA	Cambio del área de superficie accesible al disolvente
ΔH_u	Cambio de entalpia de unión, para lisozima-ligando
ΔS_u	Cambio de entropía de unión, para lisozima-ligando
ΔG_u	Cambio de energía libre de Gibbs de unión, para lisozima-ligando
ΔG_{uc}	Cambio de energía libre de Gibbs de unión computacional, para la asociación lisozima-ligando
ΔG_{coul}	Cambio de Energía libre de Gibbs electrostática de la unión lisozima-ligando
ΔG_{ele}	Cambio de Energía libre de Gibbs electrostática de la unión lisozima-ligando
ΔG_{apol}	Cambio Energía libre de Gibbs no polar de la unión lisozima-ligando
ΔG_{solv}	Cambio de Energía libre de Gibbs de solvatación de la unión lisozima-ligando
γ	Tensión superficial
VMD	<i>Visual Molecular Dynamic</i>

Resumen

Con el fin de utilizar especies macrocíclicas tetrapirrólicas en aplicaciones médicas, se investigaron las interacciones de la albúmina de suero bovino (BSA) con tetraquis-para-carboxifenil-porfirina H2T (p-COOH)PP y clorina e6 (Ce6) en diferentes condiciones de temperatura y pH por espectroscopia de fluorescencia y espectroscopia de absorción UV-VIS y contrastando estos resultados con estudios de acoplamiento molecular. Los valores de las constantes de unión (K_b) a tres temperaturas diferentes se calcularon utilizando la ecuación modificada de Stern-Volmer. El cambio de entalpía (ΔH) y el cambio de entropía (ΔS) se determinaron con base en la ecuación de van't Hoff. Los resultados de fluorescencia indicaron que el apagamiento estático es el proceso dominante como resultado de la formación de los complejos BSA-TCPP y BSA-Ce6. El análisis termodinámico indicó que los puentes de hidrógeno y las interacciones de van der Waals son las fuerzas intermoleculares predominantes en el proceso de unión para estabilizar los complejos BSA-H₂T (p-COOH)PP y BSA-clorina e6. El acoplamiento molecular sugiere que el posible sitio de unión de las dos especies macrocíclicas en BSA ocurre en la vecindad del residuo de Trp 134. El estudio de modelado molecular confirmó además las fuerzas de interacción determinadas experimentalmente.

Abstract

In order to use tetrapyrrolic macrocyclic species in medical applications, the interactions of bovine serum albumin (BSA) with tetrakis-para-carboxyphenyl-porphyrin (H₂T(p-COOH)) and chlorin e6 under different conditions of temperature and pH was investigated by fluorescence spectroscopy and UV-VIS absorption spectroscopy and contrasted with molecular docking study. The binding constants (K_b) values at three different temperatures were calculated using the modified Stern-Volmer equation. The enthalpy change (ΔH) and entropy change (ΔS) were determined based on the van't Hoff equation. The results of fluorescence indicate that the static quenching is the dominant process as a result of the formation of the BSA-TCPP complex. In the case of the BSA-Ce6 complex, static quenching was confirmed also. Thermodynamic analysis indicated that hydrogen bonds and van der Waals interactions were the predominant intermolecular forces in the binding process to stabilize the BSA-TCPP and BSA-Ce6 complex. Molecular docking suggests the probable binding site of the two macrocyclic species at BSA occurs in the vicinity of the residue of Trp 134.

Molecular modeling study further confirmed interactions in the binding mode obtained experimentally.

Introducción

La descripción cuantitativa de procesos biológicos es una de las principales áreas de investigación en las ciencias de la vida; tanto en fisiología, bioquímica y biología celular o molecular. Entre ellos el reconocimiento molecular, por ejemplo, entre proteínas y ligandos a través de asociaciones no covalentes tiene un papel fundamental virtualmente en todos los procesos biológicos. Un rubro de aplicación donde adquiere gran relevancia es en la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos farmacéuticos y en sus etapas posteriores enfocadas al estudio de parámetros farmacocinéticos como: la absorción o distribución endógena, esta última es mediada por proteínas plasmáticas, lo que significa que estas condicionan la población de moléculas de fármaco libres que lleguen a las células diana. La mayoría de los fármacos son transportados al sitio diana (blanco), ya sea por albúmina de suero humano (ASH) o lipoproteínas de baja densidad [1]

La ASH es una proteína multifuncional la cual presenta una extraordinaria capacidad para la unión reversible de una vasta cantidad de ligandos [2]. La capacidad de unión de ASH varía ampliamente para diversos ligandos, por ejemplo, existen hasta siete sitios de unión para ácidos grasos de cadena larga, en contraste solo existe un solo sitio de unión primario para compuestos como bilirrubinas o heminas [3]. Generalmente, las interacciones débiles originan un corto tiempo de vida o una pobre distribución, mientras que a mayor fuerza de unión decrece la concentración del fármaco libre en plasma [4]. Debido a esto, diversos estudios en este aspecto pueden proporcionar información sobre las características estructurales que determinan la efectividad terapéutica de los fármacos y estandarizar los procesos de escaneo de estos y el establecimiento de dosis límite.

En este sentido, el estudio de las interacciones no covalentes entre proteína-ligando es de carácter lapidario en el proceso de selección y formulación de nuevos agentes terapéuticos. Dichas interacciones son gobernadas por la termodinámica química, por lo que es posible determinar las fuerzas involucradas que intervienen en este proceso, es decir, mediante; la formación de puentes de Hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas y contactos hidrofóbicos principalmente [5-6]. Estas interacciones intermoleculares pueden determinarse experimentalmente por métodos espectroscópicos o por calorimetría de titulación isotérmica [7] y

computacionalmente por cálculos de energía libre o estudios de acoplamiento molecular del cual se hablará en detalle más adelante.

Experimentalmente existen una gran variedad de técnicas como: la cristalografía de rayos-X, resonancia magnética nuclear, NMR, rayos-X de bajo ángulo [8-9], o preferencialmente calorimetría de titulación isotérmica etc. que pueden ser usadas para investigar diversos aspectos de la interacción proteína-ligando [10]. Una de las técnicas experimentales más reportadas en el estudio de interacciones en sistemas bioquímicos se base en el apagamiento de fluorescencia, que se presenta en la proteína cuando el ligando (ya sea una molécula pequeña u otra proteína) interaccionan [11]. Los datos así obtenidos pueden tratarse con diferentes modelos experimentales; como el de Stern-Volmer, Scatchard [12-13], entre otros, para determinar la constante de unión K_u , y a partir de esta, determinar los distintos parámetros termodinámicos ΔH_u y ΔS_u involucrados en dicho proceso, usualmente empleando el método de van Hoff [14].

Así mismo, las técnicas experimentales en concomitancia con las herramientas computacionales como el acoplamiento molecular nos proveen un mejor panorama de estudio en todos los procesos inherentes a la interacción intermolecular en sistemas proteína-ligando [15]. En este trabajo se estudió la interacción de albumina de suero bovino BSA y dos macrociclos tetrapirrólicos estructuralmente relacionados, un derivado de tetrafenil porfirina: tetracarboxifenilporfirina y un derivado de clorofila *clorina e6*, ambas especies con grupos carboxilo periféricos. Los estudios se realizaron por espectroscopia UV-Vis y fluorescencia, así mismo se llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular para ambos sistemas de estudio.

Capítulo I: Antecedentes

1.1 Macrociclos Tetrapirrólicos

Los macrociclos tetrapirrólicos son una familia de moléculas de enorme relevancia para la existencia de la vida, entre ellas destacan el grupo *hemo* de la hemoglobina, los citocromos, las clorofilas y bacterioclorofilas y la Vitamina B₁₂. Cuando se elucidó la estructura de este tipo de moléculas a principios del siglo pasado se descubrió que su estructura se conforma de cuatro anillos de pirról formando un macrociclo, generalmente plano y con un sistema aromático muy extenso. A este grupo pertenecen las anteriores especies más toda una gama de moléculas muy importantes que pueden ser enteramente sintéticas, como las ftalocianinas, naftalocianinas y terabenzóporfirinas entre mucha otras [17].

1.1.1 Porfirinas

Las porfirinas deben de ser una de las estructuras químicas más relevantes; que, junto con los aminoácidos, nucleótidos, lípidos y carbohidratos forman un grupo de moléculas que podrían considerarse pilares de la vida. Pero su importancia no solo recae en los sistemas biológicos, hoy en día han sido pocas las áreas de interés científico donde no se haya investigado el extraordinario potencial de estos compuestos. La gran aplicabilidad de las porfirinas se debe principalmente a su estructura química y en gran medida a los vastos patrones de sustitución del núcleo macrocíclico (figura 1.1) que permiten el diseño de una gran cantidad de derivados que pueden ir enfocados a un área de interés en particular.

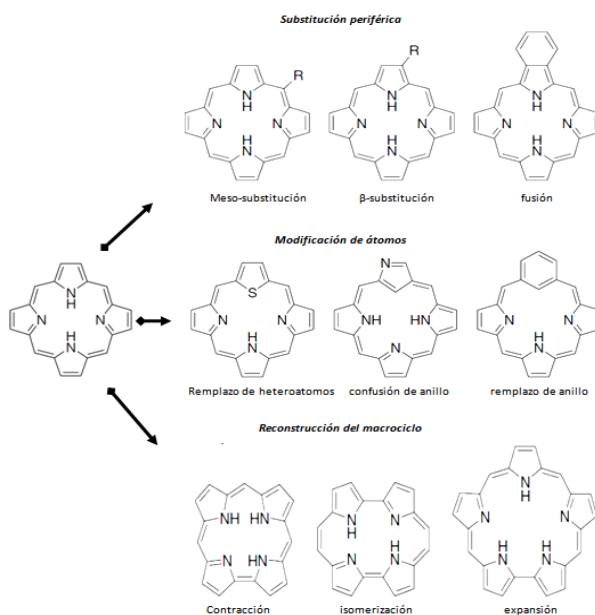


Figura 1.1 Estructura del núcleo de porfirina, patrones de sustitución y principales análogos.

Químicamente las porfirinas son moléculas ligantes tetradentadas, constituidas por cuatro anillos de pirrol unidos mediante puentes metino (figura 1.2) [18]. Las porfirinas son compuestos macrocíclicos tetrapirrólicos aromáticos en los cuales 18 de los 22 electrones π intervienen en la deslocalización del anillo porfirico, esta característica es responsable de sus particulares propiedades ópticas y espectroscópicas [17-18]. El espectro de absorción de las porfirinas comunes es caracterizado por la presencia de una fuerte banda de absorción en la región UV-visible cercana, conocida como banda de Soret que aparece entre 400 y 430 nm. Esta es acompañada por un conjunto de bandas llamadas Q de más baja intensidad, las cuales aparecen en el intervalo de los 500 a 700 nm y son responsables de sus colores distintivos.

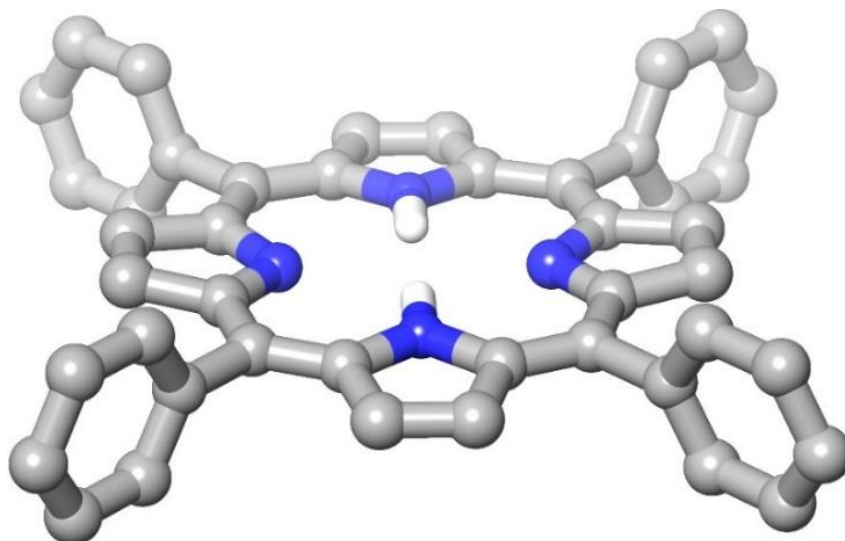


Figura 1.2. Estructura tridimensional de tetrafenilporfirina H_2TPP , se observa la planaridad del núcleo porfirínico

El núcleo porfirínico (figura 1.3) provee un sitio vacante para la incorporación o coordinación con metales. Con muy pocas excepciones el dianión porfirinato (figura 1.3b) actúa como un ligante tetradentado para iones metálicos. De esta manera, la mayoría de los metales que se coordinan con porfirinas forman complejos con estequiometría 1:1, aunque el Na, K y Li forman complejos 2:1 en el cual el átomo metálico está incorporado ligeramente por debajo y encima del plano del macrociclo porfirínico. Así mismo se pueden generar complejos de estequiometría 1:2, o tipo sándwich con los cationes de mayor radio iónico con algunos actínidos [19]. Las metaloporfirinas en asociación con proteínas globulares realizan varias de las funciones vitales en los organismos vivos,

por ejemplo, en el transporte de oxígeno a la sangre y a los tejidos [20] también se encuentran en otras estructuras de igual importancia biológica como: en las clorofilas, citocromos y vitamina

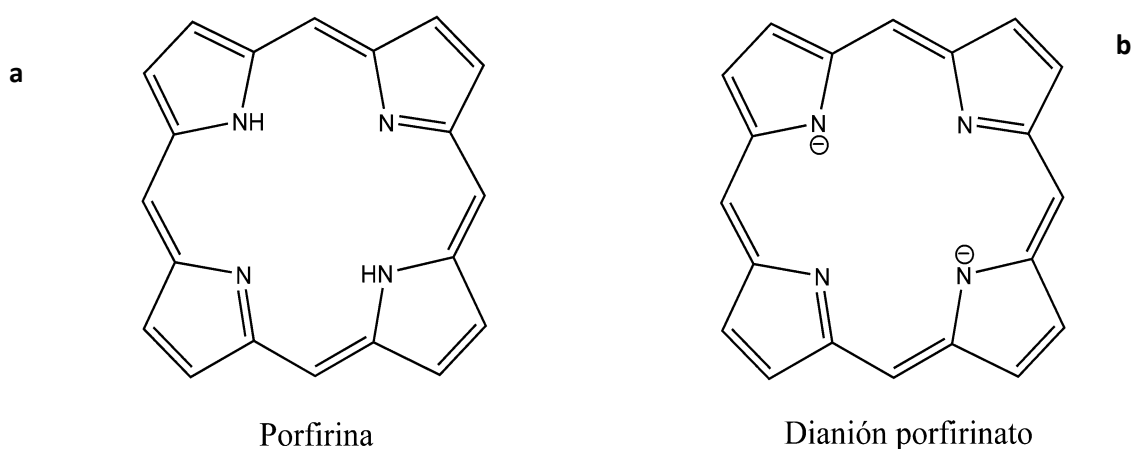


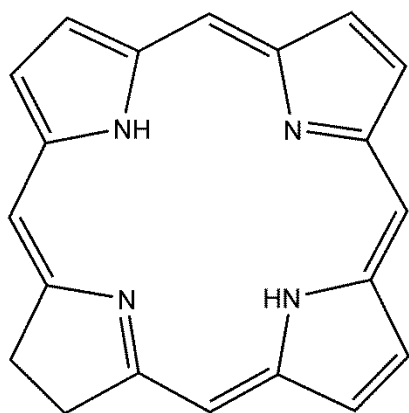
Figura 1.3. A) Núcleo porfirinico y b) dianión porfirinato

La modificación controlada o específica del núcleo básico de una porfirina (figura 1.3), la cual mantenga esencialmente sus características de aromaticidad puede resultar en el diseño de muchos sistemas con propiedades espectroscópicas muy interesantes [18]. Por ejemplo, porfirinas con sustituyentes hidrofílicos son diseñadas para mejorar la solubilidad en medios acuosos y permeabilidad en membrana para aplicaciones en medicina. Las porfirinas que se usan para el diseño de celdas solares requieren puentes donadores o aceptores en ciertas posiciones del núcleo macrocíclico. Para estudios de energía y transferencia de carga, los oligómeros de porfirinas con adecuados gradientes de potencial son requeridos para tal efecto [19]. En las recientes décadas, ha habido un gran auge en la síntesis y estudio de las propiedades de análogos estructurales de porfirinas como: porfirinas expandidas, contraídas e isoméricas, debido a que estos cambios o modificaciones estructurales modulan de forma importante sus propiedades ópticas, redox y de coordinación [21-23].

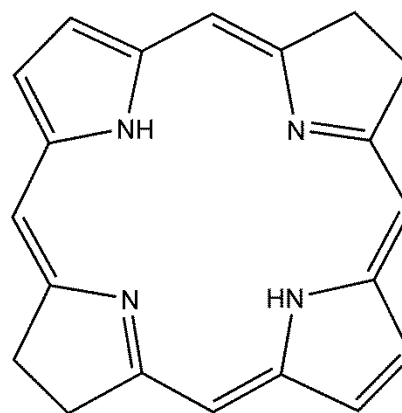
En investigación médica especialmente en terapia fotodinámica (TFD), el uso de porfirinas se ha enfocado principalmente en el desarrollo de agentes fotosensibilizadores (FSs), en ese sentido el diseño molecular de porfirinas se ha encauzado a incrementar su solubilidad en agua y la permeabilidad en membrana mediante la incorporación de grupos funcionales ionizables principalmente catiónicos, así como en mejorar la selectividad hacia células cancerígenas en comparación a los FSs más prometedores [24].

Las porfirinas y las ftalocianinas son los fotosensibilizadores más eficientes y comunes que se emplean en estudios de TFD, esto es debido a que estas moléculas poseen características intrínsecas muy importantes como; fuerte absorción en la región visible del espectro electromagnético, largos tiempos de vida en el estado triplete-excitado y una eficiente fototoxicidad hacia células cancerígenas. La TFD también se ha aplicado a enfermedades no oncológicas; como en el tratamiento para la degeneración macular asociado a la edad, crecimiento del cabello, acné o psoriasis. La TFD tiene varias ventajas en comparación a la terapia convencional, es decir que el tratamiento es selectivo dado que solo se trata una zona específica vía irradiación de luz, es un tratamiento no invasivo para aquellos tumores que pueden ser irradiados, de bajo costo y tienen mínimos efectos adversos [25].

Desde hace un par de décadas las porfirinas han sido objeto de estudio como agentes fotosensibilizadores (Ft) para su empleo en terapia fotodinámica (TFD). Los fotosensibilizadores son moléculas que pueden transferir su energía desde un estado excitado triplete a moléculas circunvecinas de Oxígeno molecular, cuando son activados por luz de una longitud de onda específica (entre los 650 a 700 nm) [26]. La transferencia de energía subsecuente coadyuva a la formación de Oxígeno singulete ($^1O^2$) y otras especies reactivas de Oxígeno citotóxico que permiten la degradación de células cancerígenas mediante apoptosis o necrosis. Idealmente, se espera que un fotosensibilizador tenga la característica de acumularse en el tejido tumoral y de manera rápida removerse del tejido normal o sano [27-28]. En la figura 1.4 se muestran dos de los principales derivados de porfirinas empleados en el ámbito de la TFD.



Clorina



Bactereoclorina

Figura 1.4. Estructura de los principales derivados de porfirinas empleados en estudios relacionados a la TFD

Recientemente se ha demostrado que la presencia de halógenos en algunas porfirinas, modulan sus propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas, lo cual mejora su efectividad en TFD y además se han empleado como agentes de contraste en la fotodetección del cáncer [28-29]. El uso de compuestos de origen natural como hematoporfirinas y clorofilas [30-31], ha permeado un gran interés en aplicaciones vinculadas a la terapia fotodinámica, sin embargo, su uso se ha visto muy limitado debido a que, por ejemplo, las clorofilas son insolubles en agua y además muy inestables ya que presentan degradación oxidativa en presencia de luz, ácidos, bases, alcoholes y desmetilación por ácidos. Por tal motivo, su formulación farmacéutica se ve muy restringida, sin embargo, el núcleo porfirínico de las clorofilas puede proveer una estructura base promisoría para la construcción de nuevas moléculas con mayor estabilidad. En esa instancia tales modificaciones no deben alterar el sistema resonante de electrones, el cual es responsable del espectro visible tan característico que presentan estas moléculas. Algunos de los derivados de clorofila que han sido estudiados para este propósito son; *Chlide a*, *Pheide a*, *Feofinita*, *feoforfida* y *bacterioclorofilas* [32].

Es bien conocido [33] que la mayoría de los fotosensibilizadores basados en estructuras porfirínicas adolecen de ciertas propiedades importantes que condicionan su uso en medicina como son; su pobre solubilidad en agua, biodisponibilidad, biodistribución y especificidad a las células blanco. En ese sentido, en la actualidad se han propuesto una gran cantidad de técnicas que permiten mejorar alguna de estas características. Por ejemplo, se han hecho algunas propuestas que han tenido éxito formando complejos de porfirinas con liposomas, ciclodextrinas, dendrimeros entre otros.

1.2 Bioconjugados

Recientemente se han propuesto bioconjugados (unión covalente entre una porfirina y una biomolécula, especialmente proteínas) figura 1.5 de porfirinas sobre todo con anticuerpos que han permitido incrementar sus aplicaciones en medicina, por ejemplo, en la construcción de agentes altamente selectivos para imagenología, para la detección del cáncer y en el monitoreo de la distribución de una biomolécula *in vivo* [25]. En el caso de TFD en la exploración de técnicas que aumentan de forma sustancial la selectividad hacia células tumorales y sistemas de acarreo endógeno. Muchos de los bioconjugados reportados involucran derivados de porfirinas que están basados en estructuras de origen natural; como hematoporfirinas, clorinas, bacterioclorinas. Entre otras muchas porfirinas, las especies coordinadas con Fe [24], Sn [25], Indio-111 [26] han mostrado buenos resultados en pruebas con distintos tipos de cáncer.

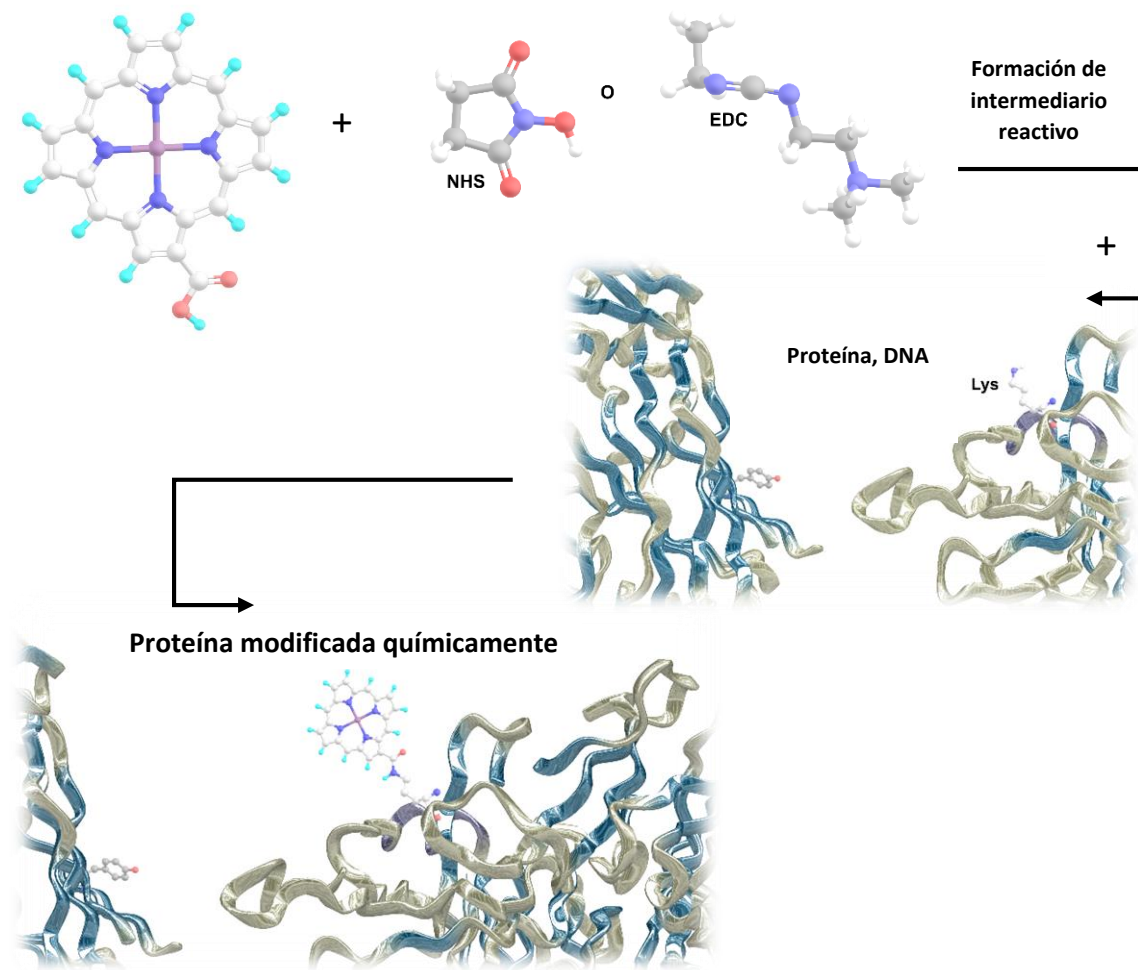


Figura 1.5. Esquema básico de bioconjugación con los reactivos EDC o NHS

1.3 Uso de nanoestructuras

Otra de las estrategias que se puede mencionar es; el uso de nanopartículas inorgánicas; en el cual los fotosensibilizadores se pueden encapsular, dispersar por medio de diferentes interacciones intermoleculares (por ejemplo, electrostáticas) o funcionalizar la superficie de las nanopartículas para la unión covalente con las moléculas de interés [34-35]. Este tipo de técnicas permiten mejorar la dispersibilidad de los Ft en medios acuosos y, por lo tanto, la factibilidad de generar una mayor población de moléculas de fotosensibilizador que llegan a las células diana. Entre las diferentes nanopartículas, se encuentran los compuestos de sílice, especialmente las de SBA-15, que además ha sido utilizado para encapsular compuestos insolubles en agua, tales como fármacos y pigmentos orgánicos para imagenología, y como sistemas de liberación controlada [36]. De uso extendido también se encuentran las nanopartículas de óxidos de Hierro [37], Oro y Plata [38]. En

este rubro, la encapsulación de porfirinas principalmente de tipo apolares en nanopartículas de liposomas ha sido una estrategia muy conveniente para mejorar la biodistribución de estas moléculas [39-41].

1.4 Clorofilas y derivados

Probablemente uno de los sistemas bioinorgánicos más relevantes son aquellos que contienen iones metálicos y ligantes porfirínicos. Por ejemplo, el sistema tetrapirrólico en la clorofila es un derivado de porfirina. La estructura base de la molécula de clorofila es un núcleo porfirínico, que consta de cuatro anillos de pirrol coordinado con un átomo de Magnesio Mg^{2+} y fusionado con un anillo de cinco miembros en los carbonos 5 y 6 de dicho núcleo (figura 1.6).

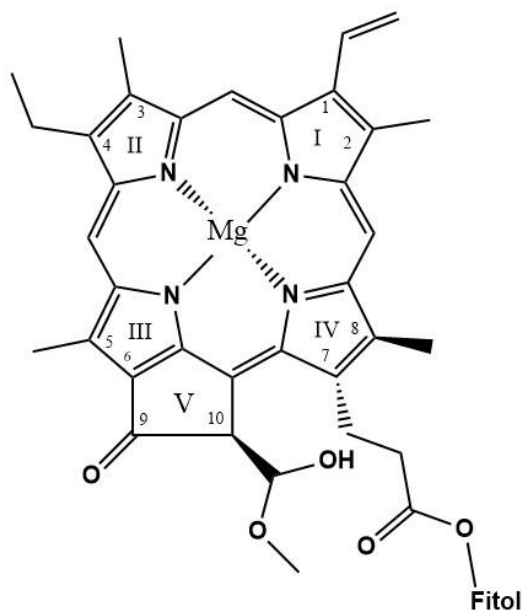


Figura 1.6. Estructura base y patrón de numeración de la clorofila α

Las clorofilas son una clase de compuestos que se encuentran en gran abundancia en la naturaleza, que en concomitancia con otros pigmentos como los carotenos y bacterioclorofilas son las estructuras principales que intervienen en los procesos de la fotosíntesis [42-43]. Las clorofilas absorben luz roja de baja energía (~ 700 nm) y la frecuencia exacta depende de los sustituyentes presentes en dicha molécula. La fotosíntesis emplea diferentes clorofilas para absorber de manera eficiente la luz solar y posteriormente llevar a cabo las subsecuentes reacciones fotoquímicas [44]. En las plantas verdes existen dos sistemas fotosintéticos. Los dos difieren en el tipo de clorofila que está presente y de las especies coadyuvantes que procesan la energía captada del fotón. Dicha absorción tiene dos funciones:

- 1) La energía puede pasar a través del sistema clorofílico y ser utilizada en la fotosíntesis.
- 2) Puede proteger el sistema biológico de ser dañado fotoquímicamente [45].

Finalmente, la energía luminosa absorbida por el complejo fotosintético es convertirla en “energía química”, mediante la formación de compuestos útiles como fuentes de energía (carbohidratos)

Las clorofilas tienen altos coeficientes de absorción molar. En general presentan dos bandas principales de absorción: una banda Q en la zona roja del espectro electromagnético que dependiendo del tipo de clorofila se observa en el intervalo de los 626-706 nm y una banda de Soret en el intervalo de los 406-578 nm. La remoción del átomo de Magnesio en el núcleo tetrapirrólico resulta en un derivado; *feofitina* (Pheo), el cual presenta un carácter aún más hidrofóbico que su precursor. Los complejos de porfirina con cationes divalentes como Zn^{2+} y Cu^{2+} , son conocidas como clorofilas transmetaladas, las cuales presentan gran estabilidad: tanto en medio ácido, así como a fotoestabilidad comparados a la clorofila original de Magnesio. Los derivados de la clorofila, sin los grupos éster o sin el grupo *fitol* y sin el átomo de Magnesio se nombran clorofilidas y forbidos, respectivamente [46-48]. Se conocen 5 clases de clorofila (figura 1.7), pero comprenden un grupo de derivados de más de 50 pigmentos tetrapirrólicos con elementos estructurales y funcionales en común [49].

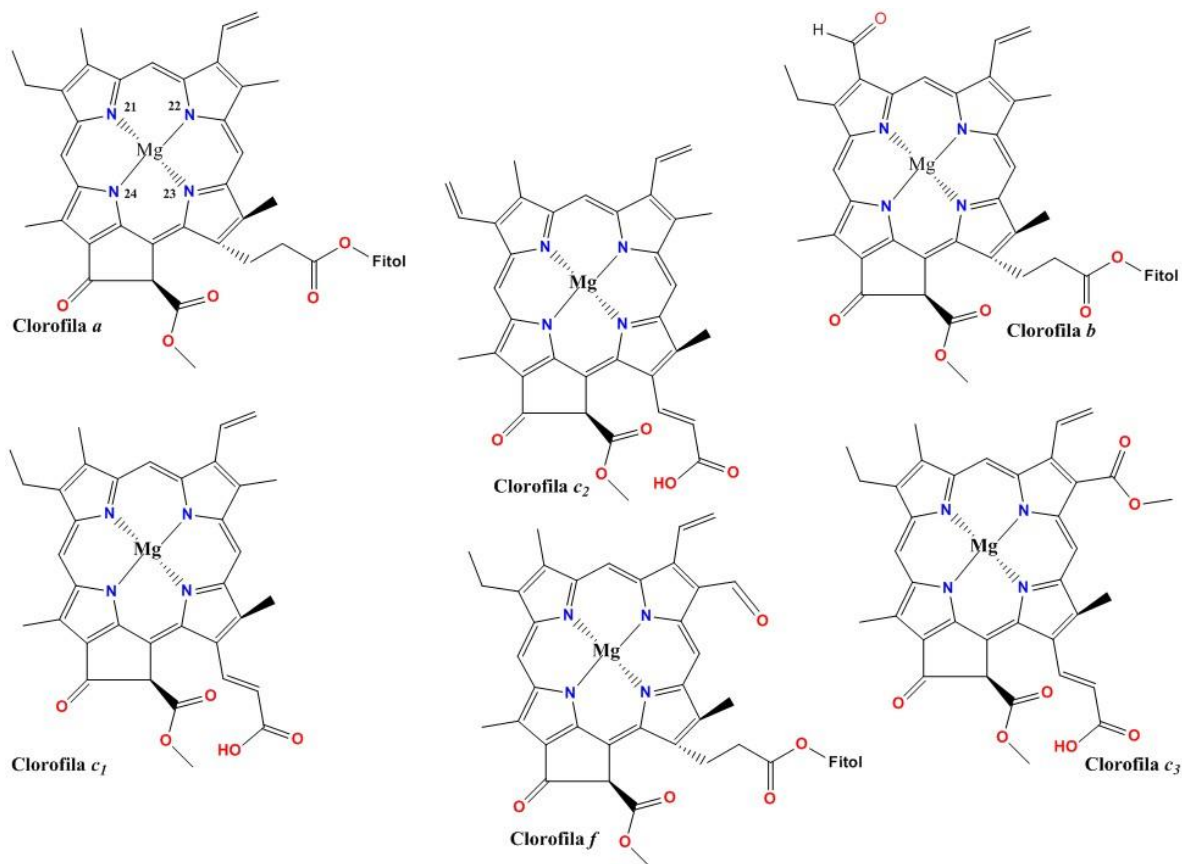


Figura 1.7. Estructura química de las diferentes clorofilas

Las cinco diferentes clorofilas muestran distintas propiedades de absorción en el Ultravioleta visible [50]. La clorofila *f* tiene una estructura similar a la clorofila *a*, con la excepción que en el carbono 2 posee un grupo *formil* en vez de un grupo *metilo*. Esta diferencia causa un cambio del máximo de absorción de la banda Q a longitudes de onda más grandes de 665 nm en clorofila *a* 707 nm en clorofila *f* [51].

Las propiedades fotoquímicas que presentan estos pigmentos naturales, han despertado el interés de varios investigadores por la extracción de estas moléculas de diferentes fuentes naturales, principalmente para el desarrollo de trabajos sobre fotosensibilización, propiedades ópticas, sensores, etc. La aplicación de estos pigmentos y sus derivados en la terapia fotodinámica TFD fue propuesta desde 1942 por Snyder, pero fue hasta 1987 que derivados de feoforbidos se plantearon y se usaron en TFD. Por tal motivo han recibido gran atención y se han propuesto como prometedores agentes para el tratamiento fotodinámico de algunas formas de cáncer y psoriasis [49]. Para tal efecto los derivados de clorofila también se han bioconjugado especialmente con anticuerpos. En la figura 1.8 se muestra la estructura química de dos de sus derivados.

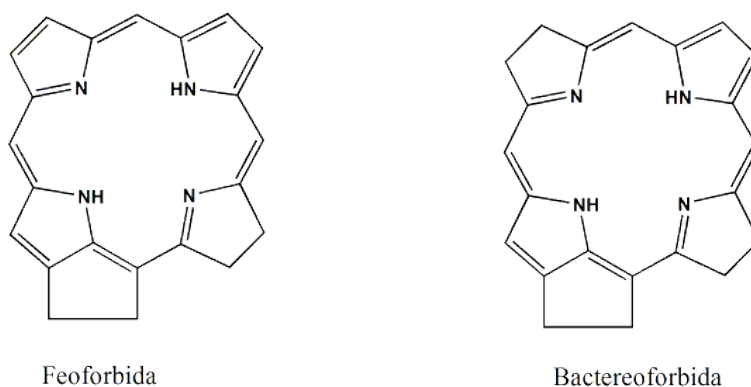


Figura 1.8. Estructura de dos de los principales sus principales derivados de clorofila estudiados en TFD.

1.4.1 Uso de derivados de clorofila o similares en TFD

El uso de compuestos de origen natural como hematoporfirinas y clorofilas, ha permeado un gran interés en aplicaciones vinculadas a la terapia fotodinámica TFD, sin embargo, su uso se ha visto muy limitado debido a que, por ejemplo, las clorofilas son insolubles en agua (La alta hidrófobicidad se debe principalmente al anillo porfirínico, además la cadena de *fitol* causa agregación en medio acuoso y por lo tanto aumenta su hidrófobicidad) y además son químicamente inestables ya que presentan degradación oxidativa en presencia de luz, ácidos, bases, alcoholes y desmetelación por ácidos [47-48]. Por tal motivo, su formulación farmacéutica se ve muy restringida, sin embargo, el núcleo porfirínico de las clorofilas puede proveer una estructura base promisoría para la construcción de nuevas moléculas con mayor estabilidad. En esa instancia tales modificaciones no deben alterar el sistema resonante de electrones π , el cual es responsable del espectro visible tan característico que presentan estas moléculas. Algunos de los derivados de clorofila que han sido estudiados para este propósito son; *Chlide a*, *Pheide a*, *Feofinita*, *feoformida* y *bacterioclorofilas* debido principalmente a que presentan características importantes tales como altos tiempos de vida en el estado excitado y alta generación de Oxígeno singulete [52-53].

Es bien conocido que, en un amplio número de disolventes polares, la clorofila *a* esta presente como un monómero solvatado. Tras la adición de agua, esta reemplaza el disolvente alrededor del átomo de Magnesio permitiendo la formación de agregados. El número de hidratación y el estado de agregación dependen de: la cantidad de agua, la naturaleza del disolvente orgánico y la concentración del pigmento [54-55]. La agregación de clorofilas es un fenómeno bien documentado y ha sido estudiada en una gran diversidad de mezclas: disolventes orgánicos y agua,

en medios no polares, en la presencia de polímeros solubles en agua, tales como alcohol polivinílico y películas poliméricas. También se ha estudiado el estado de agregación en complejos con proteínas ya que se ha visto exhiben cambios espectrales debido a este fenómeno [55]. Cambios que afectan de manera importante sus propiedades de fotosensibilización.

Los tensoactivos son de uso frecuente para estabilizar moléculas hidrofóbicas en medio acuoso. En aplicaciones clínicas y farmacéuticas los tensoactivos poliméricos neutros como el *Tween 80* o *Pluronic* son usados ampliamente debido a su baja toxicidad. Por ejemplo, la forma de la clorofila dihidratada (agregada) a la monohidratada (monómero) es rápidamente revertida por la adición de triton x-100, inclusive en concentraciones bajas del tensoactivo, por debajo de la concentración micelar crítica. El uso de ciclodextrinas se ha empleado también para mejorar la solubilidad de las clorofilas hidrofóbicas vía la formación de complejos de inclusión [56-57].

1.5 Albumina de suero bovino

Debido a que en el presente proyecto de doctorado se planteó el estudio de macrociclos tetrapirrólicos con Albumina de suero bovino, se avanzó notoriamente en los experimentos realizados con derivados de clorofila *a* y tetrafenilporfirinas. En ese sentido el estudio de las interacciones entre proteínas transportadoras como albuminas y fotosensibilizadores basados en tetrafenilporfirinas o derivados naturales, son protocolos necesarios para entender y mejorar las propiedades de unión basado en el análisis de dichas interacciones.

La albumina de suero bovino BSA es la o una de las proteínas más estudiadas. Su estructura primaria fue dilucidada principalmente por Brown y colaboradores en 1974. La BSA es una proteína transportadora, compuesta por 583 aminoácidos, con estructura de α -hélice y un peso de 66 kDa. Estructuralmente se compone de nueve loops que conectan tres dominios homólogos (figura 1.9), los cuales consisten de los: dominios I (residuos 1–195), II (196–383) y III (384–585) [58-59]. Cada dominio presenta dos subdominios denominados: A y B, de esta manera las albuminas se estructuran en subdominios; IA y IB en el dominio I, subdominios IIA y IIB en el dominio II y subdominio IIIA y IIIB en el dominio III. Las regiones terminales de los dominios secuenciales contribuyen a la formación de Inter dominios conectando los subdominios IB al IIA, y IIB al IIIA respectivamente [60].

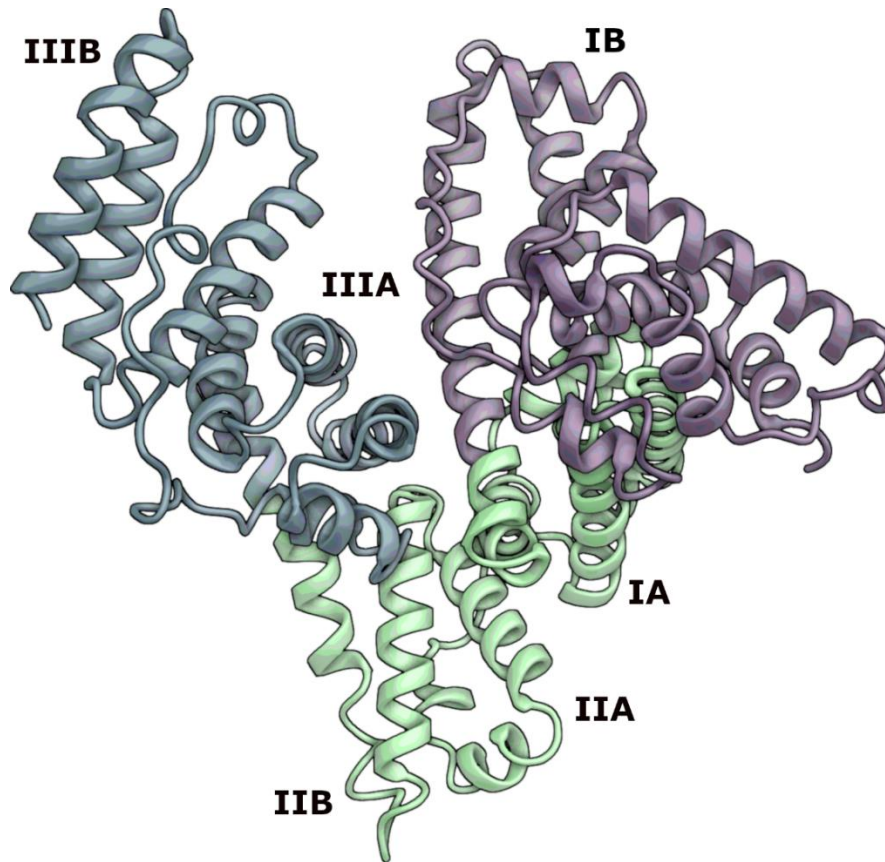


Figura 1.9. Estructura tridimensional de Albumina de suero bovino BSA, se especifican en color: los tres dominios I, II y III y la designación de los seis subdominios correspondientes

La BSA tiene 17 puentes disulfuro; a pH neutro estos puentes se encuentran en la parte interna de la proteína, por lo que no se encuentran expuestos al disolvente. Las uniones disulfuro le proveen gran rigidez, sin embargo, también le permiten una modificación significativa en la forma y tamaño de la proteína bajo diferentes condiciones externas. Por ejemplo, en función del pH la BSA presenta isomerización conformacional, intercambiando una forma compacta en forma de N a pH neutro a una forma menos compacta en forma de F a pH 4 [61]. En función del calentamiento, la forma nativa de BSA llega a ser más flexible y los residuos de *Tyr* y *Trp* se encontrarán más expuestos a ambientes polares. El desdoblamiento de BSA inducida por calentamiento en soluciones acuosas, también causa agregación. La velocidad de agregación depende de la temperatura (iguales o mayores a 60 °C), pH, concentración de proteína, tiempo de incubación y concentración de sales [62].

Unas de las características de BSA y en general de las albuminas de mamíferos es su bajo contenido en *triptófano* (*Trp*), que tan solo están presentes entre uno a dos residuos por proteína.

De igual manera, también es bajo el contenido de metionina (*Met*), así como de glicina e isoleucina. En cambio, los residuos de cisteína, leucina y aminoácidos polares como: ácido glutámico, lisina son abundantes. El gran número de residuos ionizables le confiere una alta carga neta a las albuminas, por lo regular están presentes 187 residuos ionizables a pH 7, lo cual es la razón principal de su alta solubilidad. Sin embargo, los residuos ácidos superan a los básicos y, por lo tanto, la BSA tiene una carga neta negativa de entre -12 a -17 a pH 7 [63].

En general las albuminas son capaces de transportar una gran diversidad de compuestos endógenos, tales como ácidos grasos, hormonas, ácidos biliares, aminoácidos, vitaminas, metales, etc. De esta forma la BSA facilita la transferencia y distribución de nutrientes esenciales y además provee protección al secuestrar metabolitos tóxicos para el organismo. La BSA también posee la extraordinaria capacidad de unir y transportar una vasta cantidad de fármacos hacia los tejidos u órganos diana. Las albuminas poseen dominios estructurales muy similares y cada uno de estos dominios presentan diferentes propiedades de unión a ligandos [64]. La BSA posee seis sitios de unión a ligandos (I-VI), distribuidos a lo largo de toda la biomolécula, sin embargo, son dos los sitios hidrofóbicos responsables de la fijación de la gran mayoría de estos. Ambos son conocidos como sitio I y sitio II (figura 1.10), los cuales se localizan en el subdominio IIA y IIIA

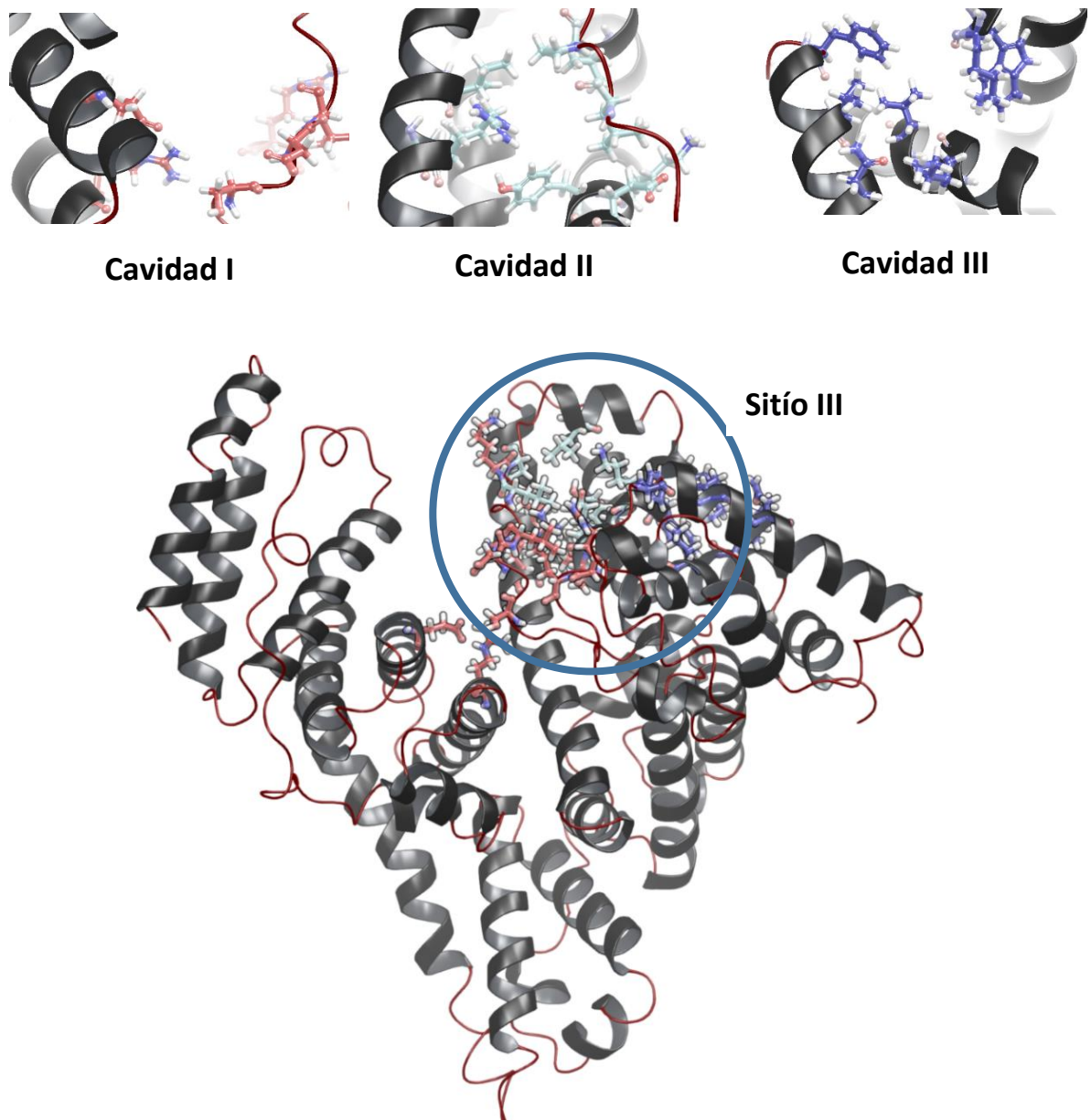


Figura 1.10. Cavidades cercanas al sitio III de BSA

Cada una de las cavidades de la BSA mostradas en la Figura 1.10, se componen de una serie de residuos que son importantes para que se establezca la unión a ligandos. Los residuos correspondientes a la cavidad 1 son *Lys 20, Leu 24, Phe 36, Asp 37, Val 40, Asn 44, Lys 131, y Trp 133*. La cavidad 2 está conformada por *Leu 115, Pro 117, Leu 122, Lys 136, Tyr 137, Glu 140, Ile 141, Tyr 160, Ile 181, Met 184, Arg 185 y Val 188*. Finalmente, la cavidad 3 la forman los residuos *Ser 109, Asp 111, Leu 112, Leu 115, Lys 116, Ile 141, Arg 144, His 145, Glu 424 y Arg 458* [65].

En particular el sitio I, es una cavidad grande e hidrofóbica que puede albergar varios fármacos al mismo tiempo. Este sitio es predominantemente apolar y está formado por una cadena

hidrofóbica que contiene dos ramificaciones de residuos polares; la primera en la parte interna de la cavidad, donde se encuentran los residuos de *Tyr 150*, *His 242*, *Arg 257* y la otra en la parte externa cerca de la apertura de la cavidad, en donde están presentes los residuos: *Arg 222*, *Arg 218*, *Lys 199* y *Lys 195* [66]. Se conoce bastante bien que el Sitio I permite fijar ligandos heterocíclicos voluminosos y aniónicos, por ejemplo, moléculas como Warfarina. El sitio II corresponde a una cavidad dentro del subdominio IIA, donde se fijan índoles-benzodiazepinas. Esta cavidad está rodeada por cadenas laterales hidrofóbicas. Los ligandos que se unen al sitio II, son fármacos con grupos carboxílicos aromáticos cargados negativamente, tales como ibuprofeno, ácido flufenámico, diflunisal y diazepam.

La BSA se utiliza como una biomolécula sonda para estudiar las interacciones fármaco-receptor, ya que esta comparte 76% de homología estructural con HSA. La BSA contiene dos residuos de Trp, uno ellos localizado en el subdominio IIA Trp-213 y el otro en el subdominio IA Trp 134 que se emplean como sondas para monitorear o investigar las interacciones con fármacos, ya que son los principales residuos que le confieren emisión de fluorescencia a la BSA [66].

Las albuminas son sintetizadas y secretadas en el hígado, en donde se produce a velocidades de 0.7 mg/h, alrededor de 10 a 15 g diarios. Por lo cual, representan del 55 al 60% del total de las proteínas séricas. Las albuminas no son almacenadas en el hígado, así tan pronto como son sintetizadas se liberan al torrente sanguíneo y sorprendentemente tienen un tiempo de vida media en humanos de entre 19 a 21 días. Además de su función de multi-transportador de ligandos tanto endógenos como exógenos, las albuminas tienen otras funciones fisiológicas, entre ellas: mantener la presión osmótica de la sangre, es un importante antioxidante y posee propiedades enzimáticas, además de que es una biomolécula relevante en estudios atinentes al desdoblamiento de proteínas [67-68].

Debido a que la BSA es un transportador natural de ligandos hidrofóbicos y aniónicos, aunado a la ventaja de esta proteína de no ser eliminada o degradada por el organismo, hacen de la BSA una proteína sonda para estudiar el transporte de una vasta diversidad de moléculas exógenas, por lo cual se propone en este proyecto el estudio de la interacción por métodos espectroscópicos de los sistemas BSA-macrocielos terrapirrólicos, junto con la incorporación de estudios *in silico* de acoplamiento molecular: rígido y flexible para en dado caso que se exista interacción, comprender a mayor detalle la **naturaleza** de las interacciones presentes en los sistemas propuestos.

1.6 Acoplamiento molecular

El campo del acoplamiento molecular ha tenido un auge importante durante las últimas tres décadas [69] debido al advenimiento de la biología estructural molecular y el descubrimiento de fármacos a base de su estructura. Su crecimiento ha sido facilitado por los avances en el poder de cómputo y al gran crecimiento y accesibilidad de encontrar estructuras de pequeñas moléculas y proteínas en bases de datos.

El acoplamiento molecular, es un procedimiento computacional (figura 1.11) que intenta predecir las interacciones no covalentes, de macromoléculas (proteína-proteína) o más frecuentemente de proteínas (receptores) y pequeñas moléculas (ligandos), partiendo de sus estructuras libres [70]. El objetivo primigenio es entender y predecir las posibles interacciones intermoleculares entre dos moléculas, tanto a nivel estructural; esto es, encontrando los modos de unión más probables, así como energéticamente prediciendo la afinidad de unión [71]

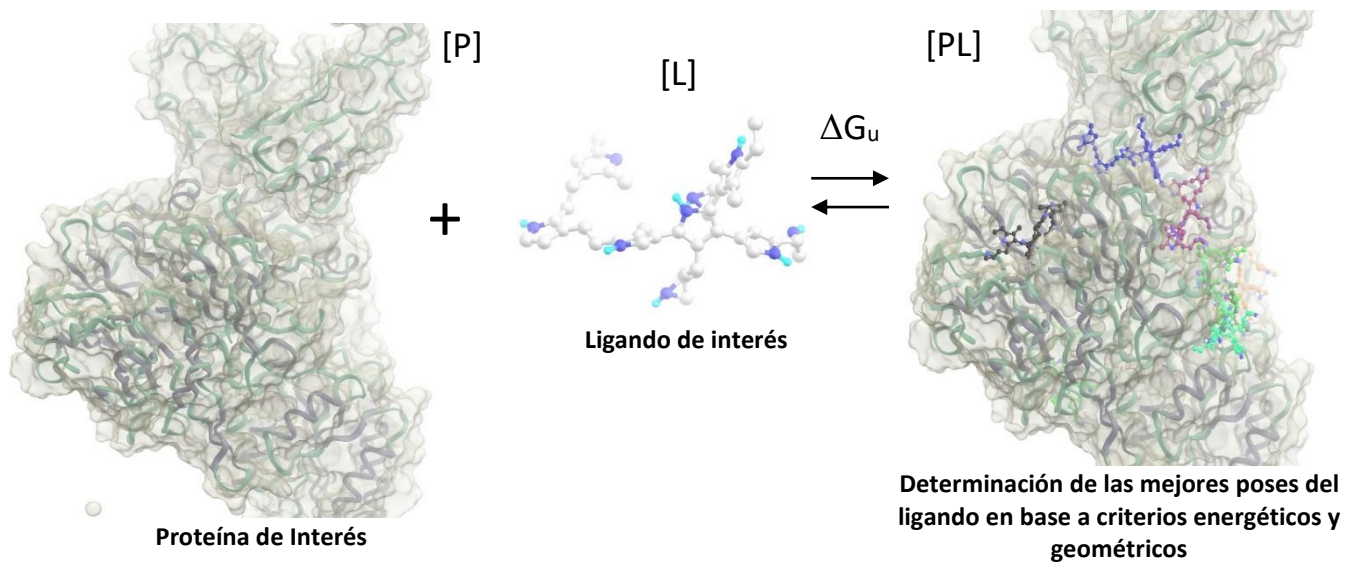


Figura 1.11. Esquema básico del acoplamiento molecular proteína-ligando

Los programas que realizan el acoplamiento generalmente usan funciones de simulación o puntaje [72]. Estas funciones están basadas en métodos de mecánica molecular que, a diferencia de los métodos cuánticos, se basa en un modelo mecano clásico de la estructura molecular. En este modelo, las moléculas son tratadas como un conjunto de átomos en el espacio, unidos entre sí mediante enlaces, gobernadas por un conjunto de potenciales mecano-clásicos. Como consecuencia directa del modelo anterior, la energía total de una molécula se obtiene como la suma de una serie

de contribuciones o términos perfectamente definidos que dependen de las coordenadas espaciales de los núcleos. Los términos que componen la función energía pueden ser agrupados en [73-74]:

* Términos de valencia: asociados a movimientos de tensión, flexión, torsión y flexión fuera del plano. Son términos que dependen de los enlaces covalentes

* Términos de no valencia: son los términos que reflejan las interacciones a larga distancia entre átomos no enlazados. Engloban las interacciones de van der Waals y las interacciones electrostáticas.

* Términos cruzados: estos términos aparecen al considerar que los enlaces, ángulos de enlace y diedros en una molécula, no están aislados, sino que pueden estar influenciados por los átomos y grupos químicos vecinos

Hipotesis: Es posible obtener sistemas estables a base de proteínas, como la Albumina de suero bovino (BSA) con macrociclos tetrapirrólicos, como las porfirinas o derivados clorofílicos acoplados y la determinación de sus propiedades espectroscópicas y termodinámicas para analizar su viabilidad para el acarreo o liberación controlada con fines médicos.

Objetivo general

Realizar un estudio de la asociación no covalente Albumina de suero bovino (BSA) con macrociclos tetrapirrólicos como las porfirinas o derivados clorofílicos

Objetivos particulares:

Realizar un estudio de la asociación no covalente Albumina de suero bovino (BSA) con macrociclos tetrapirrólicos como las porfirinas o derivados clorofílicos

Objetivos particulares:

- © Sintetizar meso-tetrafenilporfirinas sustituidas con al menos uno de los siguientes grupos funcionales: carboxilo, hidroxilo u amino, $(H_2T(p-COOH)PP)$, $(H_2T(p-OH)PP)$, $(H_2T(p-NH_2)PP)$ o derivados que sean solubles en agua o disolventes polares
- © Extraer derivados clorofinílicos como: *feofitina a* o el correspondiente *forfido*
- © Sintetizar derivados porfirinicos o clorofinílicos modificados en caso de no observarse acoplamiento adecuado.
- © Caracterización espectroscópica: UV-Visible, Infrarrojo, fluorescencia de los macrociclos tetrapirrólicos seleccionados
- © Caracterizar la interacción BSA-porfirinas por espectroscopía UV-Vis y fluorescencia
- © Determinar la constante de unión a al menos tres diferentes temperaturas y dos pHs

- © Determinar los parámetros termodinámicos de unión ΔH_u , ΔS_u , ΔG_u para el sistema BSA-porfirinas

- © Realizar una comparación de los resultados de la interacción de BSA-porfirinas

- © Análisis *in silico de* acoplamiento molecular para al menos una porfirina y BSA

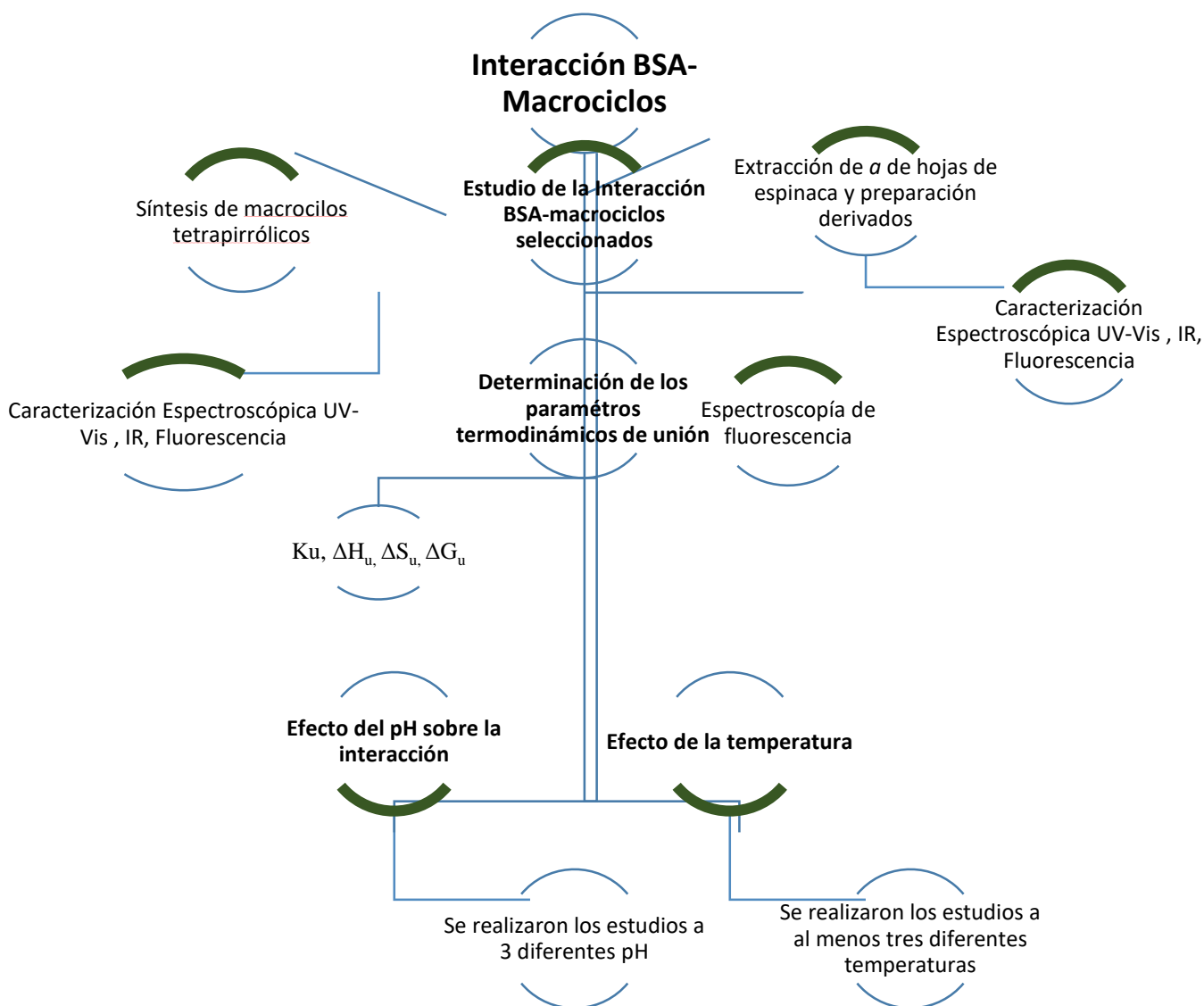
Capítulo II: Experimentación

2.1. Materiales y métodos

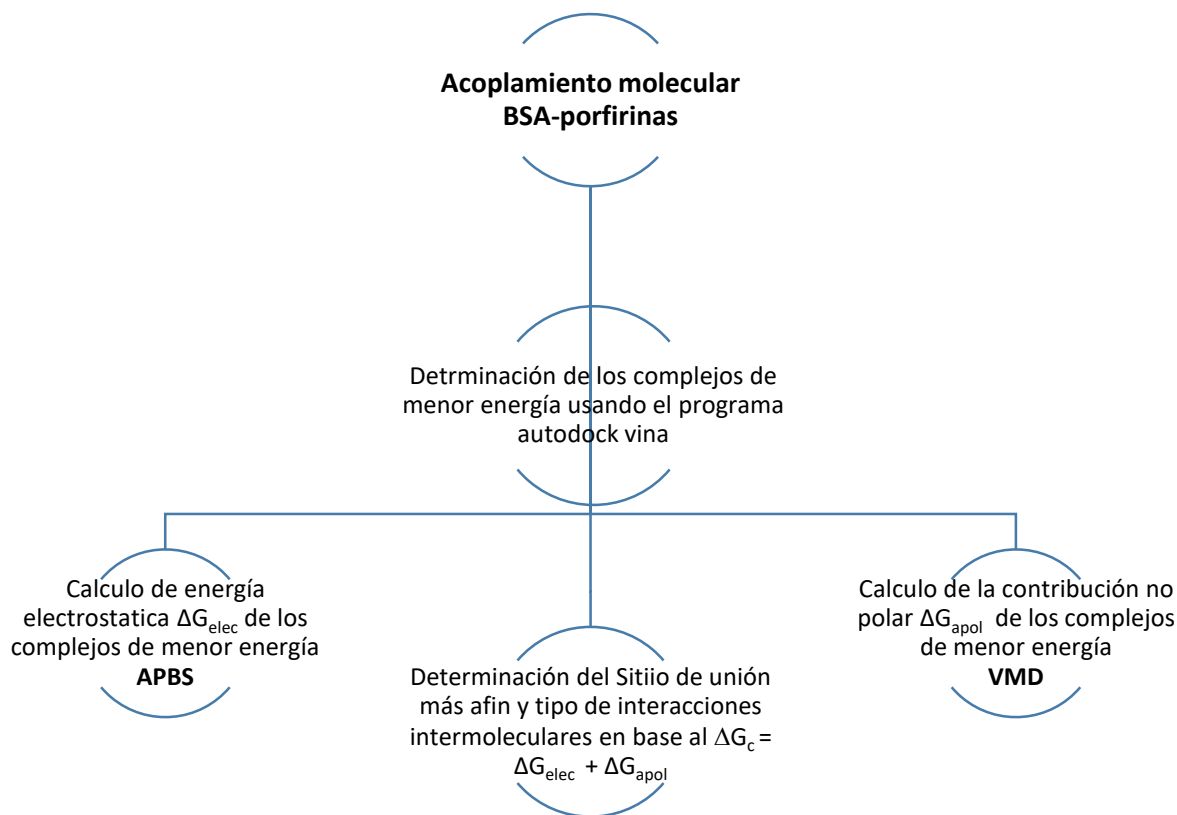
La caracterización de las especies sintetizadas o extraídas se llevó a cabo por espectroscopía UV-Vis en un espectrofotómetro Cary Varian modelo 500E en un intervalo de los 200 a 800 nm, los espectros de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro K2 de ISS equipado con un baño para el control de temperatura, en ambos casos se utilizó una celda de recorrido óptico de 1 cm, los análisis de IR se llevaron a cabo en un espectrofotómetro IR perkin Elmer con transformada de Fourie

2.1.1. Esquema desarrollo experimental

El desarrollo experimental se describe en forma general en el siguiente esquema:



2.1.2. Esquema Desarrollo computacional



2.2. Síntesis y purificación de tetra carboxiporfirina, $H_2T(p-COOH)PP$

La síntesis de tetrafenil porfirinas se llevó a cabo por el método de Adler [75]. Para la síntesis de $H_2T(p-COOH)PP$ (figura 2.1) en 80 mL de ácido propiónico, se agregaron 0.041 moles de 4-carboxibenzaldehído, 2 equivalentes de propianato de sodio y se calentó a ebullición. Posteriormente se agregaron lentamente 0.045 moles de pirrol, la mezcla se dejó en agitación constante y a reflujo manteniendo la temperatura alrededor de los $120^\circ C$. La mezcla de reacción se dejó en reposo y en refrigeración por 24 horas, posteriormente se filtró. El sólido retenido se lavó con alcohol isopropílico hasta que se observó una fracción de color purpura y el filtrado fuera menos denso, posteriormente se lavó con 150 mL de acetona o hasta que el filtrado fuera de color claro. Se recolectó el sólido y se disolvió en 100 mL de acetona y 15 mL de alcohol isopropílico, se dejó en agitación por 2 horas y finalmente se filtró, se obtuvo una cantidad pequeña de cristales de color purpura. El filtrado se puso en ultrasonido por treinta minutos y se dejó en refrigeración por 24 horas. Esta solución se filtró nuevamente y se redujo el volumen a 15 mL por destilación simple, se

observó la precipitación de cristales brillantes de color púrpura. Finalmente, los cristales se recolectaron por filtración.

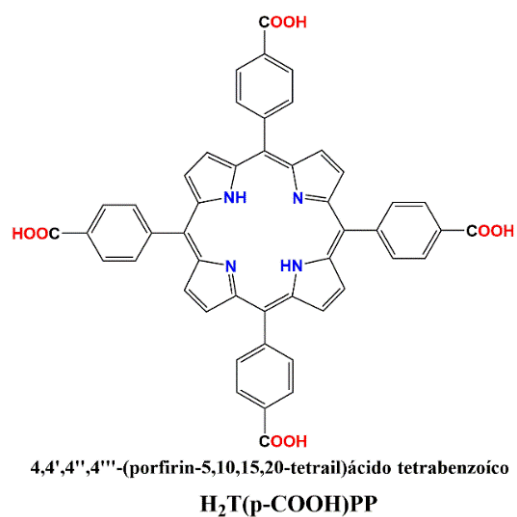


Figura 2.1. Estructura de *la meso-tetraquis para-carboxi-fenil porfirina*, H₂T(p-COOH)PP.

2.3 Síntesis y purificación de tetrahidroxi fenilporfirina H₂T(p-OH)PP

La síntesis H₂T(p-OH)PP procedió de la misma manera que en el caso de H₂T(p-COOH)PP (figura 2.2) . La mezcla de reacción se dejó en reposo y en refrigeración por 24 horas, una vez transcurrido este lapso se filtró. Al sólido retenido en el matraz, se agregaron 150 mL de diclorometano, la solución resultante es clara, pero con fuerte olor característico a ácido propiónico. La porfirina se extrajo con 250 mL de acetato de etilo, esta solución se mantuvo en agitación por dos horas. A esta solución se agregaron 150 mL de agua destilada y se dejó en agitación por 2 horas más. Posteriormente se extrajo la fase orgánica y se redujo el volumen a 25 mL por destilación simple. La solución se vertió en una columna de sílica gel regulada con etanol, la porfirina se eluyó con acetato de etilo, se recolectó la fracción púrpura. El volumen de esta solución se redujo completamente por destilación simple y el sólido con un brillo color verde se disolvió en la menor cantidad de acetona, el disolvente se evaporó en una parrilla y se observó la aparición de un sólido morado. El sólido resultante, se disolvió en la menor cantidad de acetato de etilo y se vertió en una columna de sílica gel regulada con acetona, la porfirina se eluyó con acetato de etilo. Al evaporar el disolvente se obtuvo un sólido de color púrpura.

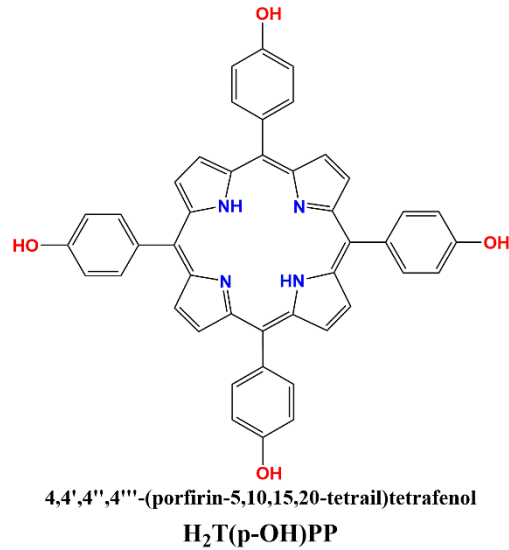


Figura 2.2. Estructura de *la meso-tetraquis para-hidroxi-fenil porfirina*, H₂T(p-OH)PP.

2.4 Extracción de clorofila a y b

La extracción de clorofila *a* se llevó a cabo por medio del método reportado por Keiji Iriyama *et al* [76], el cual consiste en la extracción de las clorofilas con acetona a partir de hojas de espinaca, seguido de la adición de un diez por ciento de dioxano conforme al volumen total del extracto. Posteriormente se agregó gota a gota agua desionizada hasta la aparición de un precipitado de color verde. El extracto se dejó en refrigeración a una temperatura menor a 4° C por 24 horas, el sólido precipitado se recolectó por filtración al vacío, el cual se disolvió en la menor cantidad de CHCl₃ y se agregó a una columna de gel de silica regulada con CHCl₃. Los carotenos se eluyen con CHCl₃ mientras las clorofilas quedan retenidas en la superficie de la columna. Estas se eluyeron con acetona y finalmente se evaporó todo el disolvente por destilación a vacío. La separación de clorofila *a*, *b* y feotfinina (figura 2.3) se realizó por columna en cromatografía de silica gel regulada con acetona y usando una mezcla eter- hexano 40:60 V/V como fase móvil.

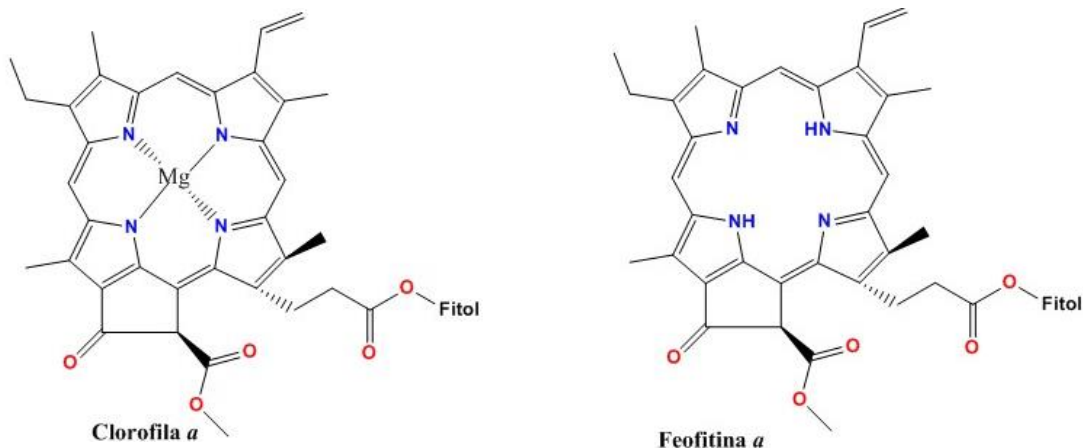


Figura 2.3. Estructura de la clorofila *a* y su derivado feofitina *a*

2.5 Preparación de clorofilina *a* y clorina *e6*

Para la preparación de clorofilina *a* (figura 2.4), es necesario extraer y purificar la clorofila *a*, ya que es el precursor para la obtención de dicho compuesto. La clorofila *a* extraída de hojas de espinacas se disolvió en 2 mL de benceno y se diluyó a 20 mL con hexano. La saponificación se lleva a cabo adicionando 1 mL de una solución de KOH en metanol al 7% (figura 2.4). La mezcla se dejó en agitación e inmediatamente se tornó a un color café pardo, después de unos minutos se observó la formación de pequeños cristales de clorofilina *a*. Los cristales se separaron por filtración y se lavaron con hexano, el sólido obtenido se disolvió en metanol anhidro y se burbujeó CO_2 durante una hora para eliminar el KOH remanente en forma de carbonato de potasio insoluble. La clorofilina *a* se separó por filtración y finalmente el metanol se evaporó por destilación simple.

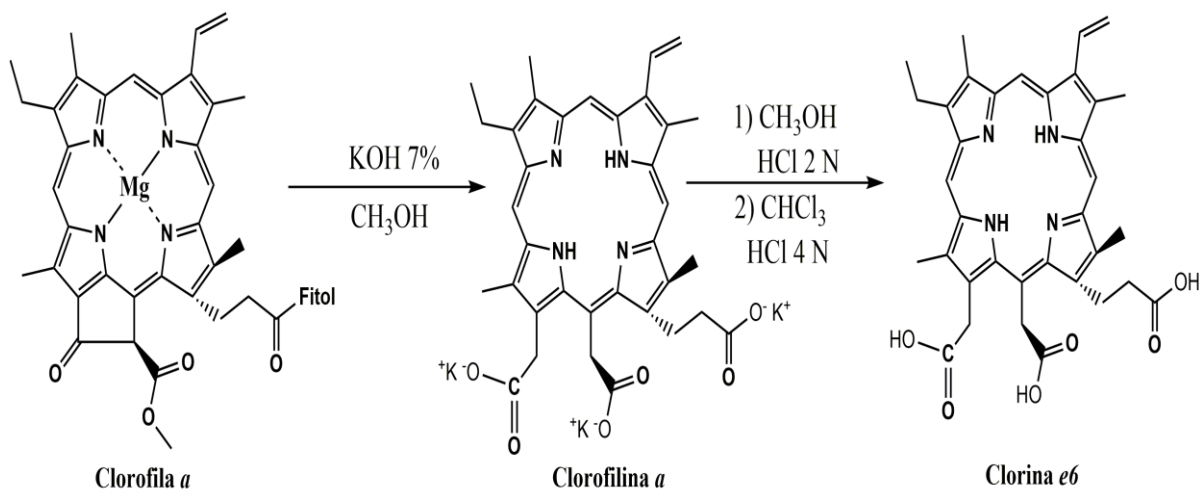


Figura 2.4. Esquema de reacción para la obtención de clorina *e6*

La clorofilina a se utilizó como precursor para la preparación de la clorina e6. Esta se disolvió en una mezcla etanol-HCl 2 N y se dejó en agitación por 4 horas. El éster de la clorofilina a se extrajo con diclorometano y el HCl remanente se neutralizó con una solución de hidróxido de amonio. Posteriormente la fase orgánica se secó con sulfato de sodio y el disolvente se evaporó por destilación simple. El sólido de color café se purificó por cromatografía en columna de sílica utilizando como eluyente metanol. El sólido obtenido se disolvió en 10 mL de CHCl₃ y se agregaron 20 mL de una solución de HCl 4 N, la mezcla se dejó en agitación por 4 horas, al finalizar este lapso se agregaron 15 mL de CHCl₃ y se mantuvo en agitación por 30 minutos más. Finalmente se evaporó el disolvente por destilación a presión reducida, obteniendo así la clorina e6.

2.6 Estudios de apagamiento de fluorescencia para el sistema

El análisis de la interacción de los sistemas BSA- H₂T(p-COOH)PP y BSA-clorina e6 por fluorescencia, se llevó a cabo titulando una solución de concentración fija de BSA 3.2 x 10⁻⁶ M con concentraciones crecientes tanto de H₂T(p-COOH)PP, así como de clorina e6 en un intervalo de concentraciones de 4.4 x 10⁻⁶ a 6.7 x 10⁻⁵ M. Los estudios de fluorescencia se realizaron por duplicado a tres temperaturas de estudio: 25, 31 y 42°C y dos diferentes pH 7 y 8.5. El monitoreo de la interacción se realizó excitando los sistemas mencionados a una longitud de onda de 295 nm y registrando los espectros correspondientes en un intervalo de 300 a 550 nm. El análisis de los datos se realizó por medio del método gráfico de Stern-Volmer [77]

Par determinar en primera instancia si solo está presente un solo tipo de apagamiento se utilizó el modelo gráfico de Stern-Volmer [78]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[L] \quad [1.3]$$

Donde F₀ es la emisión de fluorescencia de BSA libre, F es la emisión de fluorescencia en presencia de ligando (porfirina) en cada punto de la titulación, K_{SV} es la constante de Stern-Volmer y [L] es la concentración total de la clorofilina *a*. Asumiendo que el apagamiento sea de tipo estático se determina la estequiometría y la constante de unión a través de la ecuación modificada de Stern-Volmer:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_u + n \log [L] \quad [1.2]$$

Donde F_0 y F , son la emisión de fluorescencia de mioglobina en ausencia y presencia del clorofilina a respectivamente. La gráfica de $\log[F_0-F]/F$ en función de $\log [L]$, permite determinar los valores de n (número de sitios de unión) a partir de la pendiente y de K_u de la ordenada al origen ecuación.

Para establecer la naturaleza de las interacciones presentes en los sistemas de estudio, se determinaron mediante el modelo de Van hoff los valores del cambio de entalpia ΔH y el cambio de entropía ΔS de unión respecto a la dependencia de la temperatura sobre la constante de unión [79]. La siguiente ecuación fue empleada para dicho propósito

$$\ln K_u = -\frac{\Delta H_u}{RT} + \frac{\Delta S_u}{R} \quad [1.3]$$

En donde K_u es la constante de unión a la temperatura T , y R es la constante universal de los gases. Los valores de ΔH_u y ΔS_u se calculan respectivamente a partir de la pendiente y la ordenada al origen de la representación gráfica del $\ln K_u$ frente a $1/T$.

2.7 Estudios *in silico*

Para entender las posibles interacciones intermoleculares en los sistemas BSA-macrociclos tetrapirrólicos, se llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular o docking rígido implementados en el software *Autodock Vina* [16]. Para los análisis *in silico*, se partió de la estructura cristalográfica de la BSA ID 3VO3.pdb, la cual se obtuvo del Protein Data Bank (según fuera necesario, se eliminaron todas las moléculas de agua y ligandos cocrystalizados y se agregaron átomos de hidrógeno polares seguido del cálculo de las cargas de Gasteiger) con el software *Autodock tools*. Las estructuras tridimensionales optimizadas de $H_2T(p-COOH)PP$ y clorina e6, se obtuvieron con el programa *Gaussian 9.0* [80] utilizando funcionales de la densidad a nivel 6-31G(d) con funcionales híbridos B3LYP.

Para analizar toda la superficie de BSA Se generó una caja 3D con un espaciado de cuadrícula de 1 Å y un tamaño de 84 x 76 x 81 Å en las direcciones x, y y z,. El sitio de unión III de la BSA se monitoreo, utilizando una caja con cuadrícula de espaciado de 0.4 Å y tamaño de 35 x 23 x 30 Å, centrado en las coordenadas 37,9, 36,4 y 42,5. Además, se consideró que, a pH 7, los grupos

carboxilo de las especies TCPP y Ce6 se encuentran en estado neutro y a pH de 8.5, estos grupos se encuentran disociados en la forma COO^- . Todas las rotaciones de enlace de ambos macrociclos se consideraron como libres.

Para cada sistema propuesto, se realizaron cincuenta análisis de acoplamiento rígido con una población de 100 poses cada una. Se eligió la pose de menor afinidad arrojada por el programa *Autodock Vina*. El acoplamiento molecular flexible se realizó considerando el sitio de unión más afín encontrado por los estudios de acoplamiento molecular rígido, dicha zona correspondió al sitio III de BSA. En este sentido, para la realización de estos estudios se consideró la pose de menor afinidad para cada sistema y además se consideraron una serie de residuos de BSA con los que cada especie interactuara a una distancia máxima de 5 Å, a excepción de *Trp 134*. Finalmente, al conformero de menor energía correspondiente a cada macrociclo tetrapirrólico, que se obtuvo mediante los estudios de acoplamiento molecular rígido y flexible se le realizó estudios de energía libre.

Se realizaron cálculos de energía electrostática, siguiendo la metodología propuesta por Nathan Baker [81]. Los estados de protonación de los residuos ionizables de la BSA, la asignación de cargas y radios de los diferentes macrociclos se establecieron con PROPKA a un pH de 7, empleando el campo de fuerza Charmm [82] ambos implementados en el servidor PDB2PQR [83], se consideró una constante dieléctrica de 78.0 y 4.0 para el agua y la proteína respectivamente

Todas las especies sintetizadas o extraídas se caracterizaron por espectroscopía UV-vis, Infrarrojo y fluorescencia (en base a su espectro característico UV-Vis de cada especie se comprobó la separación u obtención satisfactoria de cada una de ellas). También se realizaron pruebas de solubilidad en los siguientes disolventes: agua, metanol, etanol, dimetilsulfóxido, acetona, éter etílico y cloroformo previo a los análisis de su interacción con BSA. De esta manera se eligieron las especies con mayor solubilidad y estabilidad en medios acuosos, para proceder con los estudios de interacción con BSA.

Capítulo III: Resultados y discusión

3.1. Tetracarboxifenilporfirina $H_2T(p-COOH)PP$

La caracterización de las especies $H_2T(p-COOH)PP$ y $H_2T(p-OH)PP$ se llevó a cabo por espectroscopía UV-Vis, fluorescencia e Infrarrojo con transformada de Fourier. El rendimiento de cada reacción fue menor al 36 %. Debido a la baja solubilidad en agua de esta especie, se solubilizó en etanol y se diluyó con solución amortiguadora de fosfatos pH 7, para la obtención de los espectros de absorción y fluorescencia. El espectro UV-Vis obtenido (figura 3.1), es característico de monómeros de una porfirina base libre, esto es, presenta una banda de Soret a los 416 nm y las diferentes bandas Q en el intervalo de los 513 a 652 nm. Cabe mencionar que el ambiente predominantemente acuoso no influyó para la agregación de $H_2T(p-COOH)PP$.

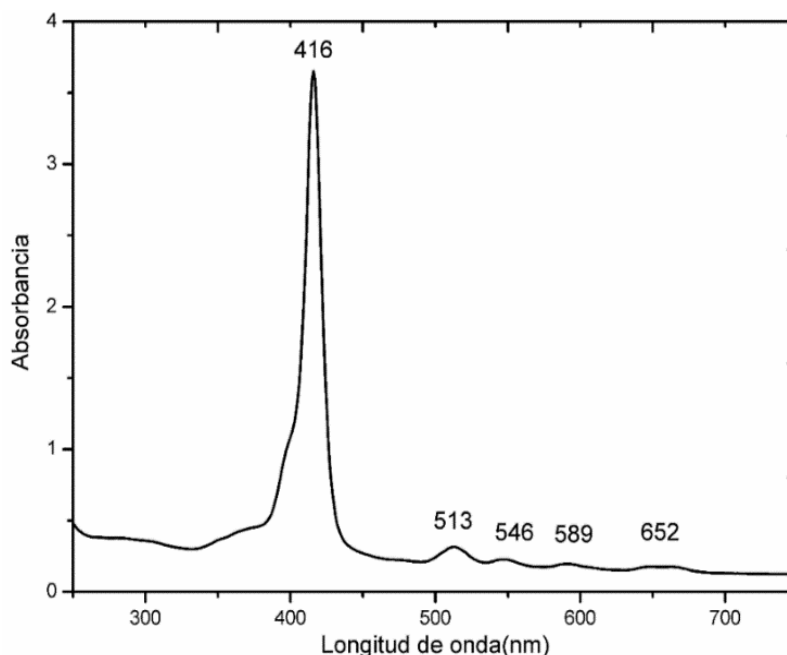


Figura 3.1. Espectro UV vis de la especie $H_2T(p-COOH)PP$ en mezcla etanol-fosfatos pH 7.

En el espectro FTIR de la figura 3.2, se resaltaron las vibraciones de enlace asociados a los grupos funcionales presentes en la estructura de la $H_2T(p-COOH)PP$, así pues las bandas de estiramiento de enlace de grupos carbonilo, así como de enlaces C-O característicos de ácidos carboxílicos se observan a los 1675 y 1281 cm^{-1} respectivamente. Las vibraciones de estiramiento de enlaces N-H se observan a los 3326 cm^{-1} . Las bandas asociadas a enlaces C-C, C=C, C-H que se observan entre 1418 a 734 cm^{-1} están vinculadas a las frecuencias de vibración del núcleo macrocíclico respectivamente. Las bandas asociadas a enlaces C-C, C=C, C-H que se observan entre 1418 a 734 cm^{-1} están vinculadas a las frecuencias de vibración del núcleo macrocíclico.

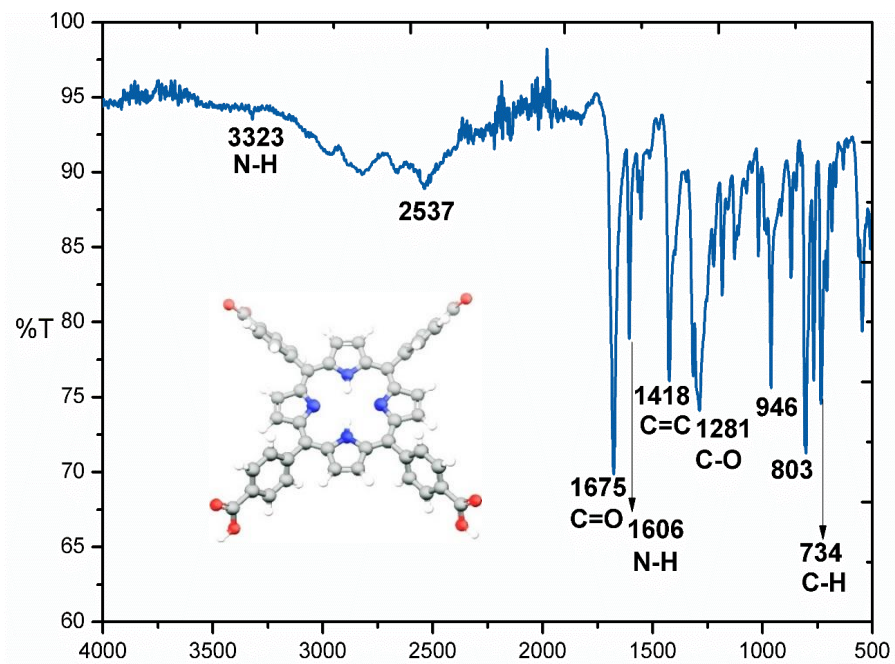


Figura 3.2. Espectro FTIR de H₂T(p-COOH)PP.

La especie H₂T(p-COOH)PP también se caracterizó por espectroscopía de fluorescencia considerando previamente a los estudios de interacción con BSA dos diferentes longitudes de excitación; 280 y 419 nm. Se observa en la figura 3.3 una fuerte emisión de fluorescencia a los 640 nm para ambas longitudes de excitación y la aparición de un pico de mucha menor intensidad cercano a los 550 nm cuando se excita la porfirina a 280 nm.

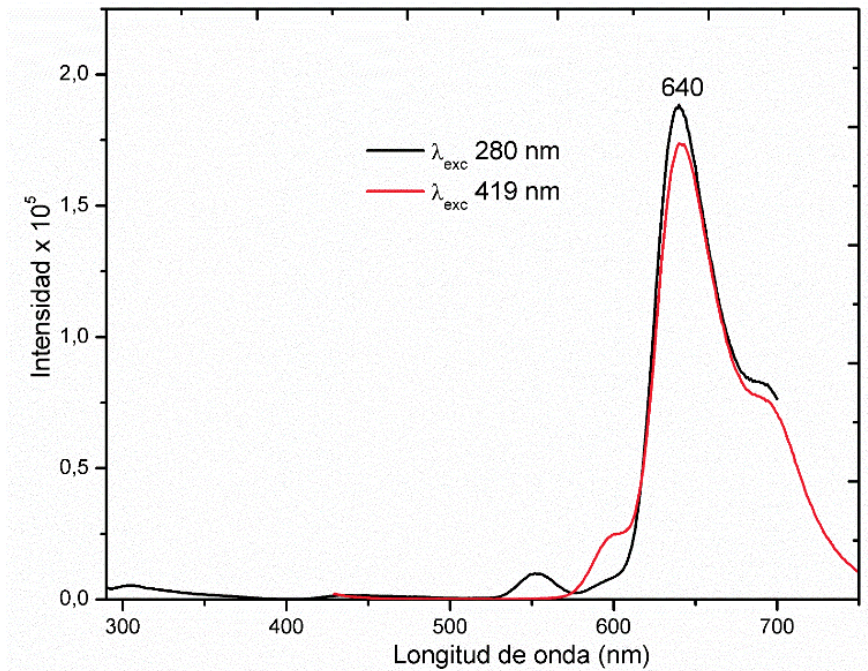


Figura 3.3. Espectro de emisión de fluorescencia de $H_2T(p-COOH)PP$ en solución etanol-fosfatos pH 7.

3.2. Tetrahidroxifenilporfirina $H_2T(p-OH)PP$

Con respecto a la especie $H_2T(p-OH)TT$, se observó un espectro UV-Vis característico de tetrafenilporfirinas, es decir, con la presencia de las bandas: de Soret a los 419 nm y las cuatro diferentes bandas Q en el intervalo de los 516 a 650 nm en solución de etanol (figura 3.4). Con relación a los estudios posteriores de interacción con BSA; su caracterización también se llevó a cabo en disoluciones acuosas etanol-agua 1:9, 3:7 V/V. Como resultado se observó una disminución significativa de la absorción de la banda de Soret, aunado a un desplazamiento batócronico a los 427 nm, así como, una disminución significativa de las cuatro diferentes bandas Q, y el respectivo cambio de color de la solución de violeta a verde. Esto es indicativo ya sea, de la formación de agregados o la protonación de los nitrógenos pirrolicos en dicho medio, mismos que afectan las vías de resonancia de electrones del macrociclo tetrapirrólico y en consecuencia sus propiedades espectroscópicas.

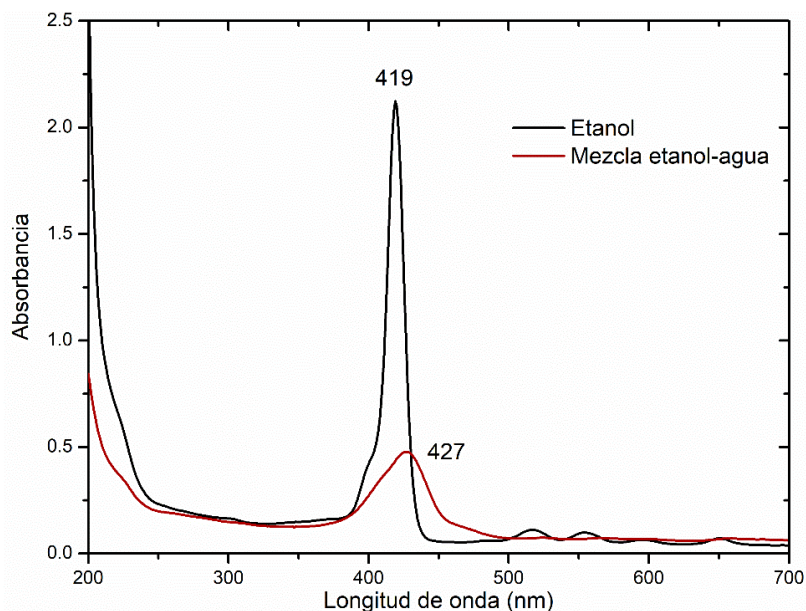


Figura 3.4. Espectro UV vis de la especie $H_2T(p-OH)TT$ en etanol.

En la figura 3.5 se presenta el espectro FTIR de la especie $H_2T(p-OH)TT$, en donde se observan bandas fuertes de absorción a partir de la región de los 700 y hasta los 3200 cm^{-1} . Las bandas de absorción que comienzan en el intervalo de los 797 a 1607 cm^{-1} son atribuibles a vibraciones de enlace C-H y C-N, C=C y N-H inherentes al núcleo porfiínico. La banda amplia que se observa entre los 3200 y 3700 cm^{-1} y la pequeña banda a 1050 cm^{-1} se vinculan a enlaces O-H y C-O presentes en la periferia de la porfirina.

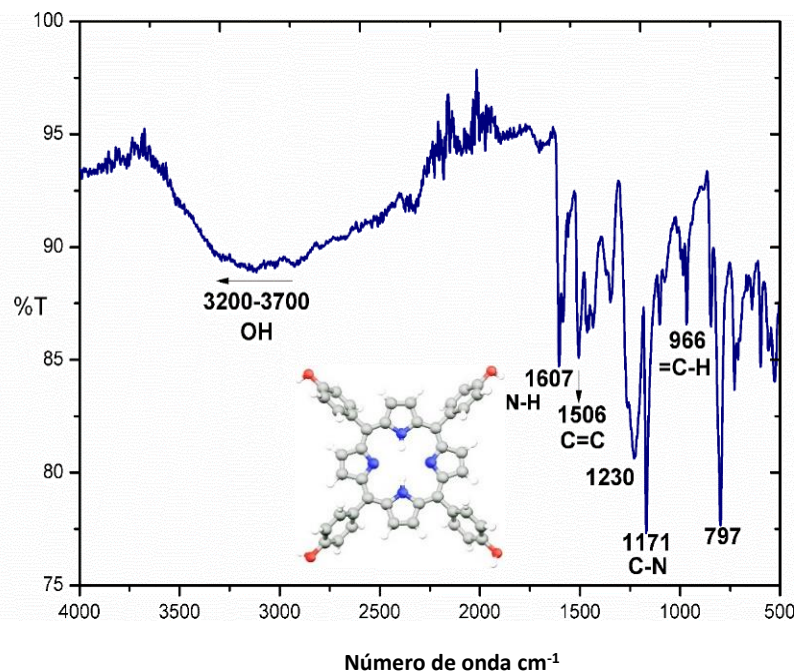
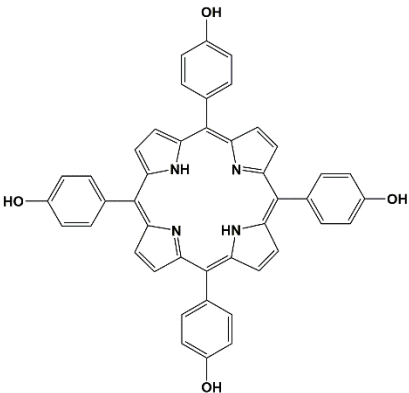
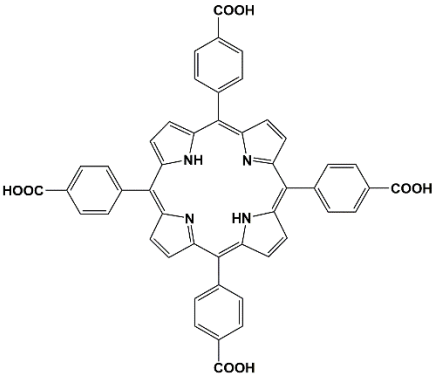


Figura 3.5. Espectro FTIR de la especie $H_2T(p-OH)TT$.

Aunque la especie $H_2T(p-OH)TT$ es soluble en disolventes polares como etanol y dimetilsulfóxido, el efecto observado en disoluciones acuosas sobre sus propiedades espectroscópicas no permiten considerar esta especie para los subsecuentes estudios de interacción con BSA, debido a que se seguramente sus propiedades de emisión de fluorescencia, tiempos de vida en el estado triplete excitado, rendimiento cuántico etc. se ven disminuidos de manera importante. Considerando así a la especie $H_2T(p-COOH)PP$ como un ligando propicio para continuar con los estudios de interacción con BSA. A continuación, se describe la solubilidad de las especies $H_2T(p-COOH)PP$ y $H_2T(p-OH)PP$ en diferentes disolventes (tabla 3.1)

Tabla 3.1. Estructura y solubilidad de las especies macrocíclicas estudiadas.

 <p>$H_2T(p-OH)PP$</p>	Soluble en: Etanol Dimetilsufóxido Metanol
 <p>$H_2T(p-COOH)PP$</p>	Etanol Dimetilsufóxido Metanol Tetrahidrofurano

3.4. Caracterización espectroscópica de clorofila *a* y derivados

3.4.1 Clorofila *a*

El espectro de absorción de porfirinas en el UV-Vis, es explicado a través de la teoría de orbitales de frontera. La banda de Soret en la región del azul en el espectro electromagnético surge de una transición $S_0 \rightarrow S_n$ con $n > 2$, mientras las bandas Q en la región del rojo del surgen a partir de un estado $S_0 \rightarrow S_1$ y $S_0 \rightarrow S_2$ para las transiciones Q_y y Q_x respectivamente. El espectro UV-Vis de la clorofila *a* en etanol (figura 3.6) muestra una banda de Soret a los 431 nm y diferentes bandas Q, destacando aquellas a los 615, 663 y 535 nm, las cuales están relacionadas a las transiciones electrónicas del núcleo tetrapirrólico; estas bandas son características de dichos compuestos.

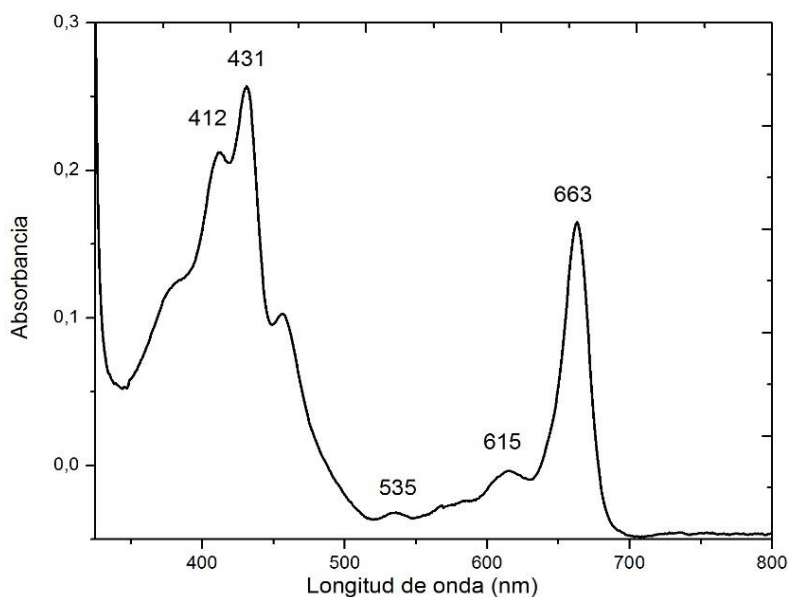


Figura 3.6. Espectro UV-Vis de clorofila *a* en etanol

La presencia de grupos funcionales como carbonilos; ya sea de ésteres o cetonas se observan claramente en el espectro IR de la clorofila *a* (figura 3.7). Ambas frecuencias de vibración se presentan a los 1702 y 1738 cm^{-1} correspondientes a enlaces C=O de cetonas y ésteres respectivamente. La banda intensa en los 2900 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento de enlaces C-H, adicionalmente las vibraciones de flexión de enlaces C-H se presentan a los 1462 cm^{-1} . Las vibraciones de enlaces C=C conjugados inherentes al núcleo se presentan a los 1600 -1680 cm^{-1} [51]

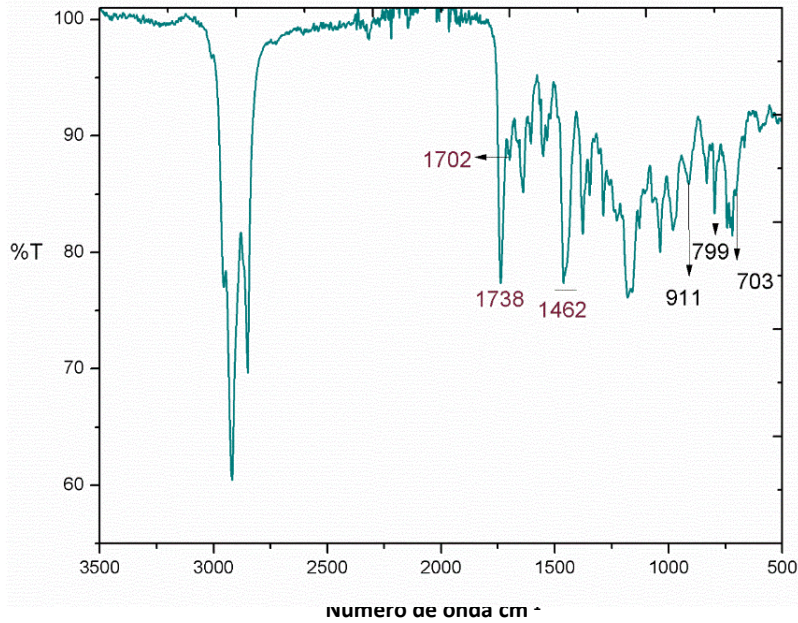


Figura 3.7. Espectro IR de clorofila a

Como es bien sabido, la clorofila, al igual que muchos macrociclos relacionados presentan emisión de fluorescencia, generalmente roja cuando se irradian con luz de longitud de onda adecuada. El espectro de fluorescencia de la clorofila *a* en etanol se obtuvo a temperatura ambiente en un intervalo de 440 a 800 nm, la longitud de excitación fue de 431 nm concerniente al máximo de absorción. Se observó una banda de emisión amplia con un máximo a los 653 nm y un hombro en alrededor de los 710nm (figura 3.8).; espectro muy similar al que presentan la mayoría de las porfirinas y el cual está en concordancia con los datos publicados.

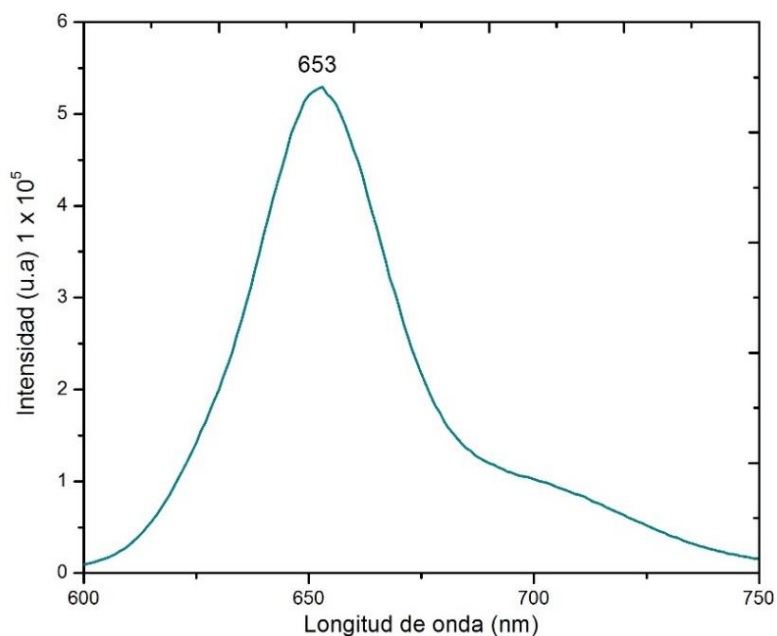


Figura 3.8. Espectro de fluorescencia (longitud de excitación = 431 nm) de clorofila a en etanol

A pesar de la complejidad estructural de las clorofilas y sus derivados (figura 3.9), la asignación de los cambios químicos resulta ser más simple, ya que muchos protones sobre el macrociclo de la clorofila están suficientemente aislados para no experimentar interacciones spin-spin, los cuales pudiesen complicar de manera sustancial la dilucidación de su espectro. Por ejemplo, los protones del grupo metino, los protones en la posición 10 y los protones del grupo metilo en la posición 3a y 10b están bien separados y aparecen en el NMR como singuletes (figura 3.10).

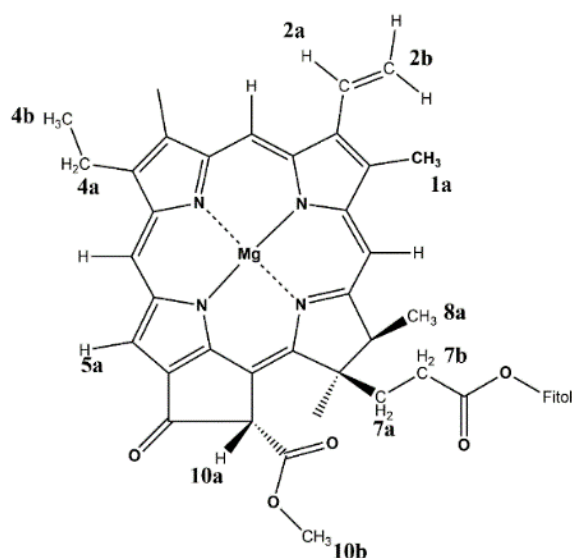


Figura 3.9. Asignación del tipo de protones presentes en el núcleo

Los grupos vinilo en la posición 2, los protones del anillo IV y el grupo *etil* en la posición 4 experimentan interacciones spin-spin. Las principales características del espectro ^1H NMR de clorofilas, son resultado del campo interatómico inducido debido a la alta aromaticidad del macrociclo. En la siguiente figura (3.10) se han asignado las principales señales de ^1H NMR de la clorofila *a*, las cuales concuerdan con los datos reportados [84-86].

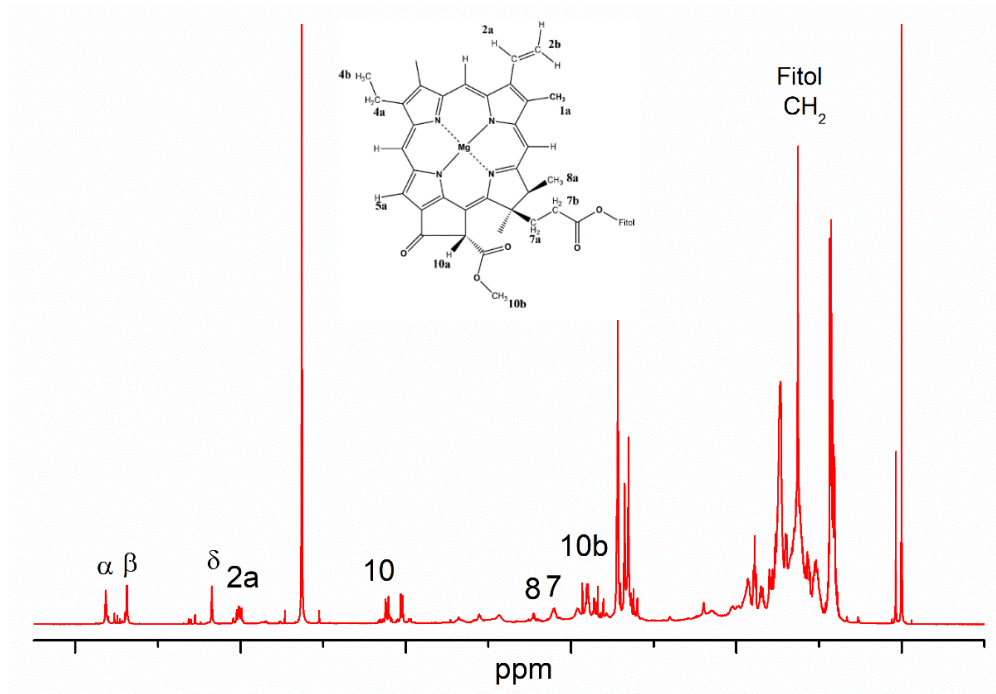


Figura 3.10. Espectro de ^1H RMN/500 MHz de clorofila *a* en CDCl_3

3.4.2 Feofitina *a*

Las clorofilas al igual que los derivados de porfirinas como la *feofitina*, presentan dos bandas principales de absorción en el UV-Vis, esto es debido al extenso sistema de electrones π del núcleo tetrapirrólico. Los máximos de absorción en *feofitina a* se observan entre los 410 y 667 nm correspondiente a la banda de Soret y la banda Q respectivamente. Las pequeñas bandas localizadas a los 504, 534 y 606 nm (figura 3.11) son características de este compuesto [51]. La prominente banda de Soret a menor longitud de onda que la de la respectiva clorofila *a* y las cuatro bandas Q se atribuyen al anillo libre de la *feofitina* y se asemejan mucho al grupo de bandas Q de las bases libres de las porfirinas.

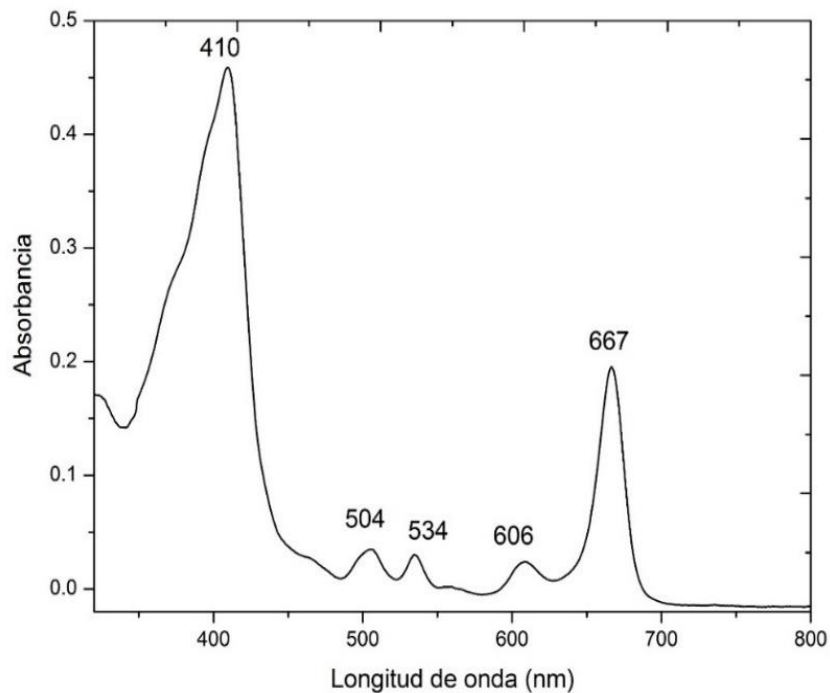


Figura 3.11. Espectro UV-Vis de feofitina a en etanol

La desmetalación de la clorofila *a* genera dos aminas secundarias en el núcleo tetrapirrólico. Las vibraciones asimétricas asociadas a grupos N-H en la *feofitina a* se observan a los 3387 cm^{-1} , mientras las vibraciones de flexión son vistas a los 1618 cm^{-1} (figura 3.12). Las vibraciones de enlaces C=C conjugados en este caso se presentan a los 1582 cm^{-1} [51].

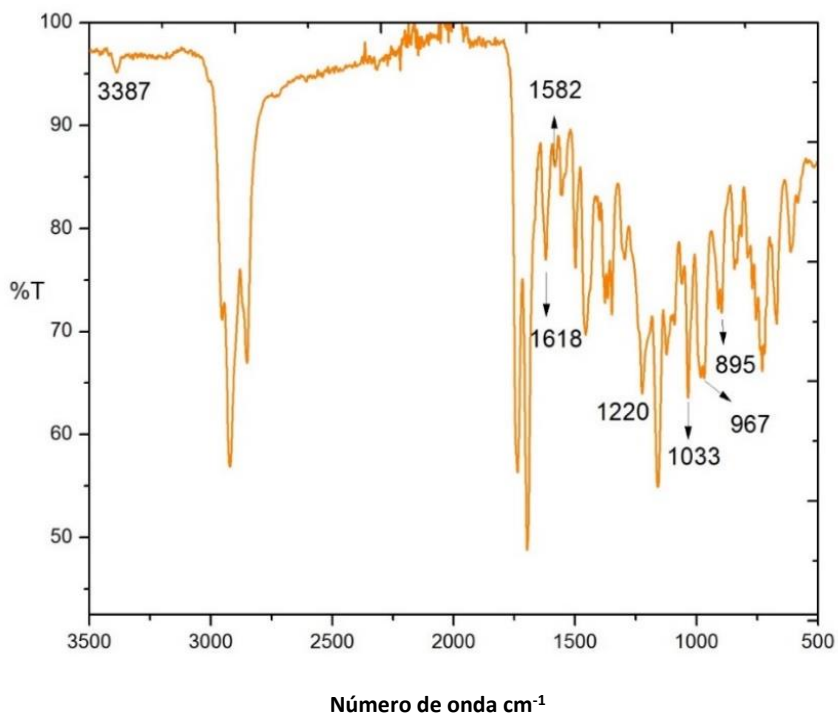


Figura 3.12. Espectro IR de feofitina a

A diferencia de la clorofila *a*, la emisión de fluorescencia de feofitina *a* se observó a 667 nm y también un hombro aún más notorio localizado alrededor de los 710 nm que aquel visto en la respectiva clorofila, cuando está se excitó a una longitud de onda de 410 nm (figura 3.13). El desplazamiento del máximo de emisión al rojo, suele atribuirse al macrociclo libre de clorina, es decir, como prueba de la desmetalación de la clorofila.

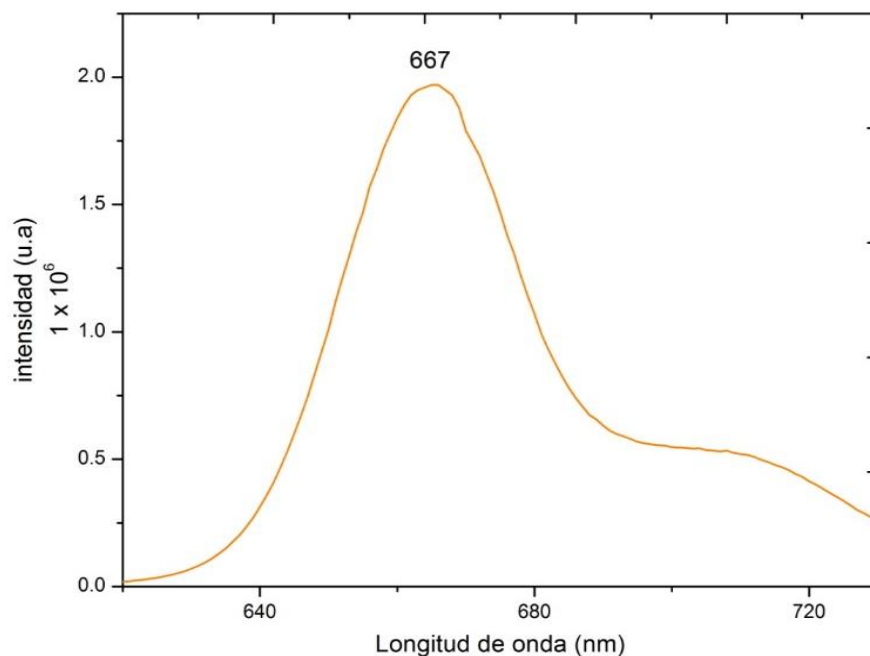


Figura 3.13. Espectro de fluorescencia (longitud de excitación = 410 nm) de feofitina a en etanol

3.4.3 Clorofilina *a*

La clorofilina *a* es un derivado de clorofila soluble en agua. Las bandas principales de absorción de clorofila *a* se observan alrededor de los 428 y 660 nm, en cambio las principales bandas de absorción de la clorofilina *a* se observan a los 404 banda de Soret y 652 nm banda Q_r (figura 3.14), este patrón de señales tan distintivo se atribuye a la apertura del anillo de ciclopentanona en la estructura de la clorofila, además de la desmetalación y ligera pérdida de la planaridad.

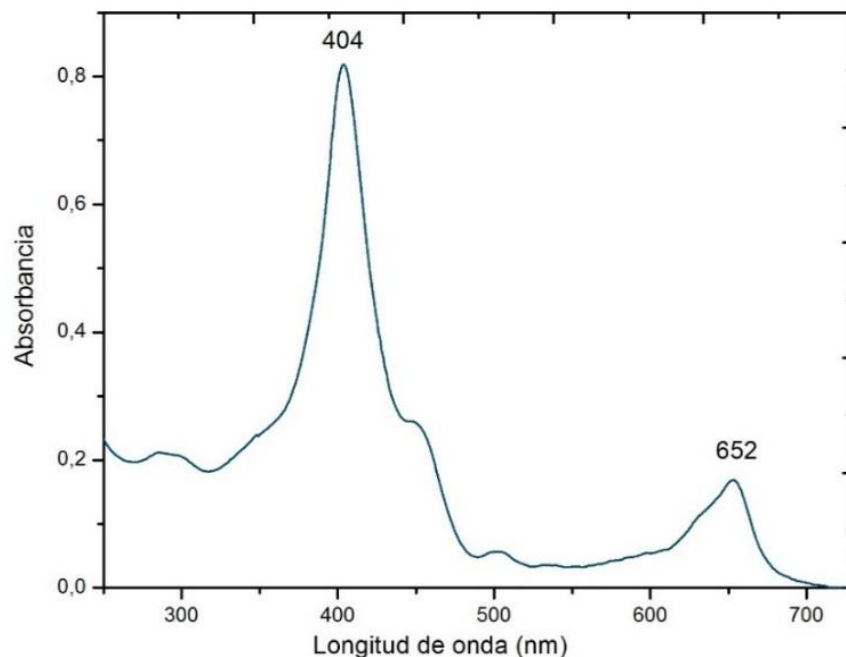


Figura 3.14. Espectro de UV-Vis de clorofilina a en agua

La hidrólisis básica de la clorofila *a* produce un derivado con tres grupos carboxilatos en la periferia del núcleo tetrapirrólico [25]. La banda amplia que se extiende desde los 3437 a los 3233 cm^{-1} se debe a las vibraciones de estiramiento de enlaces de O-H presentes en los grupos carboxílicos de la clorofilina *a*. Así mismo, las bandas vistas a los 2919 y 2852 cm^{-1} están relacionadas a vibraciones de estiramiento de enlaces C-H. Las bandas de estiramiento de enlace de grupos carbonilo, así como de enlaces C-O característicos de carboxilatos se observan a los 1668 y 1394 cm^{-1} respectivamente (figura 3.15).

La clorofilina *a* disuelta en agua destilada, presenta un máximo de emisión a los 530 nm cuando la longitud de excitación es de 402 nm (figura 3.16).

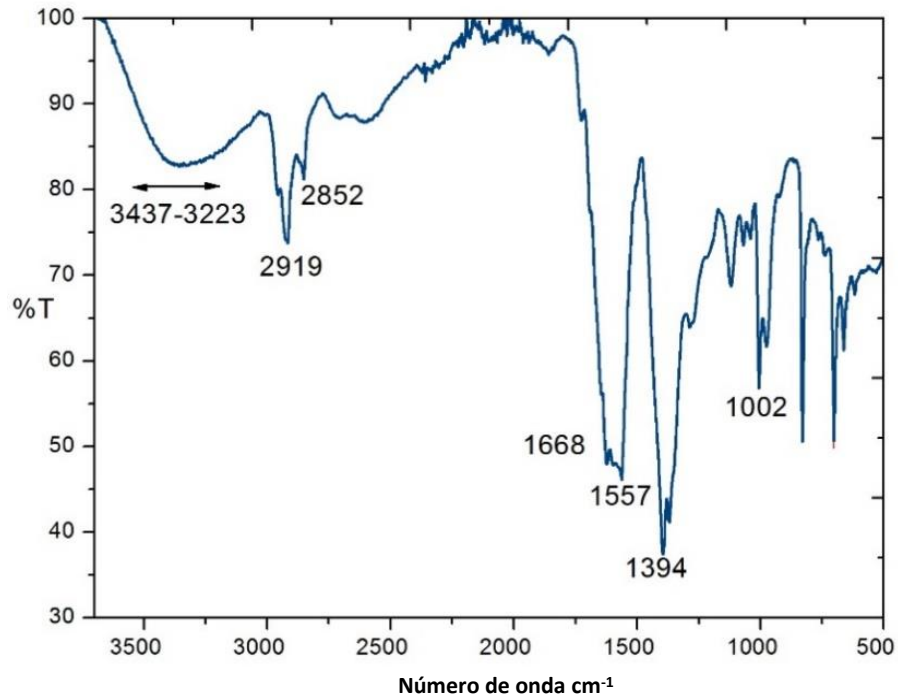


Figura 3.15. Espectro de IR de clorofilina a

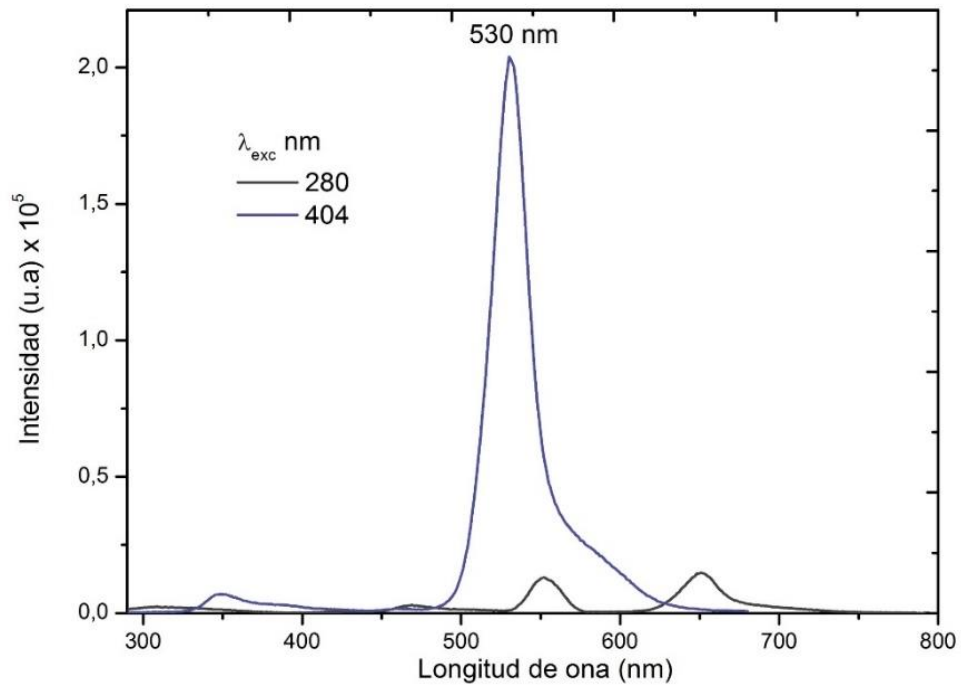


Figura 3.16. Espectro de fluorescencia de clorifilina a en agua excitando con luz de 280 y 404 nm.

3.4.5 Clorina e6

La *clorina e6* se prepara por medio de la hidrólisis ácida de clorofilina *a*. Este derivado posee tres grupos carboxílicos en la periferia del núcleo macrocíclico. Aunque la clorina e6 es poco soluble en agua en comparación a la clorofilina *a*, esta es muy soluble en alcoholes y por lo tanto en disoluciones acuosas. La gran importancia de este derivado radica en la presencia estructural de 3 grupos carboxílicos libres, que además de mejorar la solubilidad, en principio también propicia interacciones intermoleculares tipo puentes de hidrógeno que son de gran interés en estudios de interacción proteína-ligando.

El espectro UV-Vis (3.17) de clorina e6 en etanol es muy similar al de la clorofilina *a*. La banda de Soret se desplaza ligeramente a los 402 nm y la banda Q presenta un cambio hipsocromico hacia los 664 nm y su espectro de absorción se ve inalterado en solución de etanol-fosfatos pH 7. Lo cual nos indica en primera instancia que no se presenta el fenómeno de agregación en dicho medio de disolución.

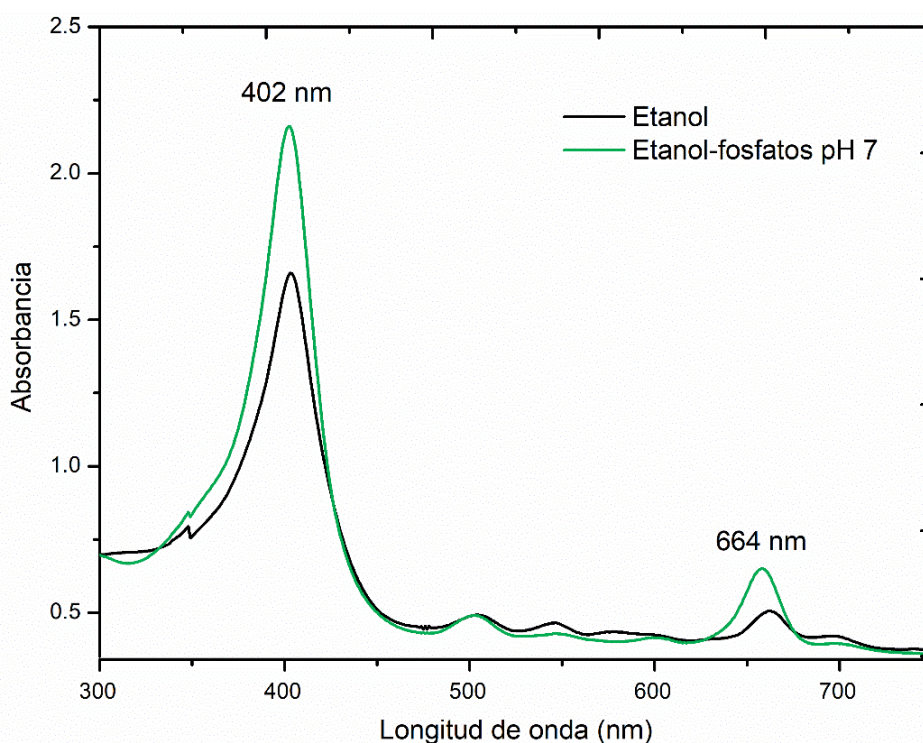


Figura 3.17. Espectro UV-Vis de *clorina e6-a* en etanol y solución etanol-fosfatos 20:80 V/V

La identificación de los grupos ácidos carboxílicos libres en el espectro IR de clorina e6 (figura 3.18), son importantes para diferenciarlos de los grupos carboxilatos de la clorofilina *a*. En este caso las vibraciones de estiramiento de aminas secundarias N-H se observan a los 3384 cm^{-1} , los puentes de hidrógeno O-H intermoleculares característicos de ácidos carboxílicos se observan a

los 3126 cm^{-1} , mientras la banda amplia a los 2964 cm^{-1} y la banda a los 1400 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones de estiramiento y flexión de enlaces O-H respectivamente. La banda a los 1712 cm^{-1} es referente a vibraciones de estiramiento de carbonilos de tipo ácidos carboxílicos, y la banda vista a los 1635 cm^{-1} está relacionada a vibraciones de enlaces conjugados de alquenos C=C.

El espectro de emisión de *clorina e6* (figura 3.19) se compone de una banda intensa de emisión a los 623 nm cuando la longitud de excitación es de 402 nm . Con la finalidad de realizar los estudios de interacción con BSA y conocer si existe una interferencia de emisión de *clorina e6* con respecto a BSA, también se registró su espectro de emisión a una longitud de excitación de 295 nm . Como resultado no se observó ninguna emisión significativa en el intervalo de los 320 a 350 nm que pudiera presentar interferencia con el máximo de emisión de BSA. En ese sentido se establece que el ligando es apropiado para poder llevar a cabo los estudios de apagamiento por la técnica de apagamiento de fluorescencia.

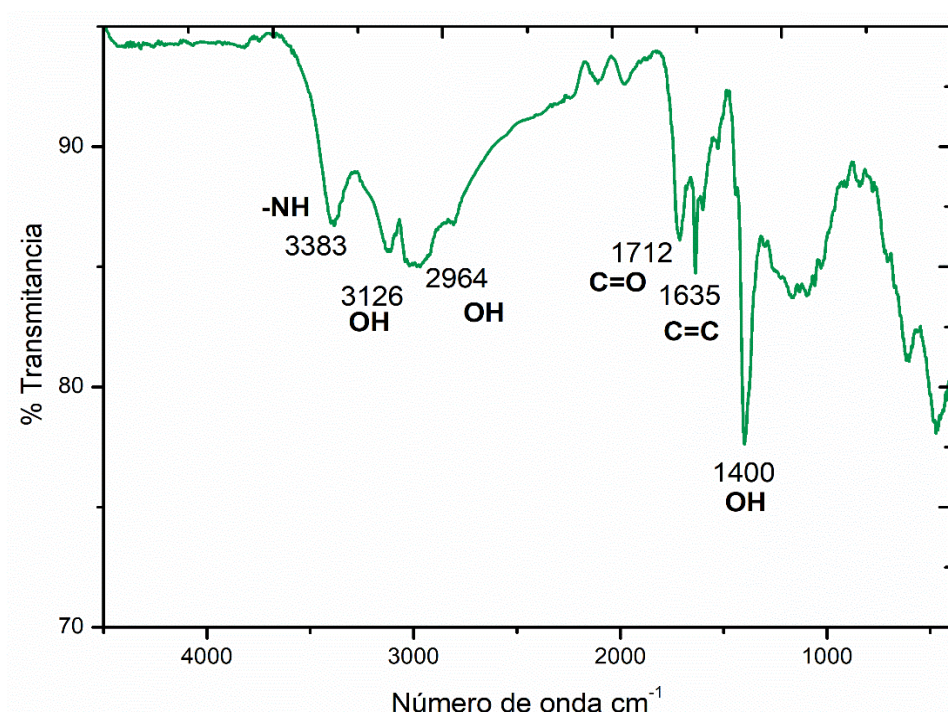


Figura 3.18. Espectro de IR de *clorina e6-a*

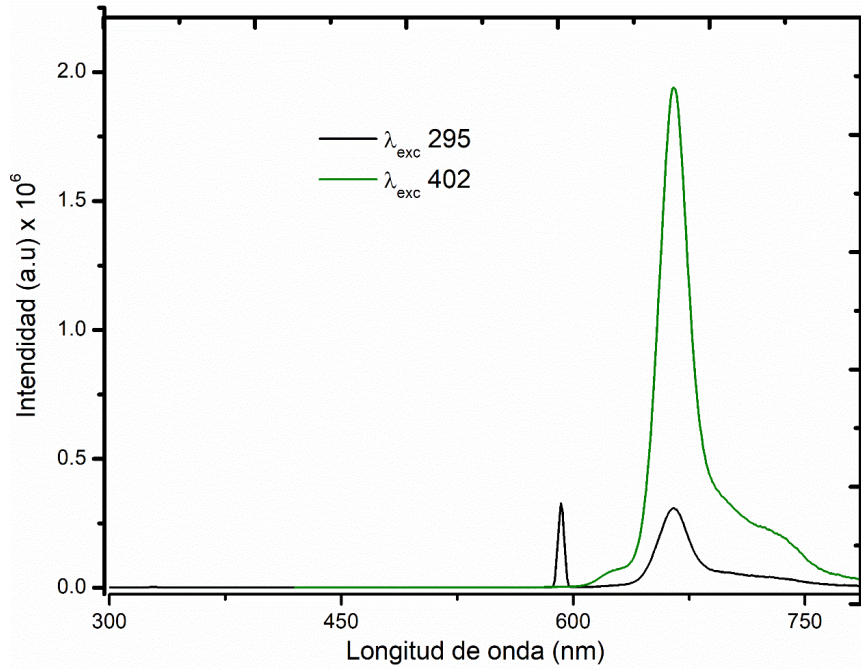
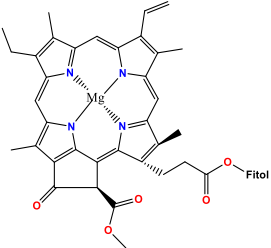
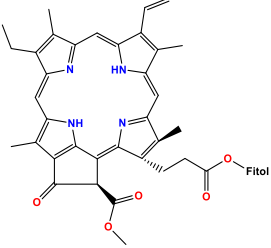
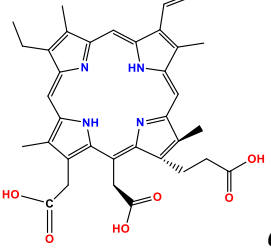


Figura 3.19. Espectro de Fluorescencia en agua de *clorina e6* a las longitudes de excitación de 295 y 402 nm.

En la siguiente tabla 3.2 se presenta la solubilidad de la clorofila a, b y derivados en diferentes disolventes, mismas que son importante para considerar el realizar los estudios posteriores de interacción con BSA.

Tabla 3.2. Solubilidad de: a) clorofila a, b) feofitina a y c) clorofilina a

 <p style="text-align: center;">a</p>	<hr/> <p>Soluble en:</p> <hr/> <p>Éter etílico Cloroformo Acetona Etanol Dimetilsulfóxido Metanol</p>
 <p style="text-align: center;">b</p>	<p>Éter etílico Cloroformo Acetona Etanol Dimetilsulfóxido Metanol</p>
 <p style="text-align: center;">c</p>	<p>Etanol Metanol Agua</p>

La alta solubilidad en agua o en medios predominantemente acuosos de los macrociclos tetrapirrólicos propuestos en este proyecto es una característica fundamental para llevar a cabo o proceder con los estudios de interacción con BSA. Por lo que se establece que *calorina e6 a* es un candidato muy interesante y pertinente para realizar dichos estudios, puesto que no presenta alteración (agregación o prolongación) en el medio etanol-fosfatos, conservándose así sus propiedades espectroscópicas. La baja o nula solubilidad en agua tanto de la clorofila *a* y *feofitina a* hace necesario utilizar un codisolvente en grandes proporciones como etanol o dimetilsulfóxido para permitir la solubilización de estas especies en un ambiente acuoso. Aunado a la tendencia de las clorofilas a agregarse en dicho medio, se hace imprescindible el uso de algún tensoactivo que inhiba la formación de agregados, puesto que este efecto resulta importante desde el punto de vista de sus propiedades espectroscópicas (emisión de fluorescencia, tiempos de vida en el estado triplete

excitado, rendimiento cuántico) ya que se ven disminuidos de manera importante e incluso anuladas.

Debido a la baja solubilidad en agua tanto de clorofila *a* y *feofitina a* y al hecho de formar agregados en soluciones acuosas, se establece que estas especies no son pertinentes para continuar los estudios de interacción con BSA. Finalmente se presentan a continuación los macrociclos tetrapirrólicos empleados (figura 3.20) para el análisis de la interacción con BSA.

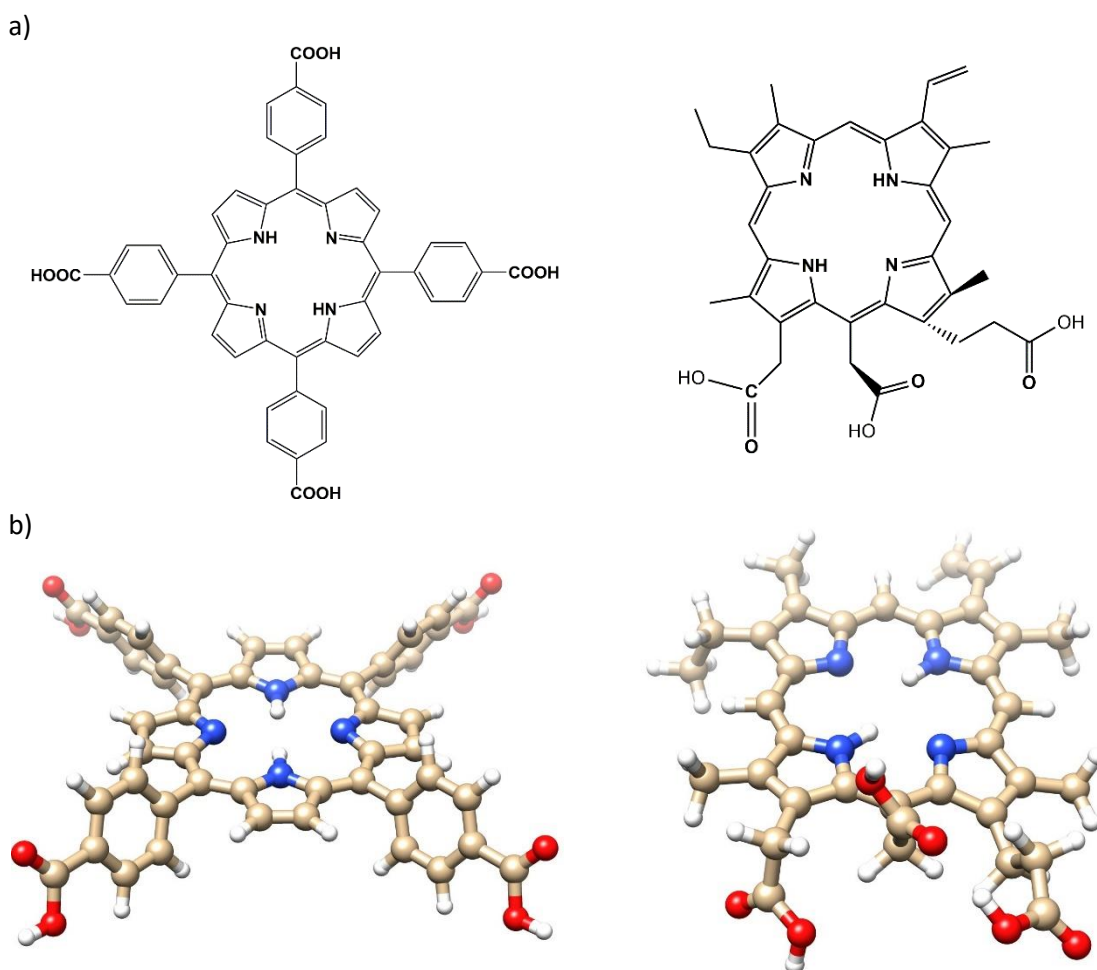


Figura 3.20. Estructura de los dos macrociclos tetrapirrólicos seleccionados para el análisis de interacción con BSA. a) representación 2D, b) representación 3D

3.5 Estudios de la interacción BSA-H₂T(p-COOH)PP por UV-Vis

Por medio del análisis de la interacción del sistema BSA- H₂T(p-COOH)PP por UV-Vis se determinó en primera instancia el intervalo de concentraciones óptimas de trabajo, mediante la titulación espectrofotométrica de una solución de concentración fija de BSA con concentraciones crecientes de H₂T(p-COOH) en el intervalo de 0.65 a 6.98 x 10⁻⁶ M . La concentración de porfirina libre en las titulaciones espectrofotométricas con BSA se determinó extrapolando los datos de absorción obtenidos a 419 nm a una curva estándar previamente realizada, así como utilizando el coeficiente de absorción molar reportado (sigma aldrich). Los estudios se realizaron a tres diferentes valores de pH: 7, 8.5 y 6, para cada uno de los casos se determinó independientemente la concentración de la porfirina. Debido a la baja solubilidad de H₂T(p-COOH)PP en agua, esta se disolvió en una mezcla etanol-fosfatos 20:80 V/V, estableciendo que la presencia máxima del 2% V/V de etanol [67] en las soluciones titulantes no altera las estructura y estabilidad de BSA.

Los estudios espectrofotométricos mostraron a los diferentes valores de pH una tendencia generalizada en el aumento de la absorción a 280 nm, indicando un posible cambio en el microambiente de los residuos aromáticos de BSA (puesto que estos son los responsables de la absorción característica de proteínas en el UV-visible). Se asume en primera instancia que podría haber un acercamiento con el residuo de TRP 134, dado que está expuesto en la superficie de BSA. Otro aspecto interesante de la titulación espectrofotométrica del sistema BSA-H₂T(p-COOH)TT; es el aumento y el desplazamiento concomitante de la absorción de los 422 a los 416 nm, es decir, se observó un cambio hipsócronico con el aumento de la concentración de H₂T(p-COOH)TT. Este fenómeno posiblemente se deba a la concentración libre de H₂T(p-COOH)TT, lo cual representa a la población de moléculas de H₂T(p-COOH)TT que no interactúan con BSA y por lo tanto la absorción de la banda de Soret se observa en los últimos puntos de la titulación a los 416 nm, como se puede ver en el espectro de la

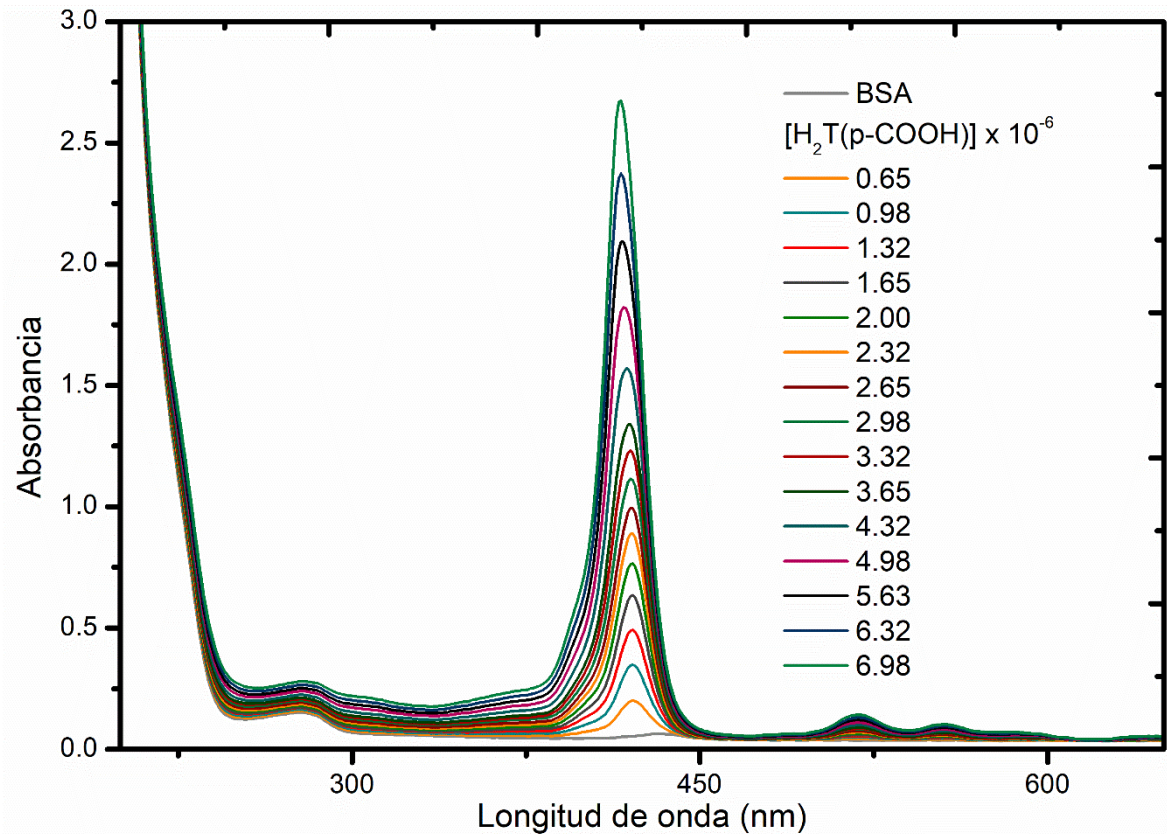


Figura 3.21. Espectro UV-vis de la titulación de BSA- $H_2T(p-COOH)PP$ pH 7

Como se mencionó anteriormente, la misma tendencia se observa en los experimentos a pH de 8.5, así como en los mismos intervalos de concentraciones utilizadas en cada uno de los casos. Infiriendo que en el intervalo de concentraciones de 0.65 a $6.98 \times 10^{-6} M$ $H_2T(p-COOH)PP$ se presenta la saturación del o sitios de unión (asumiendo por el momento que exista interacción) con BSA.

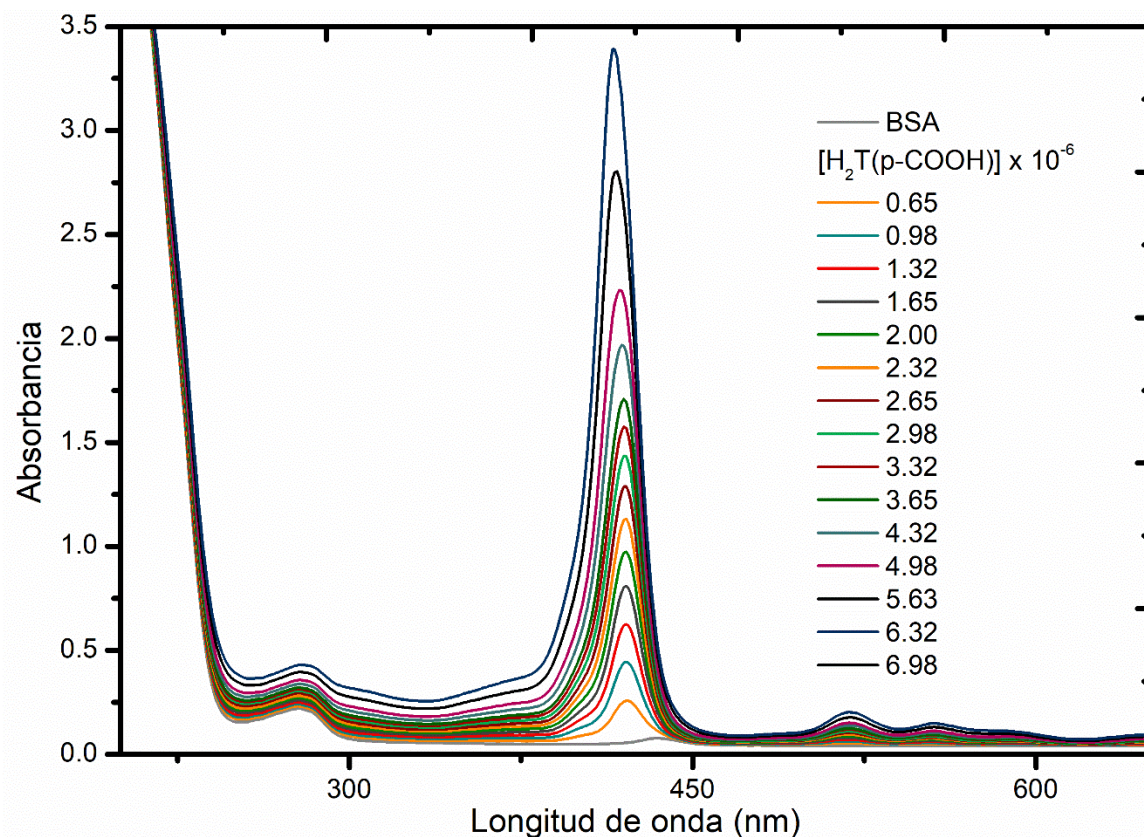


Figura 3.22. Espectro UV-vis de la titulación de BSA- $H_2T(p-COOH)PP$ pH 8.5

3.5.1 Estudios espectrofluorométricos de la interacción de BSA- $H_2T(p-COOH)PP$

La técnica de apagamiento de fluorescencia, se utilizó para investigar el posible mecanismo de unión tanto de $H_2T(p-COOH)PP$, así como de clorofilina "a" a BSA, mediante la determinación de las constantes de unión a diferentes valores de pH y temperatura y los correspondientes parámetros termodinámicos de unión: ΔH_u , ΔS_u , ΔG_u para cada caso de estudio. Los cambios de emisión del triptófano son comunes en respuesta a: transiciones conformacionales, la unión a un sustrato o cuando se presenta la desnaturalización de la proteína. La excitación a 295 nm, permite observar solo la emisión de los residuos de triptófano, mientras que a una longitud de onda de 280 nm se observa la excitación tanto del triptófano, así como, de la tirosina presente en las proteínas [77]. Conociendo que la emisión de fluorescencia de BSA es atribuida casi en su totalidad al residuo *Trp* 134 y en menor medida al *Trp* 214 [58], la longitud de excitación para el seguimiento del apagamiento de BSA se realizó a una λ_{exc} 295 nm

Mediante los estudios de fluorescencia del sistema BSA- $H_2T(p-COOH)PP$ se observó un decremento progresivo de la emisión de fluorescencia de BSA a los 329 nm al aumentar la concentración de $H_2T(p-COOH)PP$ (figuras 3.23 y 3.24). Además, se observa un punto isosbético cercano a los 450 nm, indicando la presencia de dos especies en equilibrio (el estado unido y el estado libre), es decir el complejo y la proteína libre. Un aspecto importante es que en ningún punto de la titulación se observó un desplazamiento del máximo de emisión de BSA, lo cual nos provee información inicial de que no se presenta un cambio en la estructura tridimensional de BSA $H_2T(p-COOH)PP$ durante el proceso de interacción con $H_2T(p-COOH)PP$. El apagamiento de fluorescencia también demostró la posibilidad de que la interacción se lleve a cabo en la cercanía de alguno de los dos residuos de *Trp* presentes en la BSA.

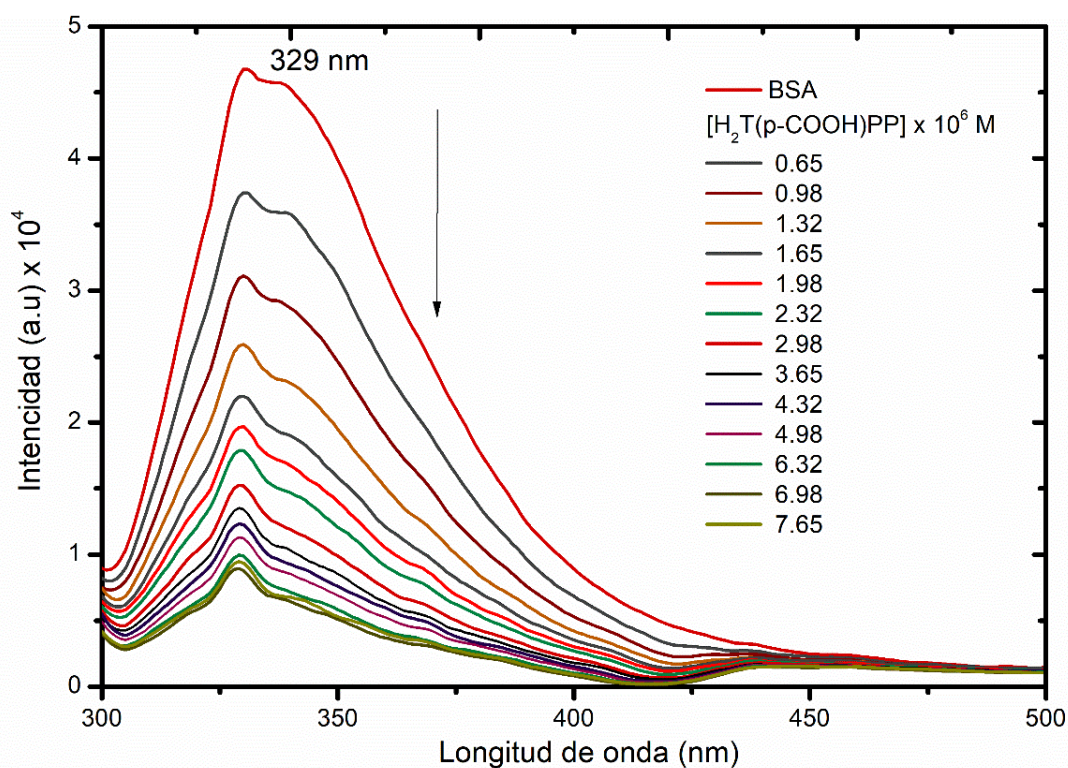


Figura 3.23. Espectro de la titulación espectrofluorométrica de BSA con $H_2T(p-COOH)PP$ en solución amortiguadora etanol-fosfatos pH 7 $\lambda_{exc} = 295$ nm.

Debido a que la fluorescencia de BSA es constante en el intervalo de pH estudiados [66], no se observaron cambios relevantes en los máximos de emisión de la proteína. De igual manera se

observaron los mismos patrones de apagamiento, así como un punto isobestico cercano a los 425 nm a pH 8.5

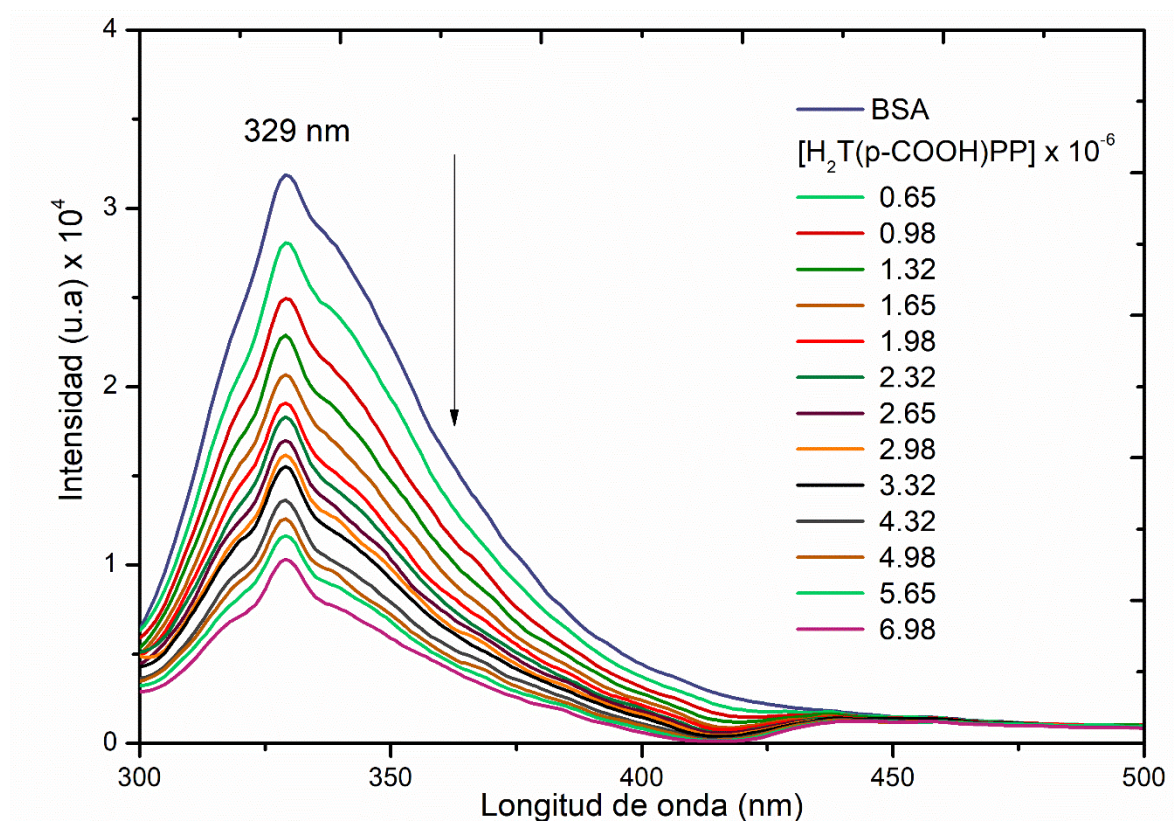


Figura 3.24. Espectro de la titulación espectrofluorométrica de BSA con H₂T(p-COOH)PP en solución amortiguadora etanol-fosfatos pH 8.5 $\lambda_{exc} = 295$ nm.

El apagamiento de fluorescencia corresponde a un decremento en el rendimiento cuántico (intensidad de fluorescencia) del fluoróforo (BSA), pero este puede ser inducido por medio de una variedad de interacciones moleculares con el desactivante (H₂T(p-COOH)PP). Para distinguir el fenómeno de apagamiento que se presenta en el sistema BSA-H₂T(p-COOH)PP, ya sea dinámico (debido a choques intermoleculares entre la y el proteína ligando) o estático (formación de un complejo), se realizaron los experimentos de titulación fluorométrica a las temperaturas de: 25, 31 y 42 °C para cada valor de pH considerado en este trabajo.

Es bien conocido que ciertas reacciones de apagamiento de fluorescencia generan gráficos de Stern-Volmer que se desvían de la linealidad con curvaturas ya sea positivas o negativas [87]. El análisis de los datos de las titulaciones del sistema BSA- H₂T(p-COOH)PP a pH 7 a 25 °C demostró que existe una ligera desviación con curvatura negativa del gráfico de Stern-Volmer [88] (figura

3.25). Este tipo de eventos no pueden ser atribuidos a un apagamiento estático convencional, es decir, a aquel que establece la formación de un complejo no fluorescente, sin embargo, puede atribuirse a la presencia de dos poblaciones diferentes de fluoróforos (*Trp* 134 y *Trp* 214), en el cual uno de ellos es inaccesible para el desactivante. Este resultado muestra concordancia en el sentido de que el residuo de *Trp* 213 (figura 3.26), está en la cavidad hidrofóbica del dominio II de BSA y el cual no es accesible al disolvente ver figura 38. Además, la apertura de esta cavidad es de alrededor de 10 Å de amplitud [], con lo que el acceso a la porfirina se vería muy restringido y por lo tanto se presentaría un impedimento estérico que no permita un contacto efectivo entre la especie $H_2T(p-COOH)PP$ y el residuo de *Trp* 213. Este fenómeno también se ve con frecuencia en el apagamiento de fluorescencia del triptófano en proteínas por desactivantes polares o cargados como en el caso de la especie $H_2T(p-COOH)PP$. Estas moléculas no penetran fácilmente el interior de la proteína, y solo la fluorescencia de los residuos de triptófano sobre la superficie de la proteína son apagados [89].

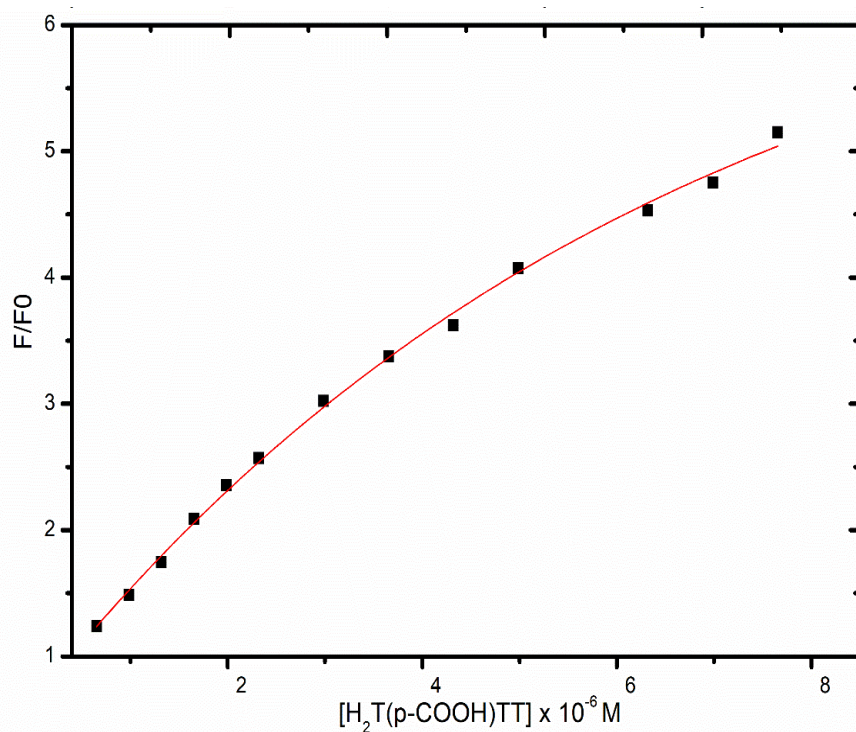


Figura 3.25. Gráfico de Stern-Volmer de la titulación espectrofluorotométrica de BSA con $H_2T(p-COOH)PP$ en solución amortiguadora etanol-fosfatos pH 7

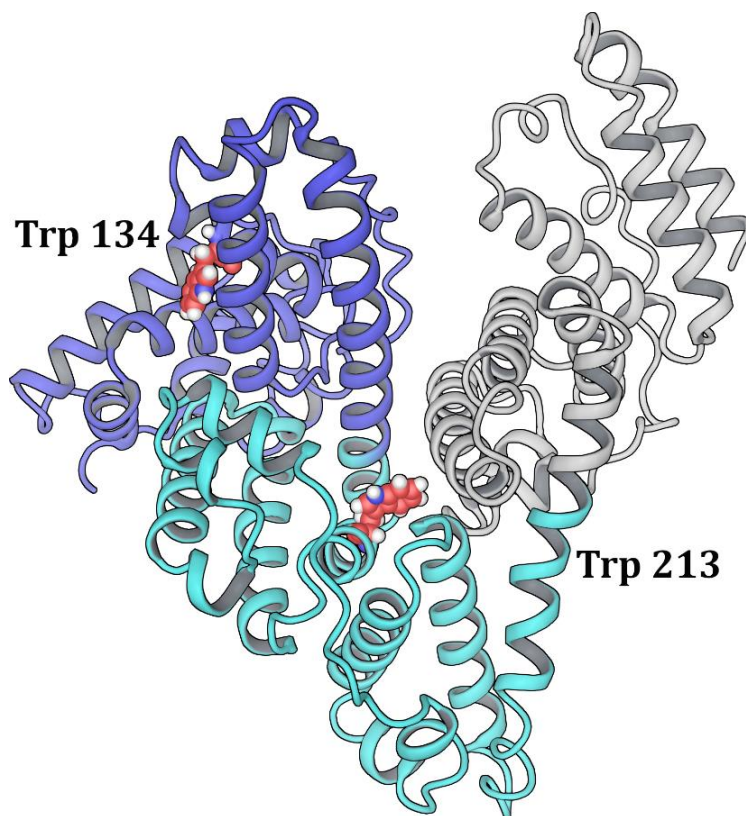


Figura 3.26. Estructura de BSA y la localización de los dos residuos de *Trp*

Como se mencionó con anterioridad la dependencia de F_0/F sobre $[H_2T(p-COOH)PP]$ pH 7 no es lineal en el intervalo de concentraciones de 0.65 a 6.98×10^{-6} M, sin embargo, se puede observar una relación lineal cuando la concentración total de $H_2T(p-COOH)PP$ es menor a 2.98×10^{-6} M. Por lo que los datos pueden ser ajustados a la ecuación de Stern-Volmer en este intervalo de concentraciones (figura 3.27). En cambio, el análisis a las temperaturas de 31 y 42 °C y en los datos a pH 8.5 (figura 3.28) si se observa una tendencia lineal del apagamiento de BSA en todo el intervalo de concentración empleado. En el caso del grafico de Stern-Volmer a pH 8.5 la linealidad de deba probablemente a que existe una mayor concentración de $H_2T(p-COOH)PP$ que se encuentre disociada en la forma COO^- y el efecto de apagamiento de BSA sea mayormente debido a interacciones de tipo electrostático, dado que estas interacciones son de mayor alcance (de hasta 5 Å) permitiendo así que; tanto el *Trp* 213, así como *Trp* 138 sean igualmente accesibles para la especie $H_2T(p-COOH)PP$, originando una única población de fluoroforo accesible. Sin embargo, el análisis del apagamiento a diferentes temperaturas también podría revelar que se esté propiciando un apagamiento de tipo dinámico, es decir debido a transferencia de energía por choques

intermoleculares a estas condiciones experimentales, por lo que es importante diferenciar ambos fenómenos por medio de análisis del sistema BSA- H₂T(p-COOH)PP a diferentes temperaturas.

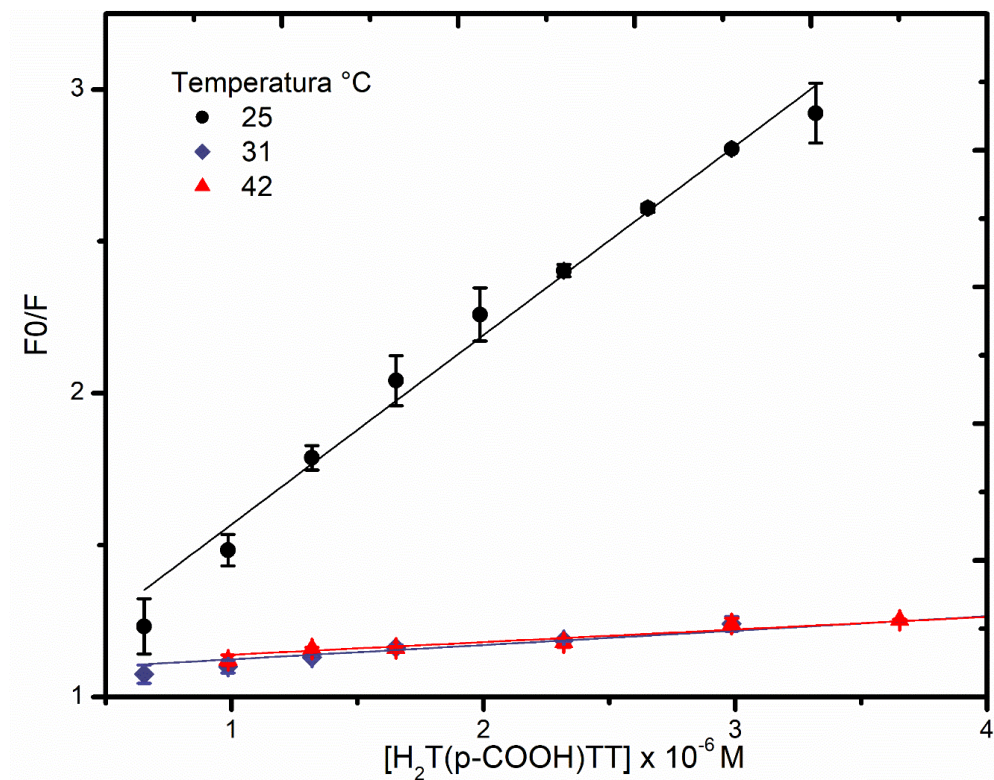


Figura 3.27. Gráfico de Stern-Volmer de las titulaciones BSA-H₂T(p-COOH)PP a pH 7 y 8.5. Se observa la linealidad del modelo en el intervalo de concentraciones mostrado

El valor numérico de la constante de Stern-Volmer en estudios de interacciones proteína-ligando, indica la efectividad del apagamiento de un ligando hacia un receptor específico, pero además el análisis a diferentes temperaturas nos provee información confiable del mecanismo de apagamiento presente en el sistema de estudio ya sea estático o dinámico. En las dos valoraciones hechas a diferentes pH, se encontraron altos valores de K_{SV} (tabla 3.1), siendo mayor para el caso de pH 7. Sugiriendo un fuerte apagamiento a concentraciones bajas de H₂T(p-COOH)PP, pero además se encontró que hay una influencia importante del pH sobre el apagamiento de BSA a 25 °C, ya que a pH 8.5 el valor de la constante de Stern-Volmer se redujo a cerca de la mitad en comparación a pH de 7. Ahora bien, los resultados a diferentes temperaturas demostraron que a pH 7 el apagamiento de fluorescencia de BSA disminuyó conforme al incremento de la temperatura, por lo que las constantes de Stern-Volmer también decrecieron bajo el mismo patrón e indicando

la presencia de un apagamiento de tipo estático, atribuible a la formación de complejo BSA-H₂T(p-COOH)PP no fluorescente.

Por el contrario, a pH 8.5 se observó un incremento importante del apagamiento de BSA con el aumento de la temperatura (figura 3.28). En este caso la carga de las especies COO⁻ disociadas a pH 8.5 deben de influir en la efectividad y el mecanismo de apagamiento; posiblemente al presentarse un efecto de repulsión de cargas con algún aminoácido cercano a los residuos de triptófano. Siendo más relevante este proceso al aumentar la temperatura, dado que se incrementa la incidencia de choques y transferencia de energía entre las especies BSA y H₂T(p-COOH)PP. Se asume, entonces que únicamente a pH 7 se presenta la unión entre las especies mencionadas comprobado por medio de un apagamiento de tipo estático. En la tabla 3.3 se muestran los valores de K_{SV} a pH 7 y 8.5.

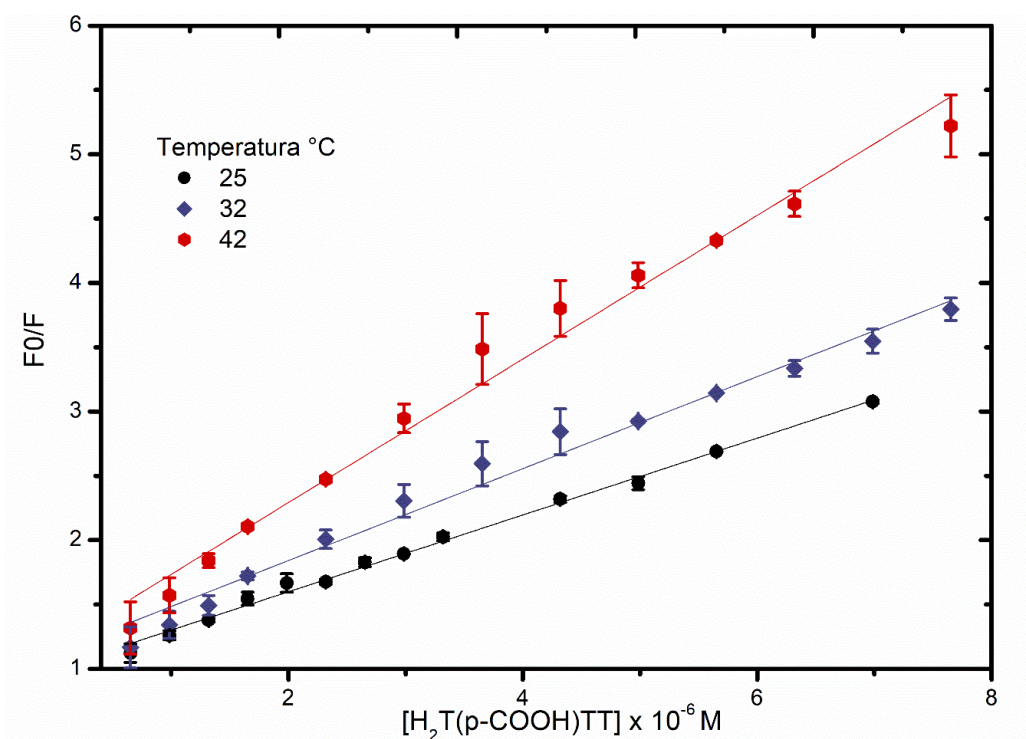


Figura 3.28. Gráfico de Stern-Volmer de las titulaciones BSA-H₂T(p-COOH)PP a pH 8.5. Se observa la linealidad del modelo en el intervalo de concentraciones mostrado

Tabla 3.3. Valores de K_{SV} del sistema BSA- $H_2T(p-COOH)PP$ a diferentes valores de pH

pH	T °C	$K_{SV} \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	R^2
BSA- $H_2T(p-COOH)PP$ 7	25	6.35 ± 0.28	0.9845
	31	0.48 ± 0.03	0.9678
	42	0.41 ± 0.02	0.9718
8.5	25	3.00 ± 0.065	0.9944
	37	3.65 ± 0.140	0.9961
	41	5.63 ± 0.220	0.9834

3.5.2 Determinación de la constante de unión y estequiometría de la unión del sistema BSA- $H_2T(p-COOH)PP$

En el caso de interacciones de apagamiento estático y asumiendo que todos los sitios de unión son iguales e independientes en BSA, los datos de intensidad de fluorescencia pueden ser usados para obtener el número de sitios y la constante de unión entre BSA- $H_2T(p-COOH)PP$ utilizando la ecuación [2]. Para ello se graficó el logaritmo de $(F_0-F)/F$ en función del logaritmo de la concentración de $H_2T(p-COOH)PP$, únicamente para los datos de las titulaciones a pH 7 (figura 3.29).

Los valores obtenidos de n y K_u , calculados a partir de la pendiente y la ordenada al origen de la ecuación [2], se muestran en la tabla 3.3. En base a estos datos se establece que la estequiometría de unión entre BSA- $H_2T(p-COOH)PP$ es 1:1, dado que el número de sitios de unión fluctuó ligeramente por encima de 1 a las temperaturas de 25 y 31 °C. En el caso de la titulación a 42 °C se observó que tanto el número de sitios de unión y la constante se redujeron considerablemente, haciendo ver que el complejo se disocia de manera importante a esta temperatura. Los altos valores de K_u (tabla 3.4) principalmente a 25 °C indican que el complejo formado es termodinámicamente muy estable, y el orden de magnitud de estas; especialmente a pH 7 se encuentra en el intervalo de interacciones fuertes.

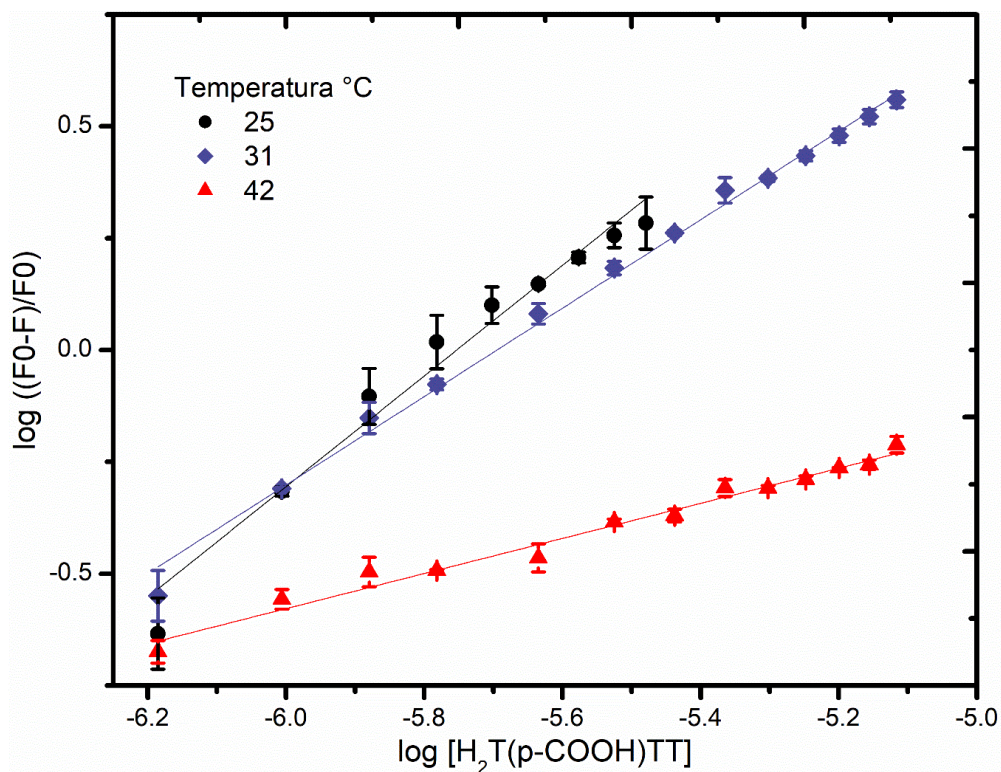


Figura 3.29. Gráfico de $\log (Fo-F)/F$ en función del logaritmo [macrociclo] para la determinación de la estequiometría y la constante de unión del sistema BSA- $H_2T(p-COOH)PP$ a los valores de pH de 7. Las líneas rectas fueron ajustadas por mínimos cuadrados

Tabla 3.4. Parámetros de unión para el sistema BSA- $H_2T(p-COOH)PP$ a diferentes valores de pH.

pH	T °C	n	$K_u \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$	R^2
7	25	1.26	19.5 ± 1.23	0.9862
	37	1.00	0.49 ± 0.01	0.9946
	41	0.39	0.26 ± 0.01	0.9787

3.5.3. Estudios de la interacción BSA-clorina e6-a por UV-Vis

En el seguimiento de la interacción del sistema BSA-clorina e6 por UV-Vis se observó el mismo patrón de respuesta visto en la especie $H_2T(p-COOH)PP$. Es decir, se presentó un aumento de la absorción a los 276 y 275 nm a pH 7 y pH 8 respectivamente (figuras 3.30 y 3.31). De igual manera esto indica un cambio en el ambiente de los residuos aromáticos de BSA. Además, durante la titulación con BSA fue notorio un desplazamiento hipsócronico de los 418 a los 406 a pH7 y de los 413 a los 407 nm a pH 8.5, en función del aumento de la concentración del ligando.

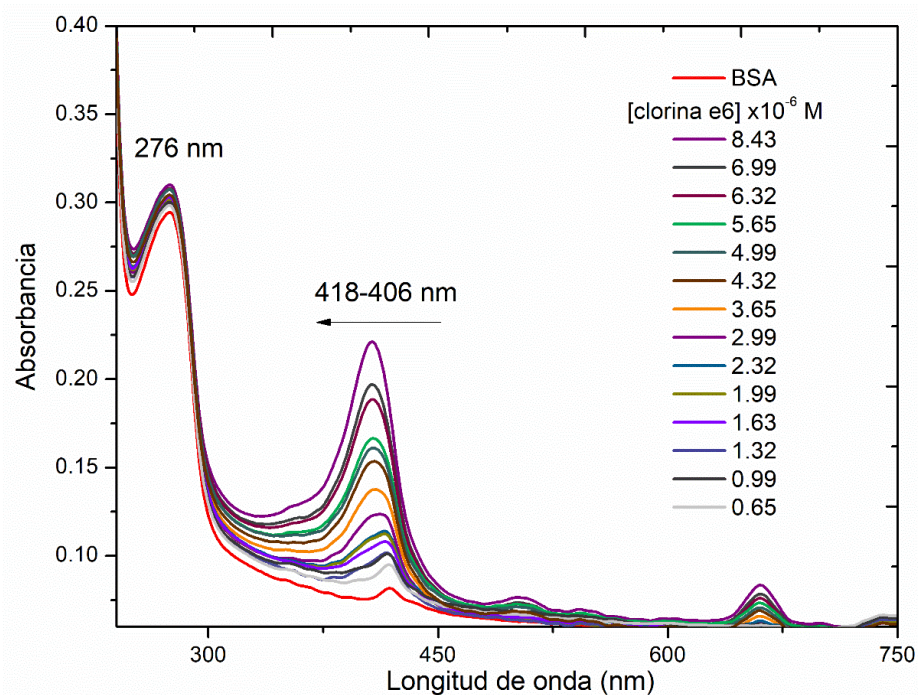


Figura 3.30. Espectro UV-vis de la titulación de BSA- clorina e6 en solución amortiguadora de etanol-fosfatos 50 mM pH 7

E igualmente nos puede indicar como en el caso de la especie $H_2T(p-COOH)PP$, que existe una mayor concentración de ligando libre conforme se van saturando el o los sitios de unión en BSA.

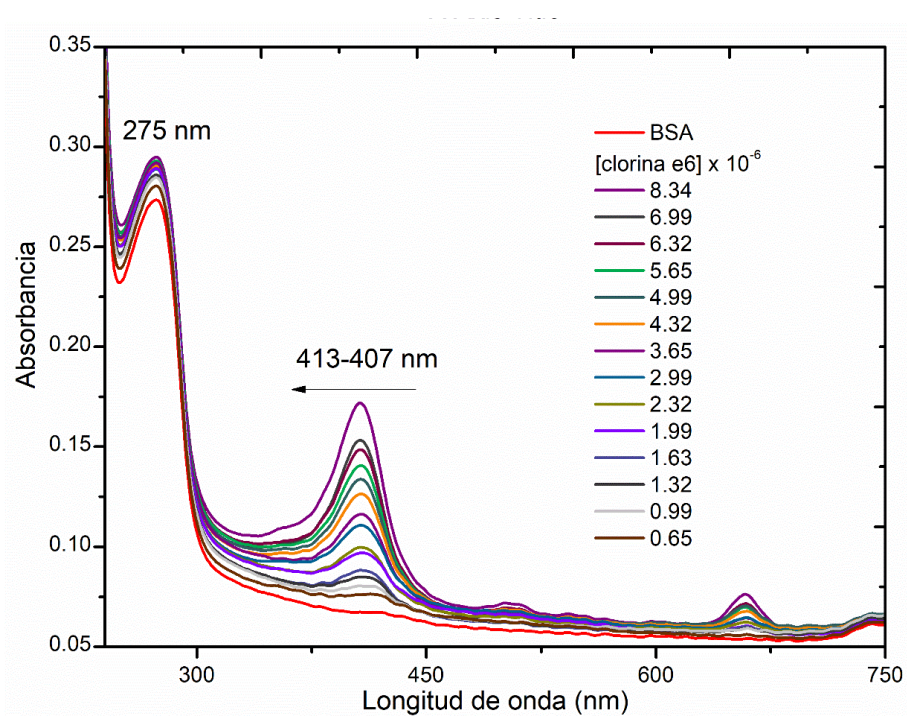


Figura 3.31. Espectro UV-vis de la titulación de BSA- clorina e6 en solución amortiguadora de etanol-fosfatos 50 mM pH 8.5

3.5.4. Estudios espectrofluorométrico de la interacción BSA-Clorifilina a

En el caso de la especie clorina e6 también fue notorio una disminución progresiva en la intensidad de fluorescencia de BSA durante las titulaciones a los dos diferentes pHs de estudio. Al igual que con $H_2T(p-COOH)PP$, en la respuesta conforme al espectro de fluorescencia (figura 3.32 y 3.33) tampoco fue visible un desplazamiento del máximo de emisión de BSA a los 330 nm, por lo que se infiere que durante la interacción entre ambas especies muy probablemente no estén ocurriendo cambios conformacionales importantes en BSA.

A diferencia de $H_2T(p-COOH)PP$, al ajustar los datos de las titulaciones tanto a las diferentes temperaturas, así como, a los dos diferentes pH de estudio, se observó la linealidad del gráfico de Stern-Volmer en todo el intervalo de concentraciones empleado. De esta manera se establece que solo se presenta un solo tipo de apagamiento (figuras 3.34 y 3.35).

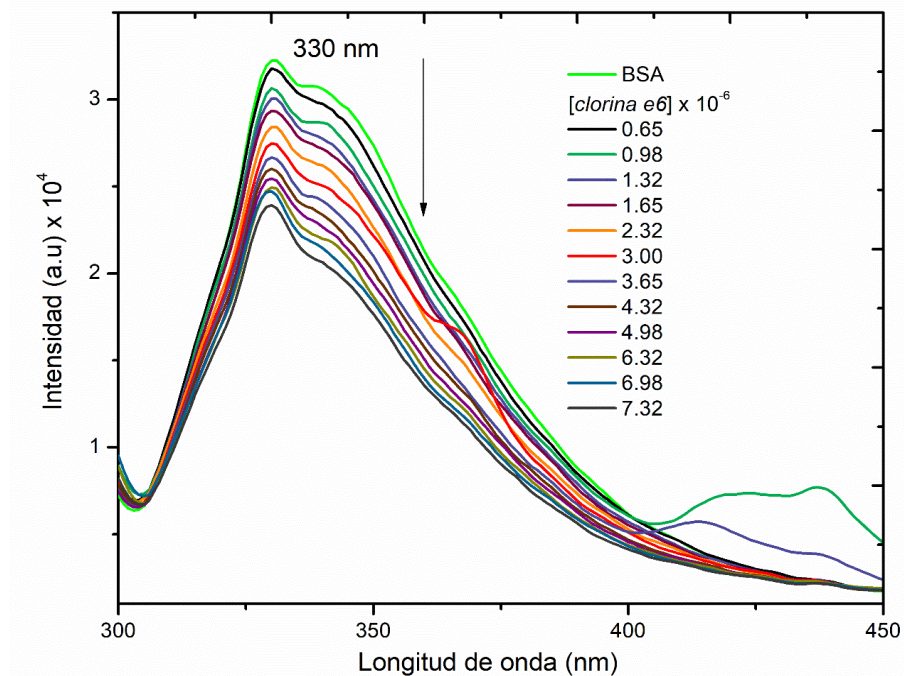


Figura 3.32. Espectro de la titulación espectrofluorotométrica de BSA con clorina e6 en solución amortiguadora etanol-fosfatos pH 7 $\lambda_{exc} = 295$ nm.

Sin embargo, las constantes de K_{SV} son de un orden de magnitud menores a comparación con $H_2T(p-COOH)PP$, sugiriendo que la efectividad del apagamiento es menor y son necesarias concentraciones mayores de clorina e6 para observar efectos similares.

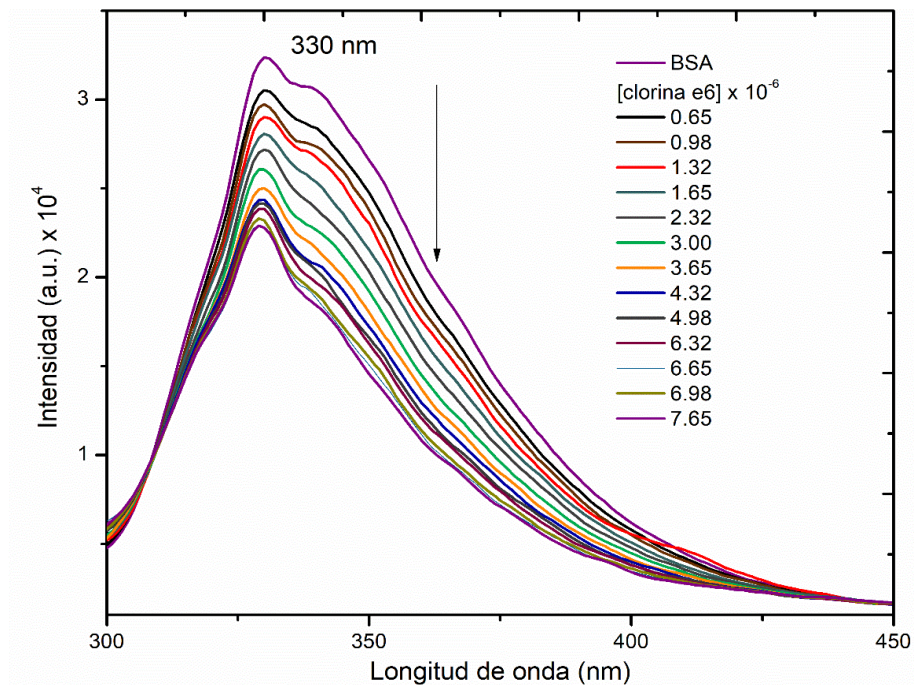


Figura 3.33. Espectro de la titulación espectrofluorométrica de BSA con clorina e6 en solución amortiguadora etanol-fosfatos pH 7 $\lambda_{exc} = 295$ nm.

A pH menores de 5 la *clorina e6* forma agregados [90], sin embargo, en el intervalo de pH estudiado pueden existir en equilibrio diversas especies ionizadas, ya que tanto los ácidos carboxílicos en la periferia del anillo, así como los nitrógenos pirrólicos pueden llegar principalmente a desprotonarse. Para fines prácticos se asume que tanto a pH 7 como de pH 8.5 debe de existir una concentración similar de especies disociadas en la forma de COO^- dado que hay tres grupos carboxílicos presentes en la estructura de *clorina e6*. Es bien conocido que las interacciones intermoleculares en BSA son favorecidas por un ambiente hidrofóbico, seguido de puentes de hidrógeno y en menor medida las de carácter electrostático [61]. Al Determinar las constantes de Stern-Volmer (tabla 3.5) se observa un decremento de esta a ambos pH, solo desde 25 a 31 °C y vuelve a incrementarse a 42 °C, lo cual puede indicar que a esta temperatura el apagamiento observado es dinámico y posiblemente se pueda comprobar con valores bajos en las constantes de unión.

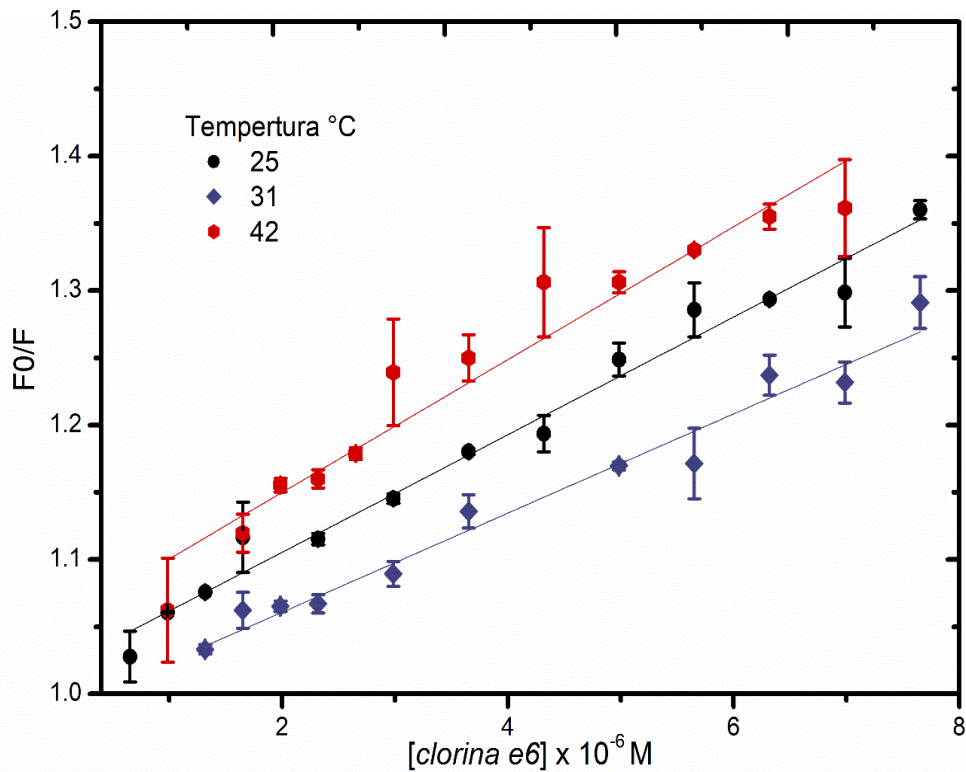


Figura 3.34. Gráfico de Stern-Volmer de las titulaciones BSA-clorina a pH 7. Se observa la linealidad del modelo en el intervalo de concentraciones mostrado

De forma contraria a la especie $H_2T(p-COOH)PP$, la efectividad del apagamiento de clorina e6 sobre BSA es menor. En cambio, los valores de K_{SV} en este caso son solo ligeramente mayores a pH de 8.5. Por lo que no se observan diferencias significativas atribuibles al efecto del pH sobre la interacción con BSA. Como se mencionó con anterioridad el apagamiento observado a los dos diferentes pH son de carácter estático, consecuentemente es posible determinar la constante de unión y el número de sitios unión a través de la ecuación modificada de Stern Volmer.

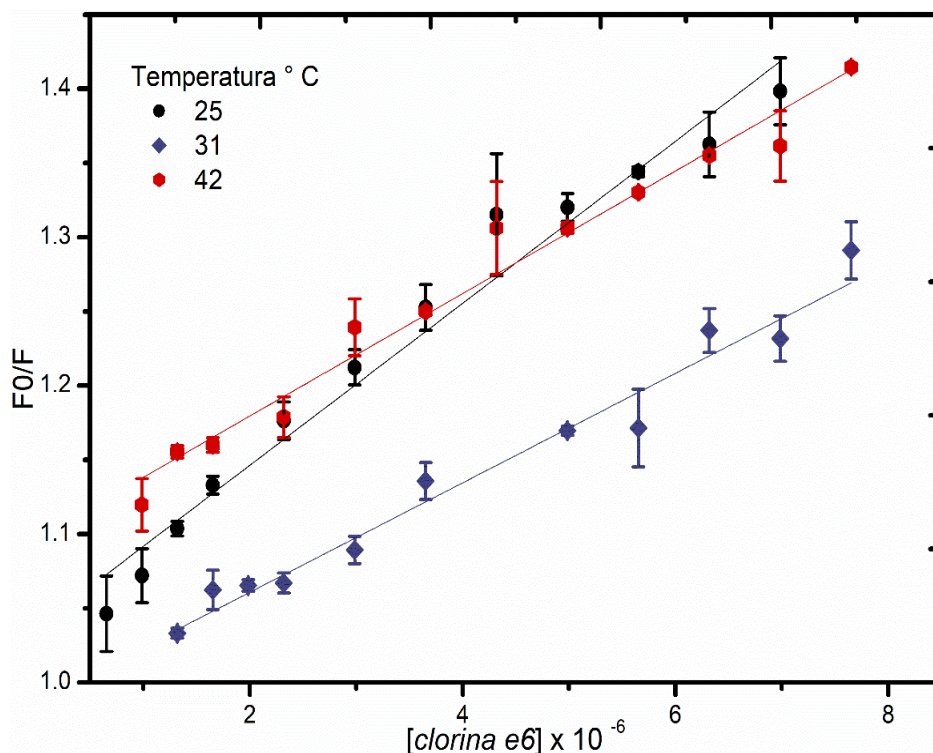


Figura 3.35. Gráfico de Stern-Volmer de las titulaciones BSA-clorina e6 a pH 8.5. Se observa la linealidad del modelo en el intervalo de concentraciones mostrado

Tabla 3.5. Valores de K_{SV} del sistema BSA-clorina e6 a diferentes valores de pH

pH	T °C	$K_{SV} \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$	R^2
BSA- Clorina e6 7	25	4.38 ± 0.18	0.9893
	31	3.71 ± 0.21	0.9895
	42	3.21 ± 0.40	0.9818
8.5	25	5.51 ± 0.29	0.9703
	37	3.77 ± 0.27	0.9695
	41	4.13 ± 0.28	0.9727

3.5.5 Determinación de la constante de unión y estequiometría de la unión del sistema BSA-Clorina e6

Establecido la formación de un complejo no fluorescente BSA-clorina e6, los parámetros de unión K_u y n pueden ser obtenidos gráficamente por medio del gráfico del doble logaritmo de Stern-Volmer (figuras 3.36 y 3.37). Al igual que sucedió con el apagamiento; la constante de unión para clorina e6 a los dos diferentes pH de estudio es de dos órdenes de magnitud más baja que para la especie $H_2T(p\text{-COOH})PP$ (tabla 3.6). Al igual que disminuyó el valor de las constantes de unión

conforme el aumento de temperatura, también decreció el valor numérico del número de sitios de unión “n”. Conforme a los valores de “n” de entre 0.77 y 0.90 para el caso de pH 7 y 0.89, 0.92 a pH 8.5 a las temperaturas de 25 y 31 °C respectivamente se establece que la estequiometría de unión BSA y clorina e6 es 1:1. Resultados que están en concordancia con el número de sitios permisibles en BSA para estructuras biológicas relacionadas al núcleo porfirínico. Al observarse un decremento sustancial en el valor de la constante de unión a la temperatura de 42 °C tanto a pH 7 como de 8.5, se plantea que se presenta una disociación importante del complejo BSA-clorina e6 y dan soporte a la idea de que a esta temperatura el fenómeno de apagamiento es únicamente de tipo dinámico. El orden de magnitud de K_u de 10^4 a las temperaturas de 25 y 31°C, se encuentra dentro del intervalo de interacciones moderadas.

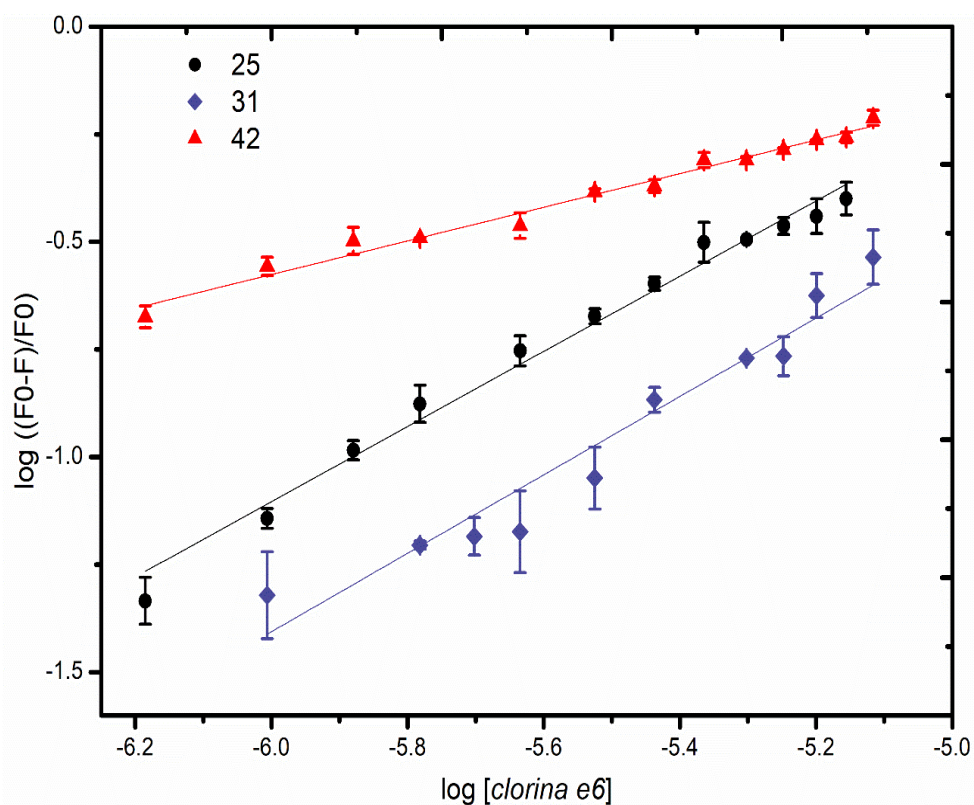


Figura 3.36. Gráfico de $\log ((F_o-F)/F)$ en función del logaritmo [clorina e6] para la determinación de la estequiometría y la constante de unión del sistema BSA- clorina e6 a de pH 7. Las líneas rectas fueron ajustadas por mínimos cuadrados

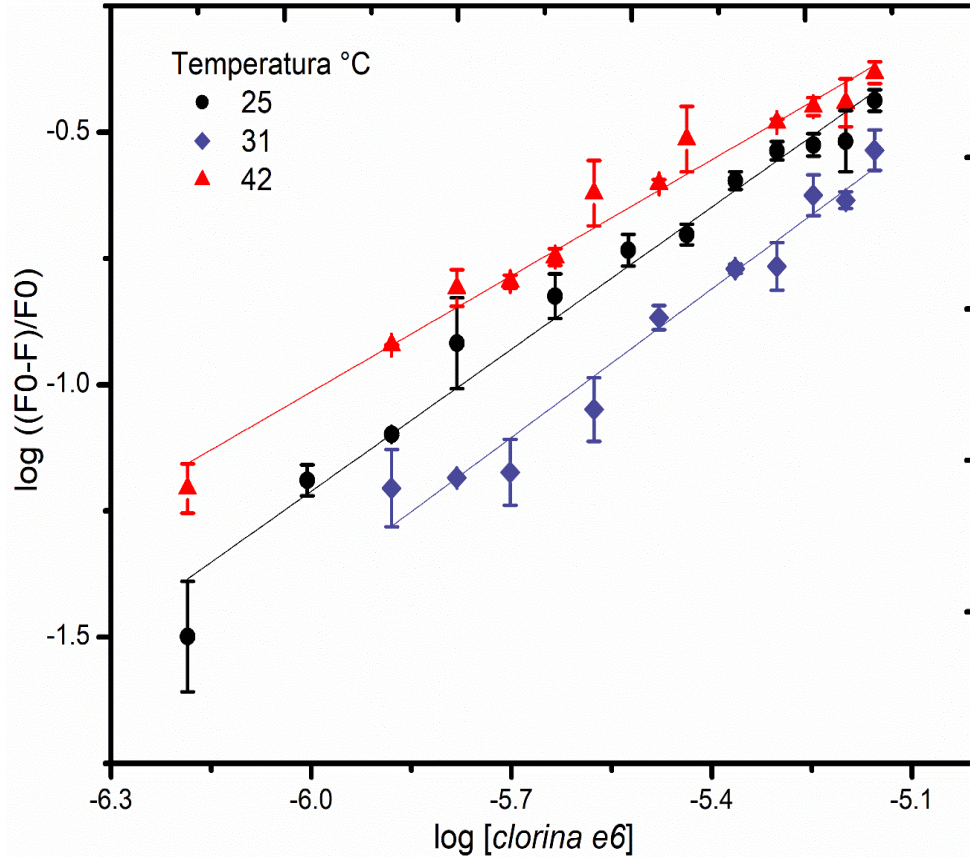


Figura 3.37. Gráfico de $\log ((F_0-F)/F_0)$ en función del logaritmo [clorina e6] para la determinación de la estequiometría y la constante de unión del sistema BSA- clorina e6 a de pH 7. Las líneas rectas fueron ajustadas por mínimos cuadrados

Tabla 3.6. Parámetros de unión para el sistema BSA- clorina e6 a diferentes valores de pH

pH	T °C	n	$K_u \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$	R^2
7	25	0.94	2.89 ± 0.02	0.9917
	31	0.81	2.81 ± 0.02	0.9803
	41	0.77	0.42 ± 0.03	0.9831
8.5	25	0.89	1.70 ± 0.07	0.9855
	31	0.92	1.35 ± 0.13	0.9395
	41	0.40	0.005 ± 0.0003	0.9803

3.5.6 Análisis termodinámico de la interacción BSA-H₂T(p-COOH)PP y BSA-clorina e6

Generalmente las moléculas pequeñas o ligandos se unen a proteínas por medio de cuatro modos de unión: Puentes de hidrógeno, van der Waals, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. El signo y la magnitud de los parámetros termodinámicos ΔH y ΔS en interacciones proteína-ligando determinan la formación y estabilidad del complejo. Ross and Subramanian [91] han relacionado el signo y la magnitud de estos parámetros a procesos que involucran asociaciones proteína-ligando, es decir se presentan tres tipos de relaciones termodinámicas: (1) valores positivos de ΔH y ΔS , son tomados frecuentemente como evidencia de interacciones de tipo hidrofóbico, (2) En cambio, valores negativos, tanto de ΔS como de ΔH , son indicativo de que la interacción está gobernada por fuerzas de van der Waals o puentes de Hidrógeno, (3) Valores negativos de ΔH y valores positivos de ΔS se presentan mayormente interacciones electrostáticas. Los parámetros termodinámicos ΔH y ΔS de unión se obtuvieron a partir de la pendiente y ordenada al origen, respectivamente de los gráficos de van't Hoff (figura), asumiendo que ΔH y ΔS son independientes de la temperatura en el intervalo de estudio.

De acuerdo a los valores negativos de ΔH_u y ΔS_u (tabla), para los complejos: BSA-H₂T(p-COOH)PP BSA-clorina e6 y, se observa que la estabilidad de ambos complejos se da a través de una combinación de interacciones de van der Waals y puentes de hidrógeno. Los valores de energía libre de unión ΔG_u demuestran que la interacción puede ocurrir espontáneamente. Sin embargo, la magnitud de ΔG_u para complejos con clororina e6 son muy similares a los dos pH de estudio, lo que sugiere que el factor del pH no afecta la asociación en este intervalo de temperaturas. En base a los datos obtenidos, se puede sugerir que el derivado de tetrafenil porfirina establece un mayor número de interacciones que pudiesen aportar una mayor contribución a la asociación con BSA en comparación con clororina e6.

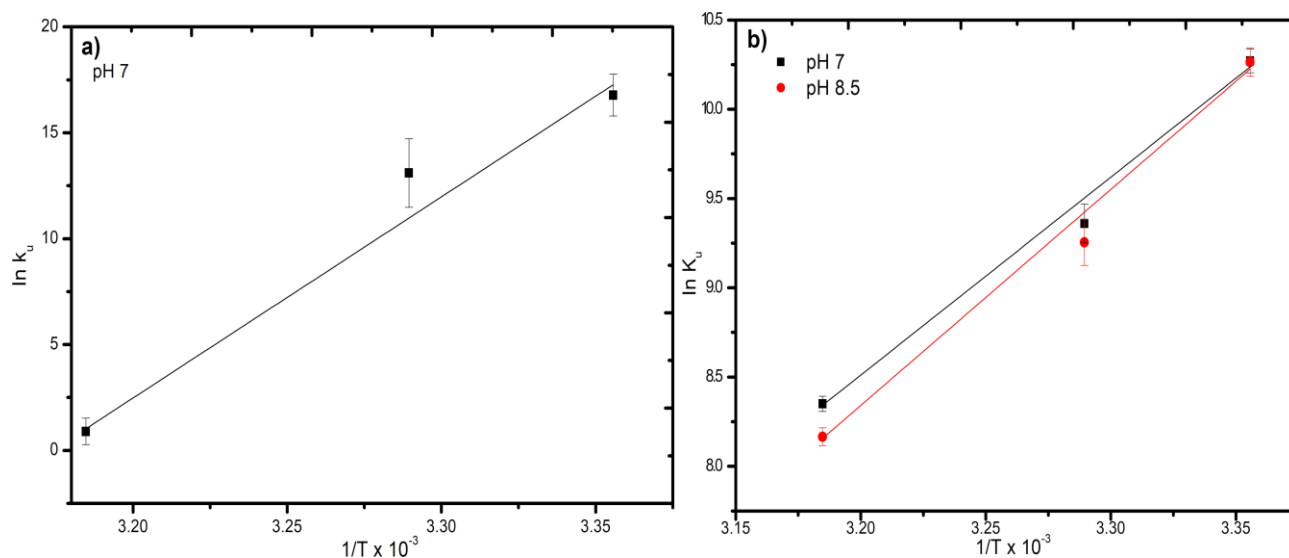


Figura 3.38. Gráfico de van't Hoff para la interacción (a) BSA-H₂T(*p*-COOH)PP y (b) BSA-clorina e6

Table 5. Parámetros termodinámicos de los sistemas BSA-H₂T(*p*-COOH)PP y BSA-clorina e6

Sistema	pH	Temperatura (°C)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol K)	* ΔG (kJ/mol)
BSA- H ₂ T(<i>p</i> -COOH)PP	7	25	-789.9	-2505.9	-41.57
		31			-33.11
		41			-2.350
BSA-clorina e6	7	25	-98.84	-242.7	-25.45
		31			-25.89
		41			-23.51
BSA-clorina e6	8.5	25	-83.90	-181.10	-25.42
		31			-21.10
		41			-21.58

3.6 Enfoque computacional; estudios de acoplamiento molecular

Los análisis experimentales junto con las simulaciones por acoplamiento molecular en estudios de interacción proteína-ligando nos proveen un mayor entendimiento del tipo de interacciones intermoleculares que gobiernan dichos procesos. Los estudios *in silico* para los sistemas BSA-H₂T(*p*-COOH)PP y BSA-clorina e6 se realizaron considerando toda la superficie de la proteína, sin embargo, se realizó un monitoreo más exhaustivo en el sitio III de BSA [66]. Esto, debido a que es el sitio de unión a ligandos endógenos estructuralmente relacionados al núcleo porfirínico como Hemina, bilirrubina etc. Con base al apagamiento de fluorescencia de BSA

observado en los estudios experimentales, también se llevó a cabo un monitoreo enfocado en las proximidades del residuo de *Trp* 134, El intervalo de energías obtenidas fue de -29.68 a -21.32 kJ/mol para el sistema kJ/mol BSA-H₂T(p-COOH)PP y. En la figura 3.38 se muestra una fracción de todas las poses generadas sobre la superficie de BSA para ambos sistemas de estudio.

a)

b)

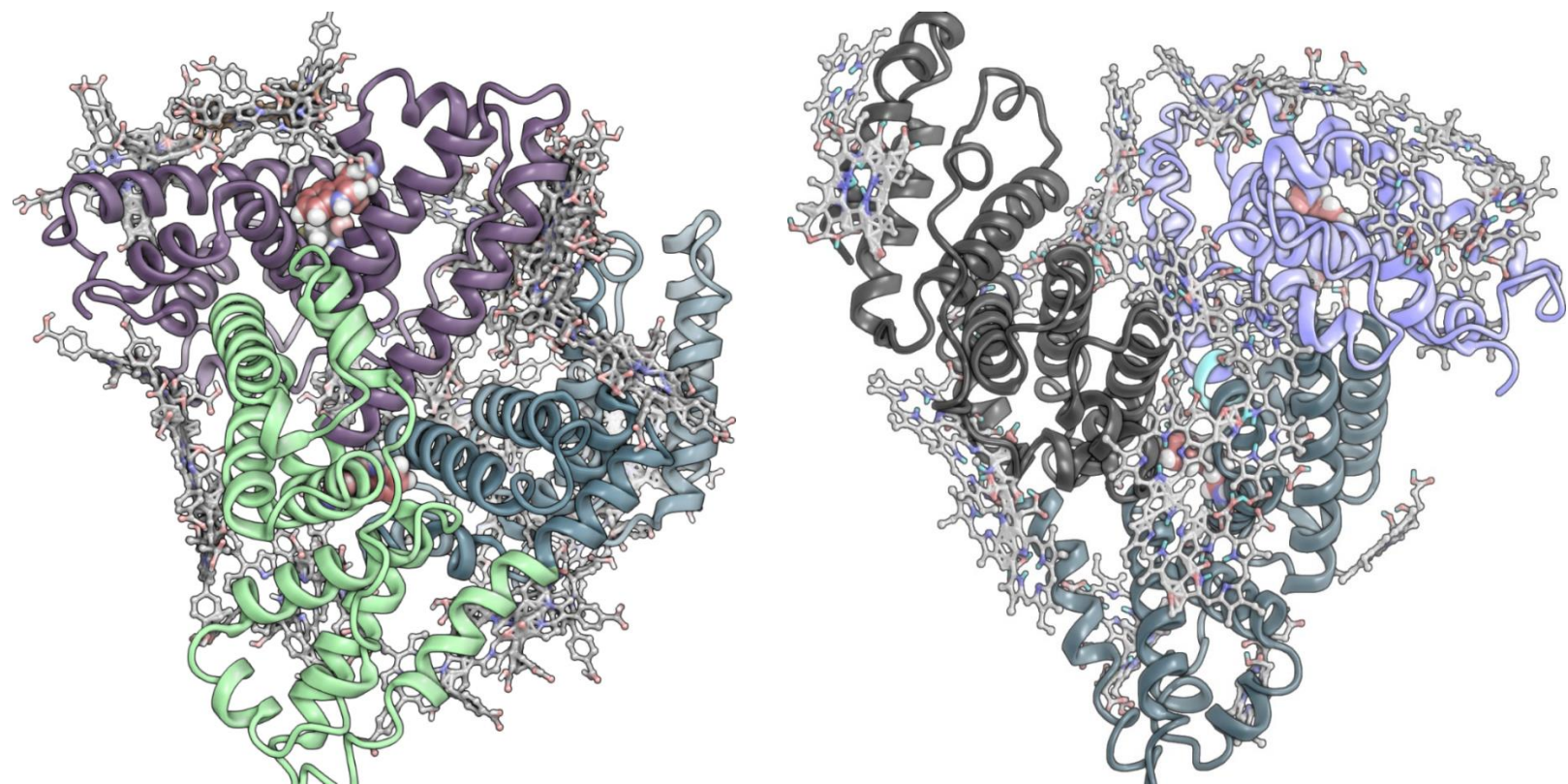


Figura 3.38. Poses generadas con el programa *autodockvina* para los sistemas a) BSA-H₂T(p-COOH)PP y b) BSA-clorina e6. Figuras realizadas con el software *Maestro* [92]

BSA-H₂T(p-COOH)PP

Para cada uno de los sistemas estudiados Se eligieron las dos poses de menor energía arrojadas por el programa *autodockvina*, las cuales se localizaron en la zona cercana al *triptófano* 134 (figura 3.39 y 3.40). Como se mencionó con anterioridad; las interacciones intermoleculares en BSA se favorecen principalmente en un ambiente de tipo hidrofóbico, seguido por puentes de hidrógeno y en menor medida por interacciones de tipo electrostático. Ahora bien, el núcleo porfirínico es predominantemente hidrofóbico, por lo que puede establecer interacciones de tipo no polar y posiblemente estas sean las de mayor contribución para dar estabilidad al complejo formado.

Además, esta especie cuenta con 4 grupos carboxilo (COOH), los cuales son capaces de establecer puentes de hidrógeno e interacciones; dipolo-dipolo, dipolo- dipolo inducido, es decir, que el acoplamiento pueden ser resultado conjunto de todas estas interacciones, pero sobre todo aquellas de tipo hidrofóbico y por puentes de hidrógeno (figura 3.41). La zona circunvecina al residuo de *Trp* 134 es de carácter apolar, sin embargo, hay una serie de aminoácidos polares como la lisina, glutamina y glicina que pueden incrementar la energía de interacción, generando un ambiente polar que puede estabilizar el complejo formado (figura 3.42).

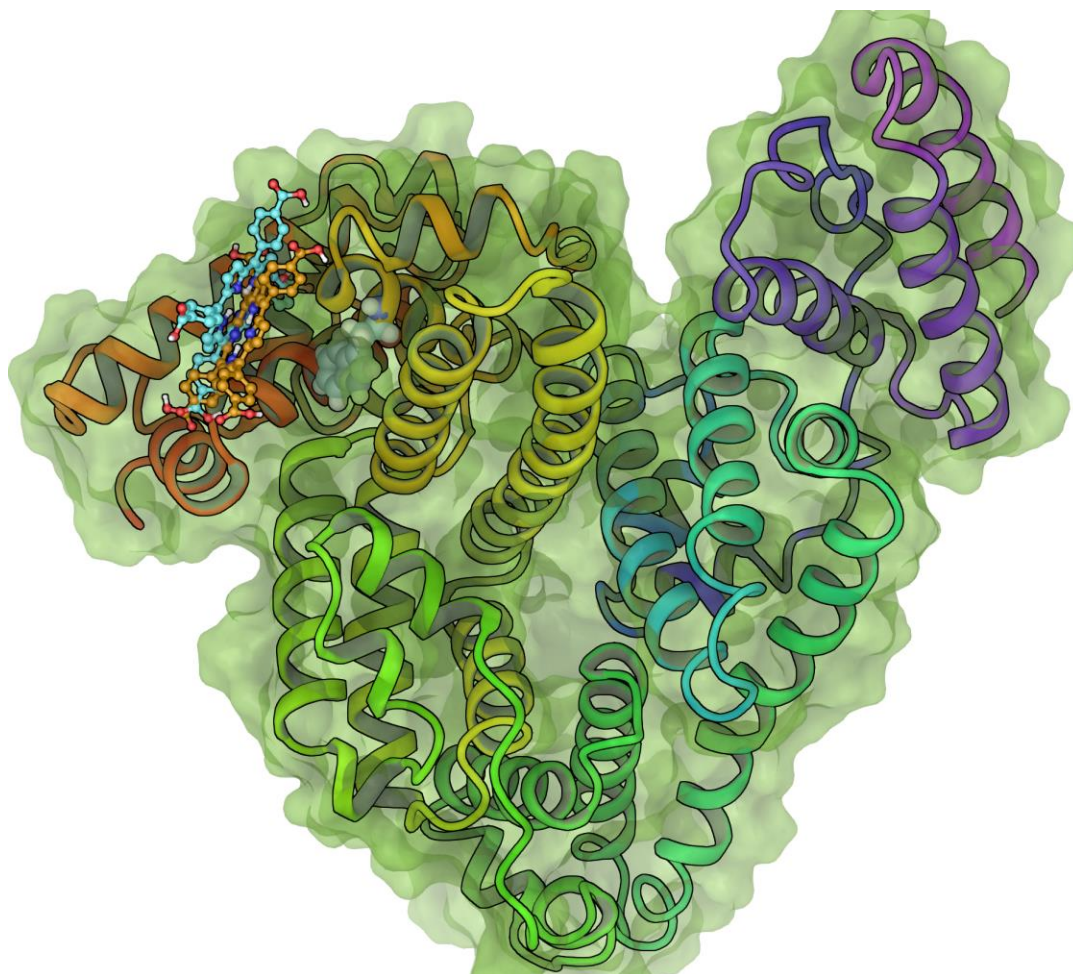


Figura 3.39. Poses de menor energía cercanas al residuo de *Trp* 134 generadas con el programa *Autodock Vina* para el complejo BSA-H₂T(p-COOH)PP

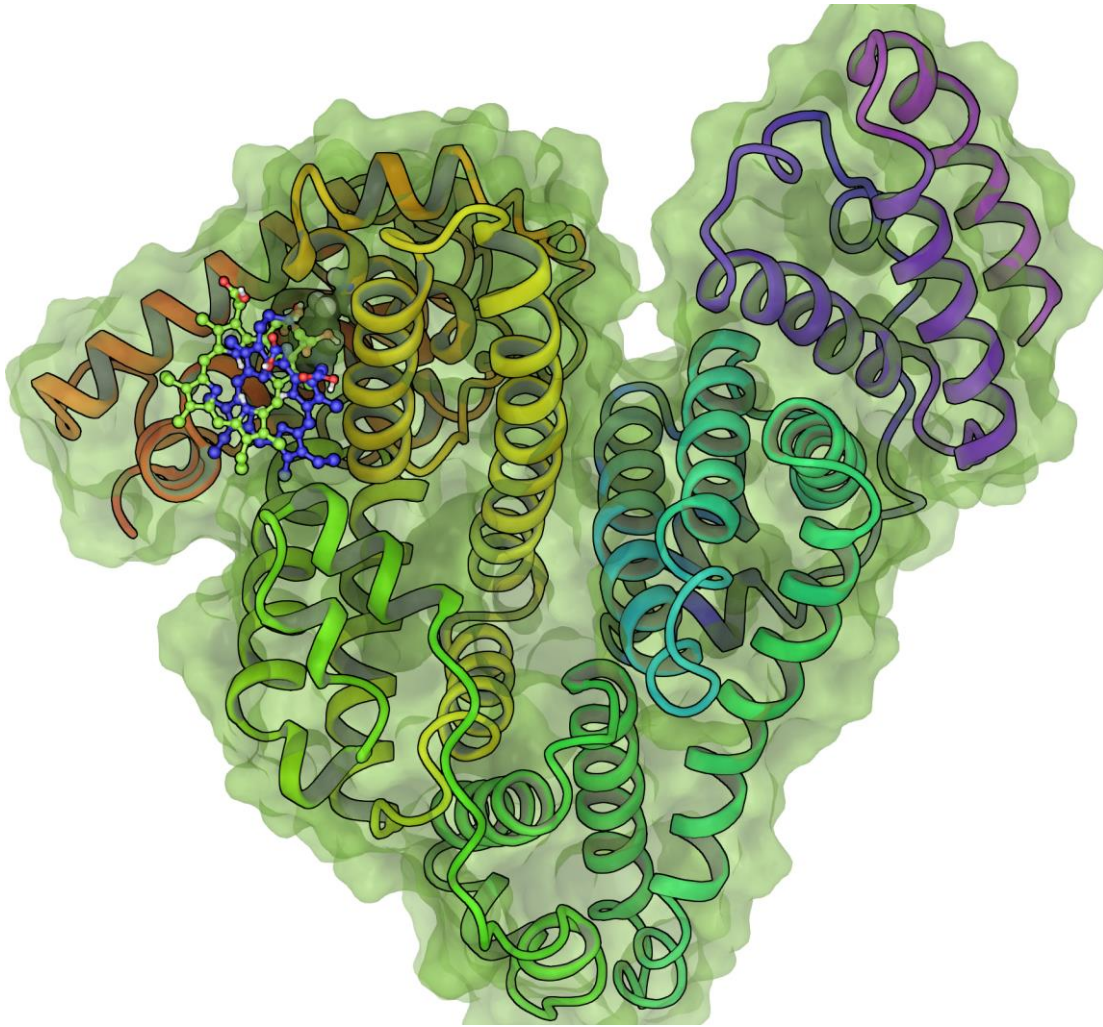


Figura 3.40. Poses de menor energía cercanas al residuo de *Trp 134* generadas con el programa *Autodock Vina* para el complejo BSA-clorina e6

Los diagramas en 2D de las figuras 3.42 y 3.44 muestran los puentes de hidrógeno y el ambiente propicio de interacción en el sistema BSA-H₂T(p-COOH)PP. En el caso del modelo 1 se presenta la formación de 2 puentes de hidrógeno de los grupos carboxilo con los residuos *Asn 42* y *Glu 14*. Además, dentro del ambiente de interacción se encuentran residuos polares como: lisinas, glutaminas que pueden favorecer la interacción con los grupos carboxilo de la porfirina. Aunque no se presenta una interacción directa con el *Trp 134*, las distancias para observar un apagamiento del triptófano son de hasta 15 Å (ligando-fluoroforo) [93], por lo que aun sin visualizar el residuo de *Trp 134* en los diagramas de las figuras 3.42 a y 3.44 el fenómeno de apagamiento es completamente factible de ocurrir, por lo que existe una correlación entre los datos experimentales y las simulaciones por medio de acoplamiento molecular.

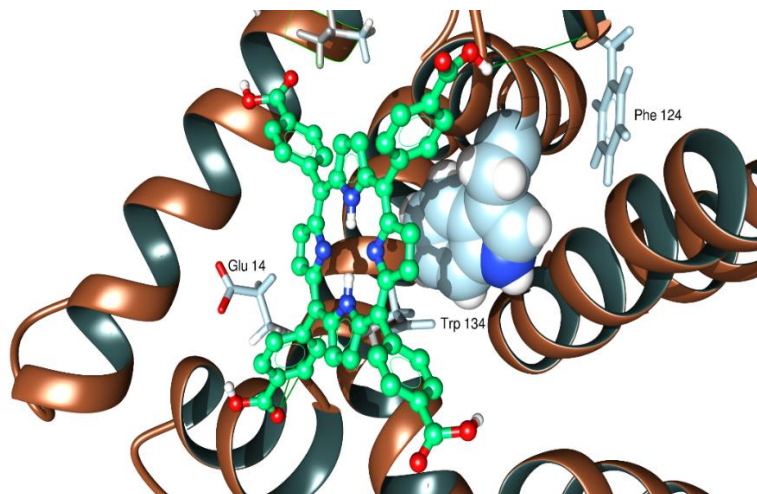


Figura 3.41. Modelo 1. Poses de menor energía cercanas al residuo de *Trp 134* generadas con el programa *Autodock Vina* para el complejo $H_2T(p-COOH)PP$. Figuras realizadas con el programa *UCSF chimera* [94]

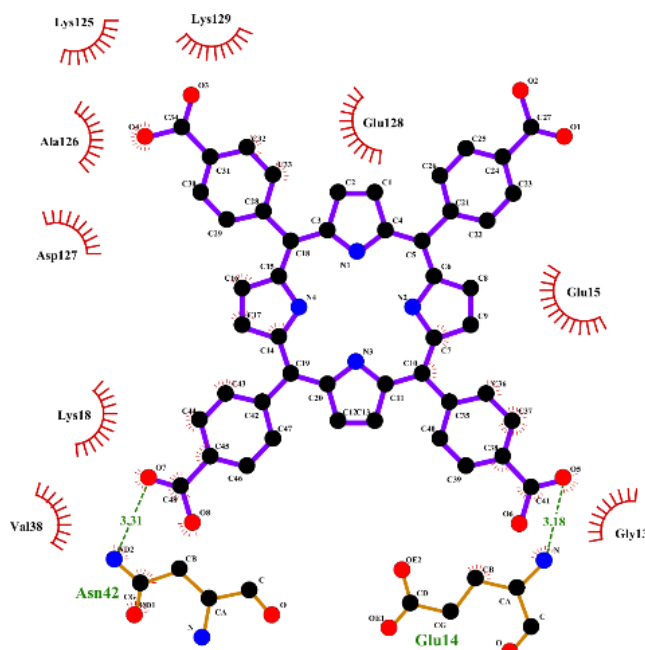


Figura 3.42. Modelo 1. Distancias y tipo de interacciones para el sistema $BSA-H_2T(p-COOH)PP$. Negro=Carbón, blanco = Hidrógeno, azul = Nitrógeno, rojo = Oxígeno. Los puentes de Hidrógeno formados, se observan como líneas verdes [95].

En cuanto al modelo 2 (figura 3.43), la especie $H_2T(p-COOH)PP$ establece tres puentes de hidrógeno con los residuos de *Glu 14*, *Val 38* y *Ala 26*, sin embargo, dos de esas interacciones se efectúan entre átomos de Oxígeno Val 3--OOC y *Ala 26--OOC* (figura 3.44) y podría presentarse una repulsión de cargas, por lo que es importante determinar la contribución electrostática a través de los cálculos de energía libre para descartar esta posibilidad. Nuevamente el residuo de *Trp-134* parece mantener una interacción débil entre el anillo de indólico del triptófano y la parte aromática central del macrociclo de porfirina.

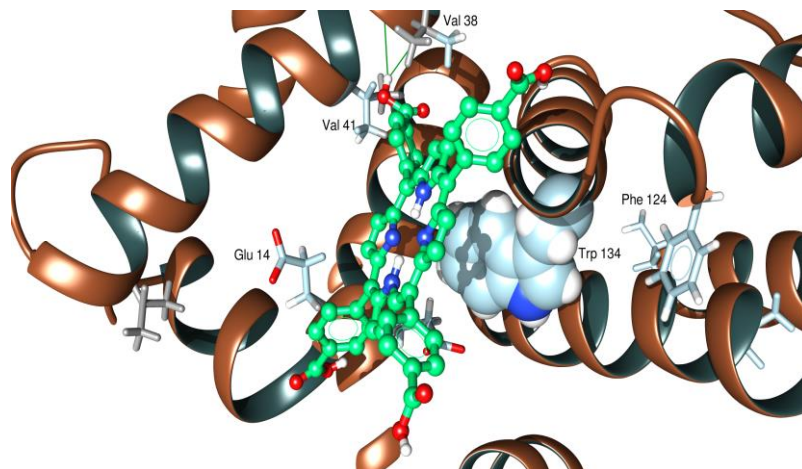


Figura 3.43. Modelo 2. Poses de menor energía cercanas al residuo de *Trp 134* generadas con el programa *Autodock Vina* para el complejo BSA-H₂T(p-COOH)PP

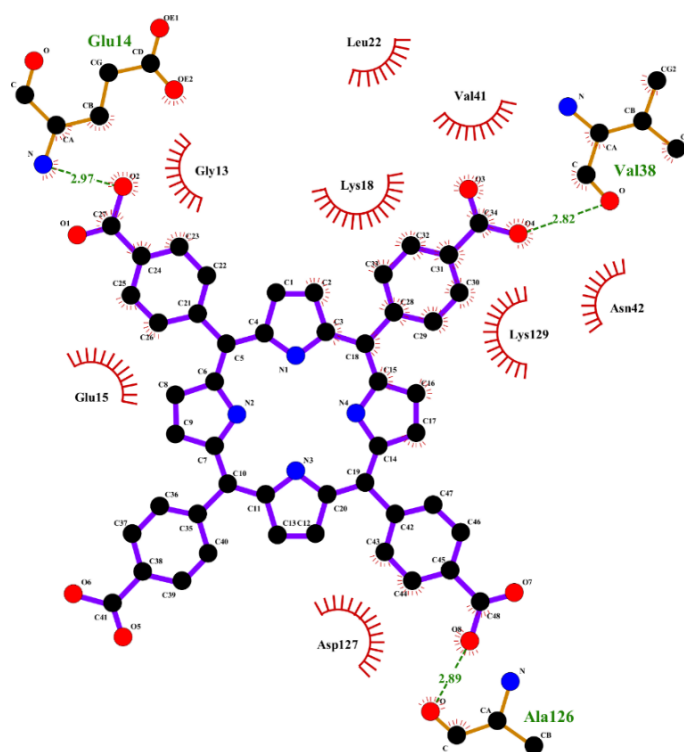


Figura 3.44. Modelo 2. Distancias y tipo de interacciones para el sistema BSA-H₂T(p-COOH)PP. Colores: Negro=Carbón, blanco = Hidrógeno, azul = Nitrógeno, rojo = Oxígeno. Los puentes de Hidrógeno formados se observan como líneas verdes

BSA-Clorina e6

La longitud de la cadena de los grupos carboxilo de la especie clorina e6 parecen tener mayor accesibilidad a la cavidad donde se encuentra el residuo de *Trp 134* (figura 3.45). El núcleo porfirínico de la clorina e6 seguramente establece interacciones de tipo hidrofóbico con los residuos de *Tyr 153*, *Pro 279* y *His 16*. Sin embargo, hay una serie de residuos que podrían estar generando

repulsión de cargas como la *lisina 157* cercana a los nitrógenos pirrólicos del núcleo porfirínico y *Gln 128*, el cual forma un puente de hidrógeno con un átomo de oxígeno del grupo carboxilo (figura 3.46). De igual manera es necesario determinar qué tan importantes son las contribuciones de tipo electrostático mediante los cálculos de energía libre.

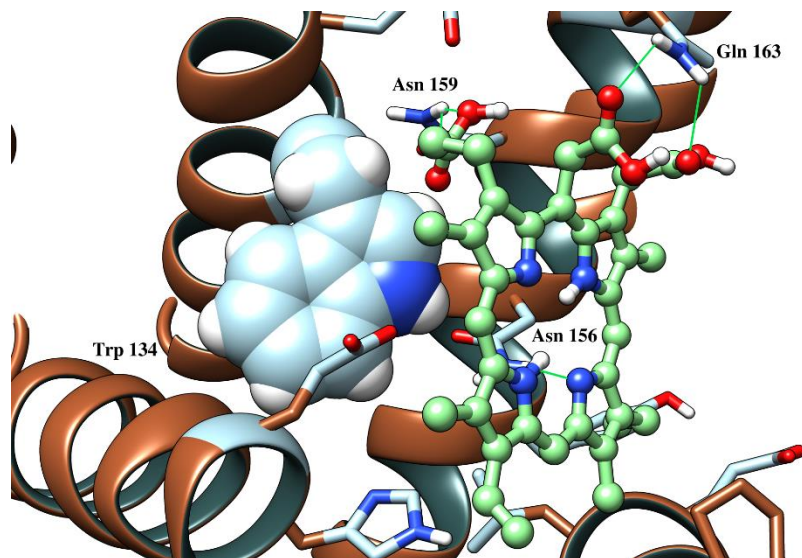


Figura 3.45. Poses de menor energía cercanas al residuo de *Trp 134* generadas con el programa *Autodock Vina* para el complejo BSA-H₂T(p-COOH)PP

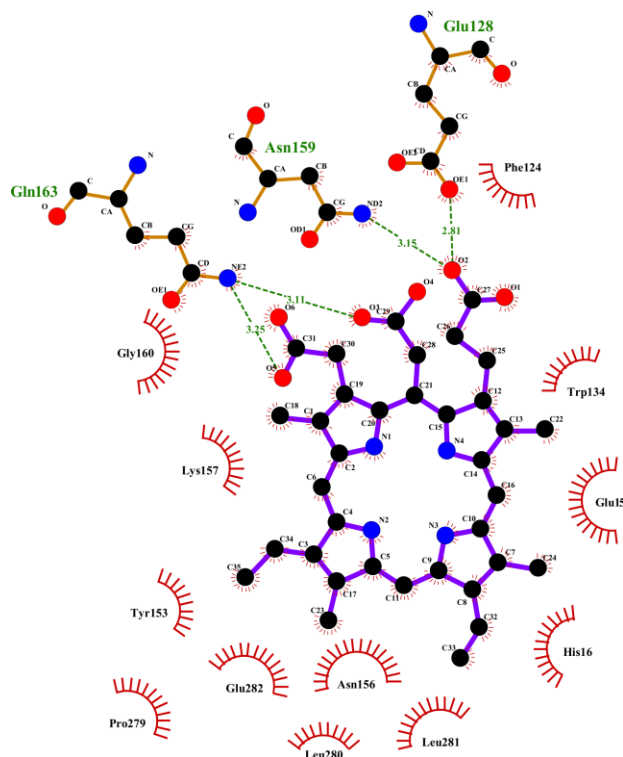


Figura 3.46. Modelo 1. Distancias y tipo de interacciones para el sistema BSA-clorina e6. Colores Negro=Carbón, blanco = Hidrógeno, azul = Nitrógeno, rojo = Oxígeno. Los puentes de Hidrógeno formados se observan como líneas verdes

En el caso del modelo 2, también se observa un acercamiento al residuo de *Trp 134* (figura 3.47), cuyo nitrógeno (en realidad el grupo N-H) del triptófano podría interaccionar vía puentes de hidrógeno con los protones de los grupos pirrol del macrociclo de Ce6. Así mismo, es visible una menor contribución de los residuos polares en la interacción con BSA (figura 3.48). Aunado a esto se observan tres residuos hidrofóbicos además de *Trp 134* que forman parte del ambiente de interacción en el sistema BSA-clorina e6, estos son *Phe 124*, *Pro 279* y *Leu 280* y se establece un puente de Hidrógeno con el residuo *Asn 159*.

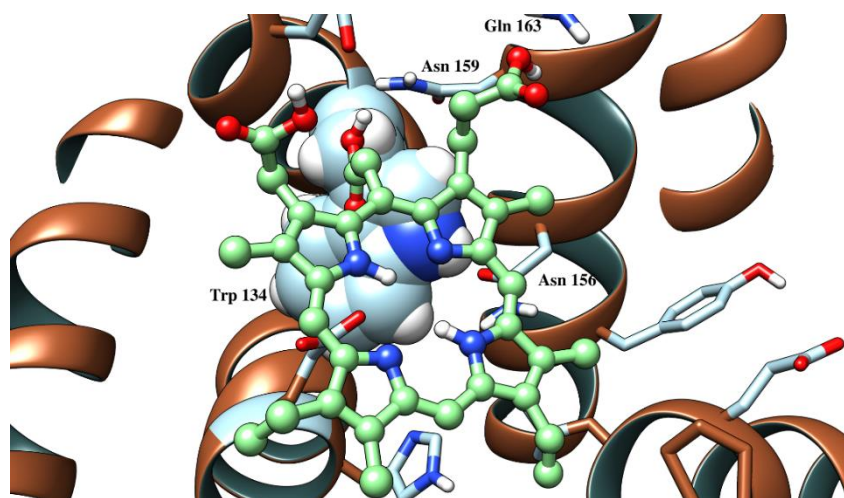


Figura 3.47. Modelo 2. Poses de menor energía cercanas al residuo de *Trp 134* generadas con el programa *Autodock Vina* para el complejo BSA-clorina e6

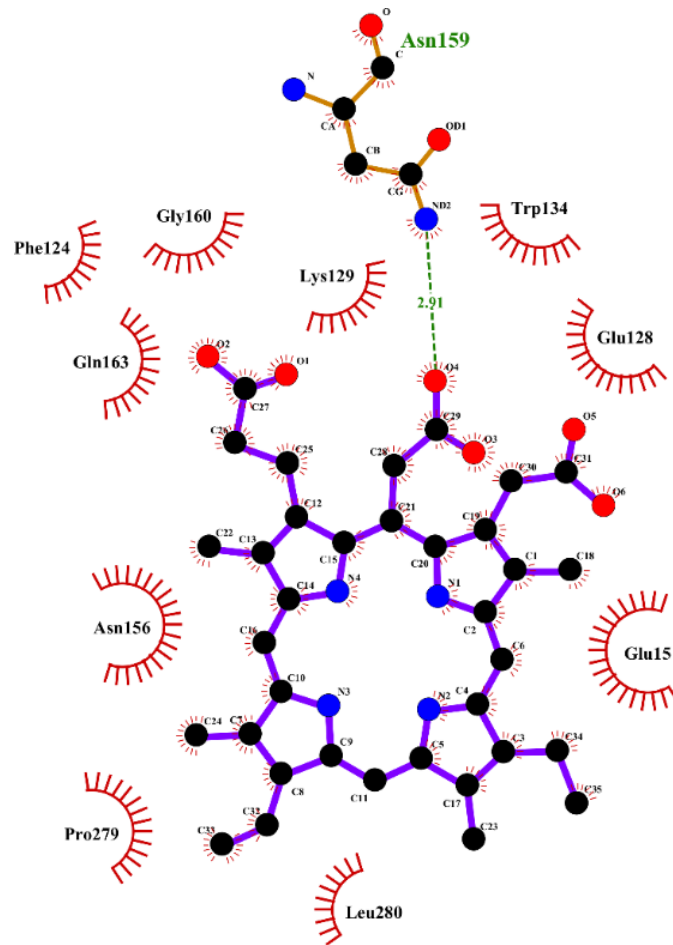


Figura 3.48. Modelo 2. Distancias y tipo de interacciones para el sistema BSA-clorina e6. Colores Negro=Carbón, blanco = Hidrógeno, azul = Nitrógeno, rojo = Oxígeno. Los puentes de Hidrógeno formados se observan como líneas verdes

Tabla 6. Distancia y tipo de interacción en los sistemas BSA-macrocielo tetrapirrólicos

Ligando	Residuo	Angulo del donador	Distancia Å	Tipo de interacción
H ₂ T(p-COOH)PP	Glu 14	114.38	3.18	Puente de Hidrógeno
	Asn 42	102.95	3.31	Puente de Hidrógeno
	Lys 18	-	3.76	π-Catión*
	Lys 18	-	5.26	Puente salino*
Clorina e6	Asn 159	-	2.91	Puente de Hidrógeno
	Pro 279	-	3.72	Hidrofóbica*
	Lys 129	-	5.25	Puente salino*

* referencia [96]

Los análisis *in silico* de acoplamiento molecular rígido reflejan una idea de las conformaciones adoptadas por ambos macrociclos tetrapirrólicos en la zona cercana al residuo *Trp 134*, así como los diferentes residuos cercanos con los que se pueden establecer interacciones estables o en su caso desfavorables. Aunque en el caso del derivado de tetrafenil porfirina no se observó la presencia del residuo de *Trp 134* en el ambiente de interacción, es factible que este residuo pueda tener rotaciones de enlace que le permitan adoptar una conformación que favorezca la interacción con esta especie. En ese sentido, se decidió realizar estudios *in silico* de acoplamiento molecular flexible (basado en el concepto que durante el proceso de muestreo o dockeo se considera que tanto el ligando, así como los residuos de interés de la proteína son entidades flexibles). Tomando como conformación de partida al modelo 1, dado que en ambos sistemas es el conformero de menor energía. Para tal efecto y en el caso de H₂T(p-COOH)PP se consideraron solo siete residuos del sitio de unión como entidades flexibles: *Glu 15, His 16, Phe 124, Glu 128, Trp 134, Tyr 153 y Lys 157*. Para el conformero correspondiente a la clorina e6 se consideraron ocho residuos del sitio III como residuos flexibles, los cuales son: *Glu 15, His 116, Phe 124, Glu 128, Trp 134, Tyr 153 y Lys 157*.

Acoplamiento molecular flexible

Algo destacable es que en el caso de la especie H₂T(p-COOH)PP el residuo de *Trp 134* adopta una conformación en la que se establece un acercamiento de 3.42 Å (figura) a un grupo fenilo del derivado de tetrafenil porfirina, distancia que es suficiente para definir que existe una transferencia de energía del sistema aromático del triptófano a un fenilo de la porfirina. Así mismo, se comprueba que, con los resultados de acoplamiento molecular rígido, este residuo se mantenía a una distancia

de alrededor de 9 Å, posiblemente como resultado del impedimento estérico de los residuos de *His 16* y *Tyr 153* hacia la especie $H_2T(p-COOH)PP$. Con los resultados de acoplamiento molecular flexible se observa que ambos residuos adoptan una conformación que permite un mayor acceso hacia el *Trp 134*, por lo que ahora se puede avalar una correlación con el apagamiento de fluorescencia observado por medio de los estudios experimentales.

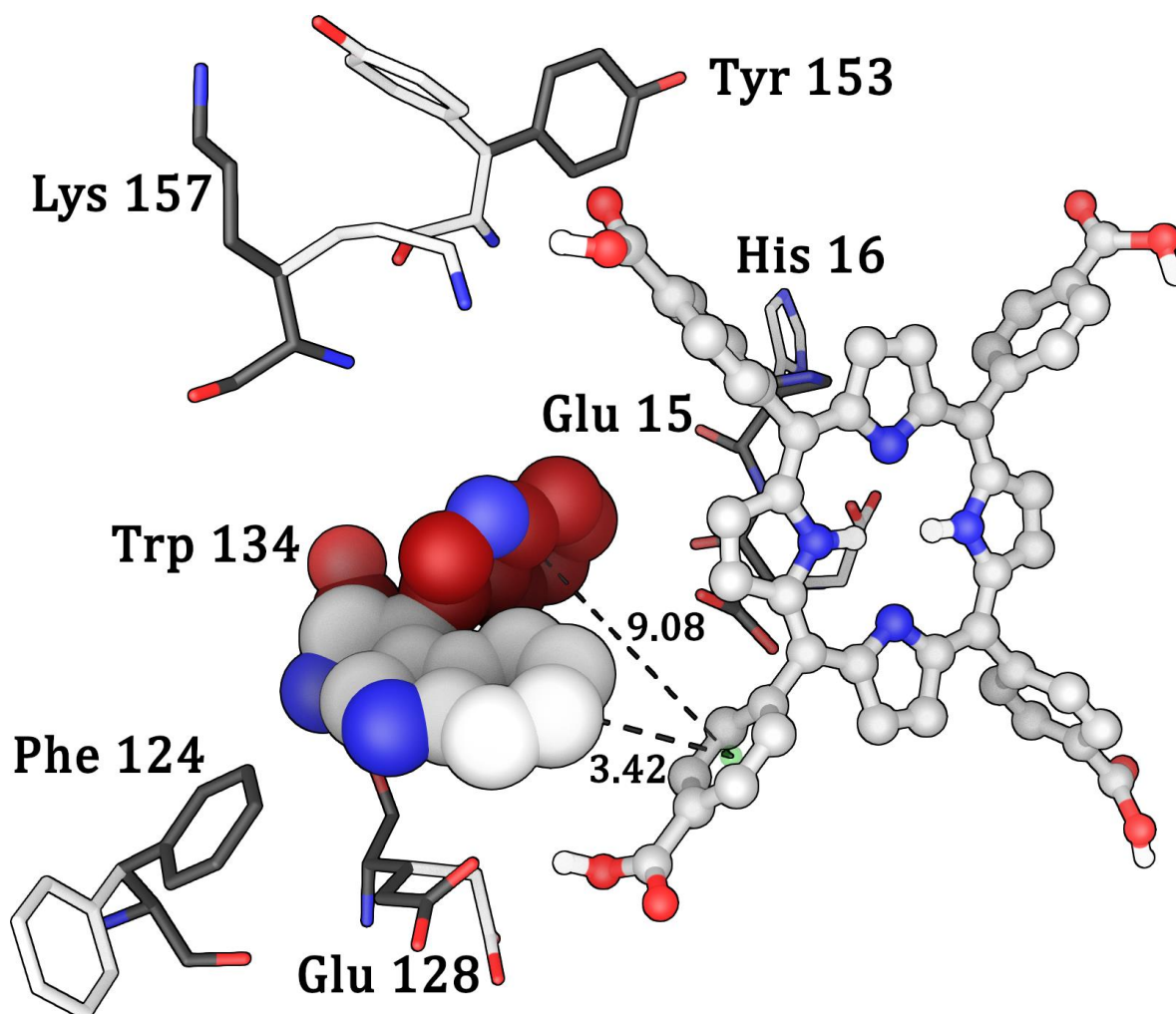


Figura 3.49. Modelo 2. Diagrama de interacción del acoplamiento molecular flexible para el sistema BSA- $H_2T(p-COOH)PP$. Los residuos en color negro corresponden a residuos rígidos, mientras los de color gris corresponden a estos mismos, considerados como aminoácidos flexibles durante los análisis *in silico*

Al igual que con la especie $H_2T(p-COOH)PP$, también se observó una libre rotación de enlace (enlace amida) del residuo de *triptófano 134*, el cual adoptó una conformación más próxima a la especie clorina e6 (figura 3.49). Ahora se establece claramente una interacción de tipo π - π a 4.05 Å entre los anillos aromáticos del grupo indol de *Trp 134* y un anillo de pirrol del núcleo porfirínico

de la clorina e6. Además, esta simulación revela que la aproximación de los grupos N-H en ambas especies es posible y podría ser un evento crucial para la estabilización del complejo formado. Esta interacción se establece a una distancia mayor que para el caso del derivado de tetrafenilporfirina, probablemente esta diferencia en la distancia de interacción con el residuo de *Trp 134* sea la razón de observar un apagamiento de fluorescencia más débil en BSA. También se observa un mayor acercamiento del residuo de *Lys 157* a uno de los grupos carboxilo periféricos de la clorina e6, con lo que se podría incrementar la energía de asociación no covalente en este sistema, por medio de interacciones de tipo polar.

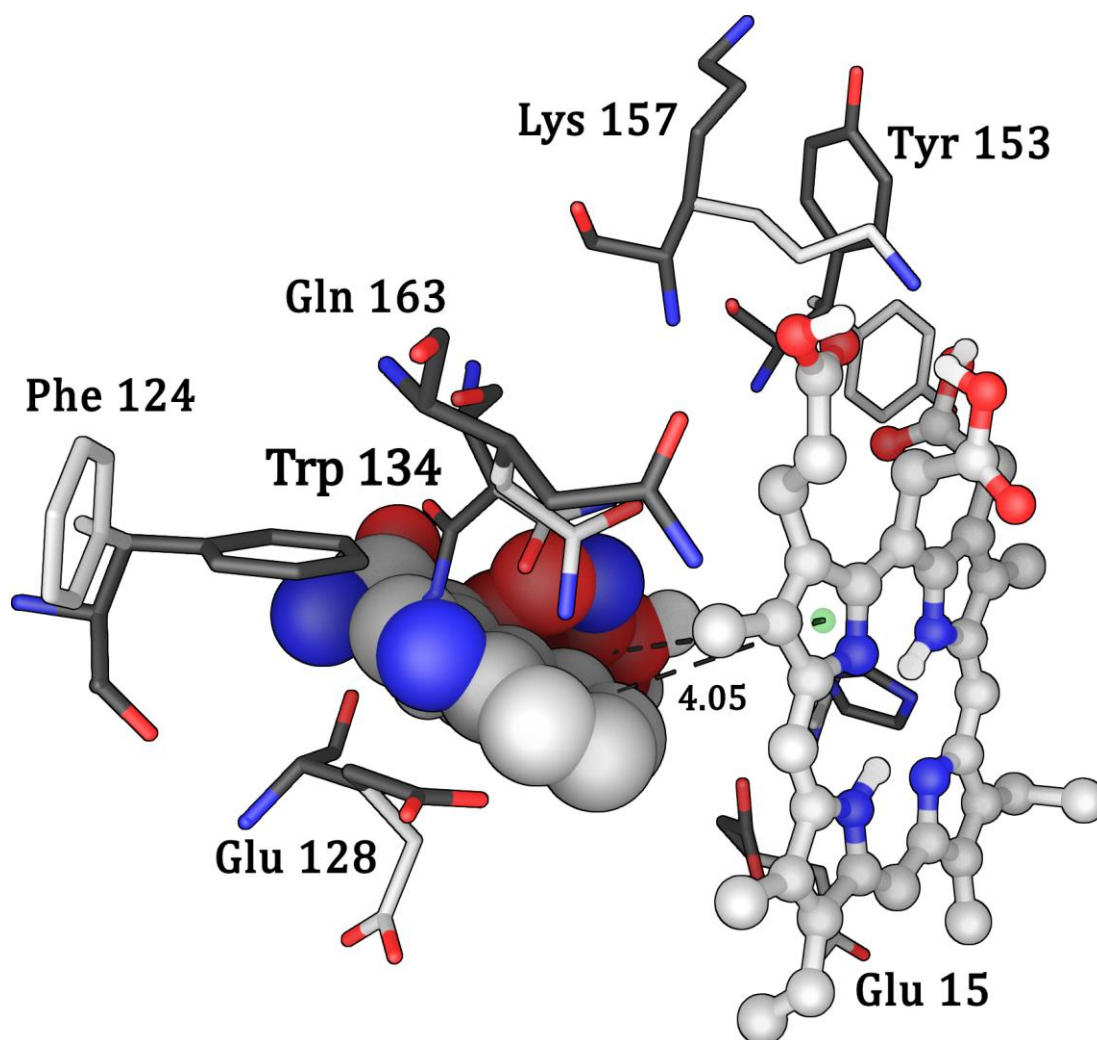


Figura 3.50. Diagrama de interacción del acoplamiento molecular flexible para el sistema BSA-clorina e6. Los residuos en color negro corresponden a residuos rígidos, mientras los de color gris corresponden a estos mismos, considerados como aminoácidos flexibles durante los análisis *in silico*

Finalmente, es posible afirmar que el número y localización de los grupos carboxílicos en la periferia de las especies H₂T(p-COOH)PP o Ce6 son sustituyentes esenciales para que ocurra la interacción con BSA. Sin embargo, las interacciones con los átomos centrales de nitrógeno del macrociclo también son importantes para la formación de los complejos finales. Además, las interacciones de las regiones aromáticas de los macrociclos y las regiones no polares de los aminoácidos circundantes tienen un papel importante. Ante esta evidencia, las interacciones con los átomos centrales de nitrógeno resultan más importantes para la especie Ce6 como consecuencia de su menor tamaño en comparación con la especie H₂T(p-COOH)PP. Por el contrario, como consecuencia del efecto estérico de los grupos fenilo periféricos del H₂T(p-COOH)PP, el cierre de los residuos de la proteína a las regiones centrales de ese macrociclo es inhibida. Sin embargo, es posible que haya interacciones del macrociclo con regiones polares o aromáticas bajas de residuos de proteínas, como *Phe 124*, *Tyr 153* o *Trp 134*. En otras palabras, el tamaño y la estructura de las especies macrocíclicas utilizadas tienen un efecto importante sobre la forma en que se forma el complejo final y sobre su estructura y estabilidad.

3.7 Cálculos de energía libre

En base a la metodología propuesta por Nathan Baker [83], se realizó el cálculo de la energía libre de unión computacional ΔG_{uc} , tanto para los complejos de menor energía obtenidos mediante las simulaciones de acoplamiento molecular rígido, así como para la pose de menor energía generada por medio de los análisis de acoplamiento molecular flexible. El ΔG_{uc} para ambos complejos BSA- H₂T(p-OH)PP y BSA-clorina e6, se calculó considerando las contribuciones electrostáticas/polar y no electrostática/apolar. El cálculo de la energía electrostática está dividido en dos componentes: la energía de solvatación y la energía coulombica

$$\Delta G_{uelec} = \Delta G_{usol} + \Delta G_{ucoul}$$

En donde el ΔG_{solv} representa la determinación computacional de la energía de solvatación y ΔG_{coul} representa la energía coulombica de cada uno de los complejos estudiados. Ambas contribuciones fueron calculadas por medio del programa *APBS* Adaptive Poisson-Boltzmann Solver []. La contribución no electrostática ΔG_{np} , la cual representa el producto del cambio en el área accesible al disolvente (ΔASA) en el proceso de unión, por el coeficiente γ , que representa la tensión

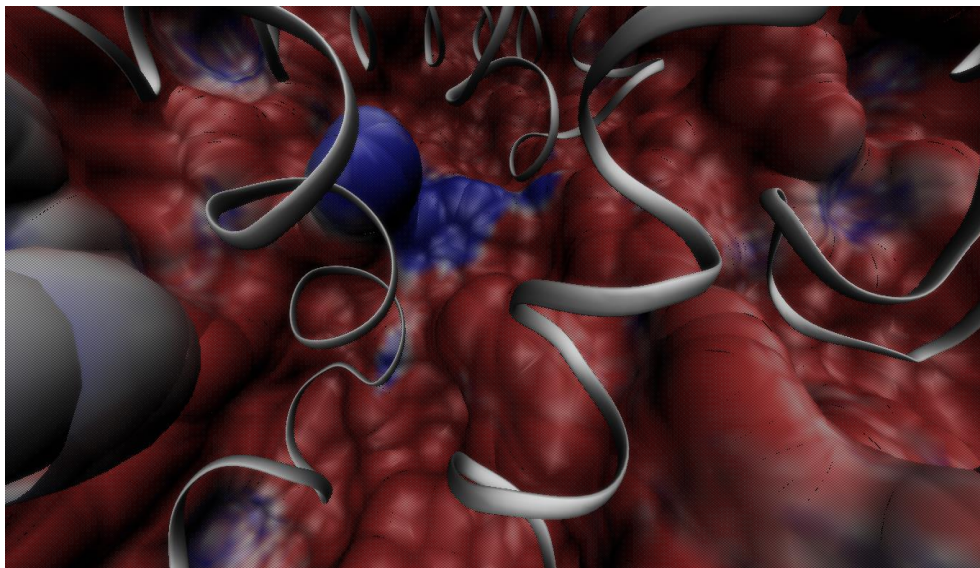
interfacial equivalente a $5 \text{ cal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$, fue determinado utilizando el programa *VMD* Visual Molecular Dynamics. Finalmente, el ΔG_{uc} se determinó por medio de la siguiente ecuación.

$$\Delta G_{uc} = \Delta G_{elec} + \Delta G_{np}$$

Como se mencionó con anterioridad a pH neutro la BSA presenta una carga negativa de entre -15 y -17, lo cual se ve reflejado en los potenciales de superficie electrostática de las figuras 3.50 y 3.51. Se puede observar que los residuos ionizables de BSA del sitio III propician un ambiente con densidad de carga negativa, sin embargo, se observan pequeñas zonas de carga positiva que se pueden adjudicar al o los residuos de lisina que conforman este sitio. En cuanto a la especie $H_2T(p-OH)PP$, es claro que la densidad de carga negativa se concentra en los grupos carboxílicos periféricos, mismos que tienen un mayor acercamiento a las zonas positivas del sitio de unión en BSA, con lo que se puede presentar una estabilización del complejo en base a la interacción de cargas opuestas entre ambas especies. La proporción de carga neutra se encuentra localizada en el nucleó porfirínico, la cual es proclive a establecer interacciones de tipo hidrofóbico, por ejemplo, con el residuo de *Val 38*.

Durante el acercamiento de la especie $H_2T(p-OH)PP$ a los residuos del sitio III de BSA, esta ejerce un ligero efecto sobre la carga parcial positiva de los residuos cercanos (figura 3.51 b), puesto que se atenúa la zona con carga positiva durante la formación del complejo BSA- $H_2T(p-COOH)PP$. Con base a los datos de la tabla 5, se establece que la interacción del sistema BSA- $H_2T(p-OH)PP$ es gobernado por interacciones de carácter electrostático, principalmente de tipo coulombico y en menor medida por las interacciones de tipo no polar, lo cual concuerda satisfactoriamente con los resultados experimentales y de acoplamiento molecular.

a)



b)

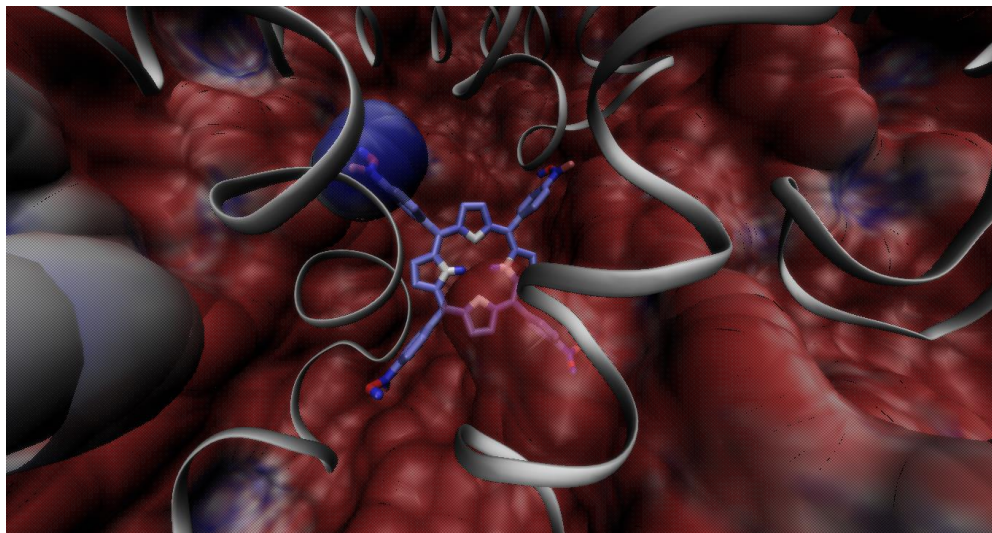
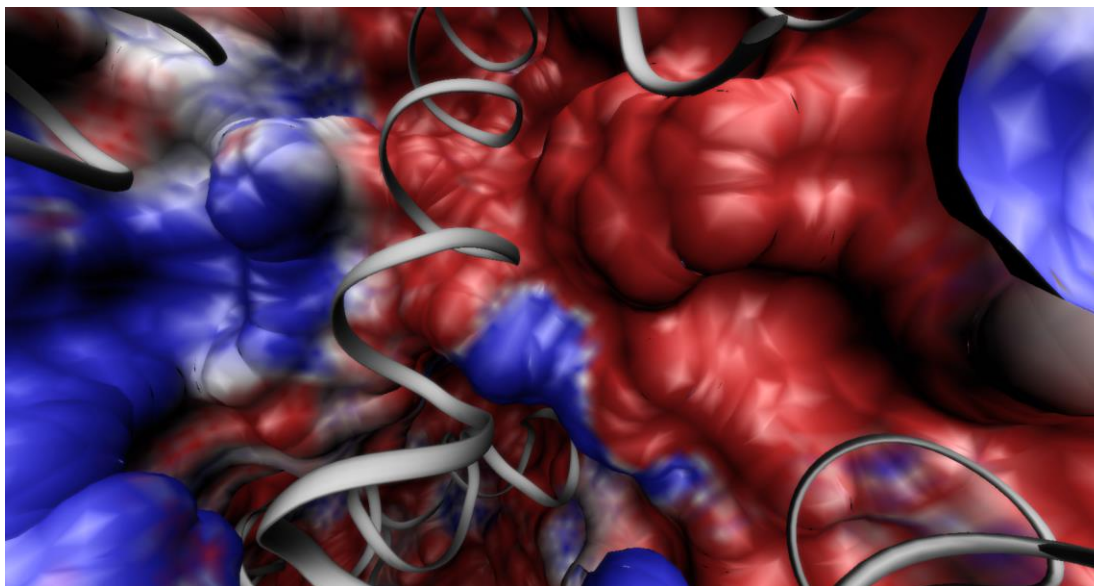


Figura 3.51. Superficies de potencial electrostático del sitio III de BSA (a) y la interacción con H₂T(p-OH)PP (b).

En el caso de la clorina e6 al igual que con la especie H₂T(p-OH)PP; la densidad de carga negativa se presenta en los tres grupos carboxílicos periféricos. Es claro que el sitio III de BSA y las zonas cercanas de alrededor de 5 Å presentan carga negativa, lo cual se ve reflejado en los potenciales de la figura 3.51 a. De igual manera que con la especie H₂T(p-OH)PP, también se observa un cambio sobre la carga parcial positiva de los residuos en el ambiente de interacción (figura 3.51 a). Sin embargo, este efecto es más notorio en este sistema figura 3.51 b. En este sentido, se establece en base a los datos mostrados en la tabla7, que al igual que con el derivado de

tetrafenilporfirina la interacción es predominantemente de carácter electrostático de tipo coulombico, y se establece en menor medida por las interacciones no polares que deben concretarse a través de nucleó porfinico de carácter no polar de la clorina e6.

a)



b)

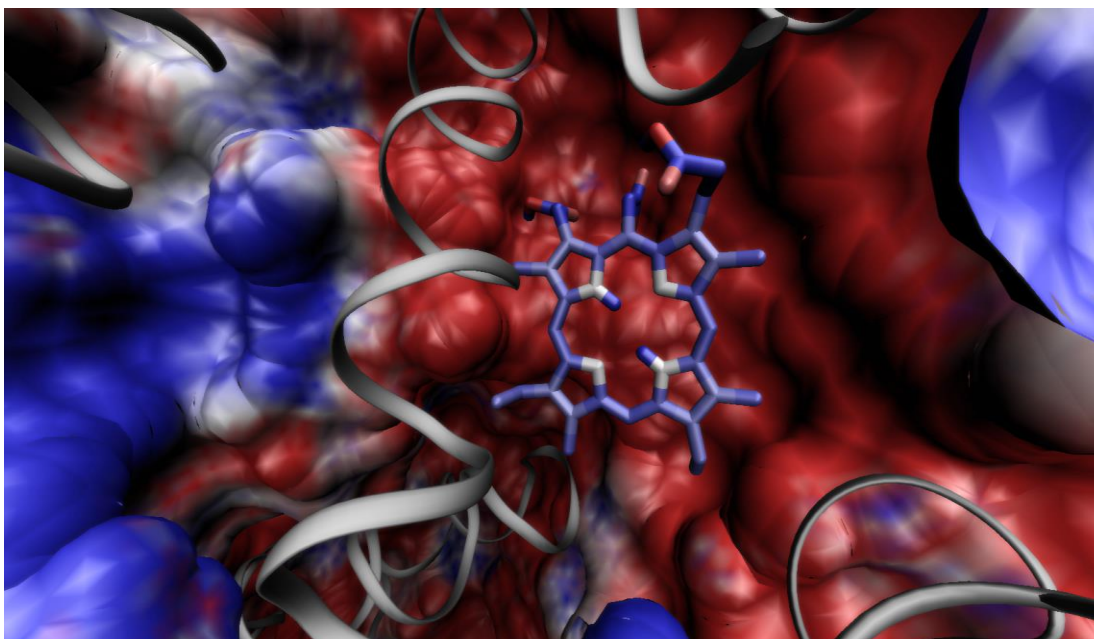


Figura 3.51. Superficie de potencial electrostático del sitio III de BSA (a) y la interacción con clorina e6 (b).

Tabla 7. Distancia y tipo de interacción en los sistemas BSA-macro ciclo tetrapirrólico (docking rígido)

Sistema	ΔG_{solv} (kJ/mol)	ΔG_{coul} (kJ/mol)	ΔG_{np} (kJ/mol)	ΔG_{uc}^* (kJ/mol) $\times 10^3$
BSA-H₂T(p-COOH)PP	-9458.82	-509.0	-12.56	-9.98
BSA-Clorina e6	-10069.26	-1000.0	-10.53	-11.01

Para comprobar si predominan las interacciones de tipo electrostático en las conformaciones generadas por el acoplamiento molecular flexible de los residuos de BSA que participan en la interacción con los macrociclos tetrapirrólicos, también se realizaron estudios de energía libre. Está claro que los aminoácidos de manera aislada no reflejan la carga real de la proteína en su totalidad. Sin embargo, genera una aproximación del potencial de superficie electrostática de cada aminoácido en la zona de interacción con las especies de H₂T(p-OH)PP y clorina e6.

En primera instancia se observa claramente que los potenciales de superficie electrostática correspondiente a la serie de aminoácidos considerados como flexibles, es decir *Glu 15, His 16, Phe 124, Glu 128, Trp 134, Tyr 153 y Lys 157*, para el caso del complejo BSA- H₂T(p-OH)PP, son predominantemente positivos (figura 3.52 a). Sin embargo, se observa una ligera atenuación de la carga positiva de estos residuos al momento de la interacción con H₂T(p-OH)PP. Como se ha mencionado el núcleo porfirínico es capaz de establecer interacciones de tipo no polar que, junto con la sustitución en su estructura con grupos polares como ácidos carboxílicos, pueden incrementar la incidencia y las fuerzas de interacción en estos sistemas. Finalmente, los datos de la tabla 8 respaldan esta afirmación al confirmarse nuevamente que las interacciones que conllevan a la formación del complejo BSA- H₂T(p-OH)PP son principalmente de carácter electrostático de tipo coulombico y en menor proporción las de tipo no polar.

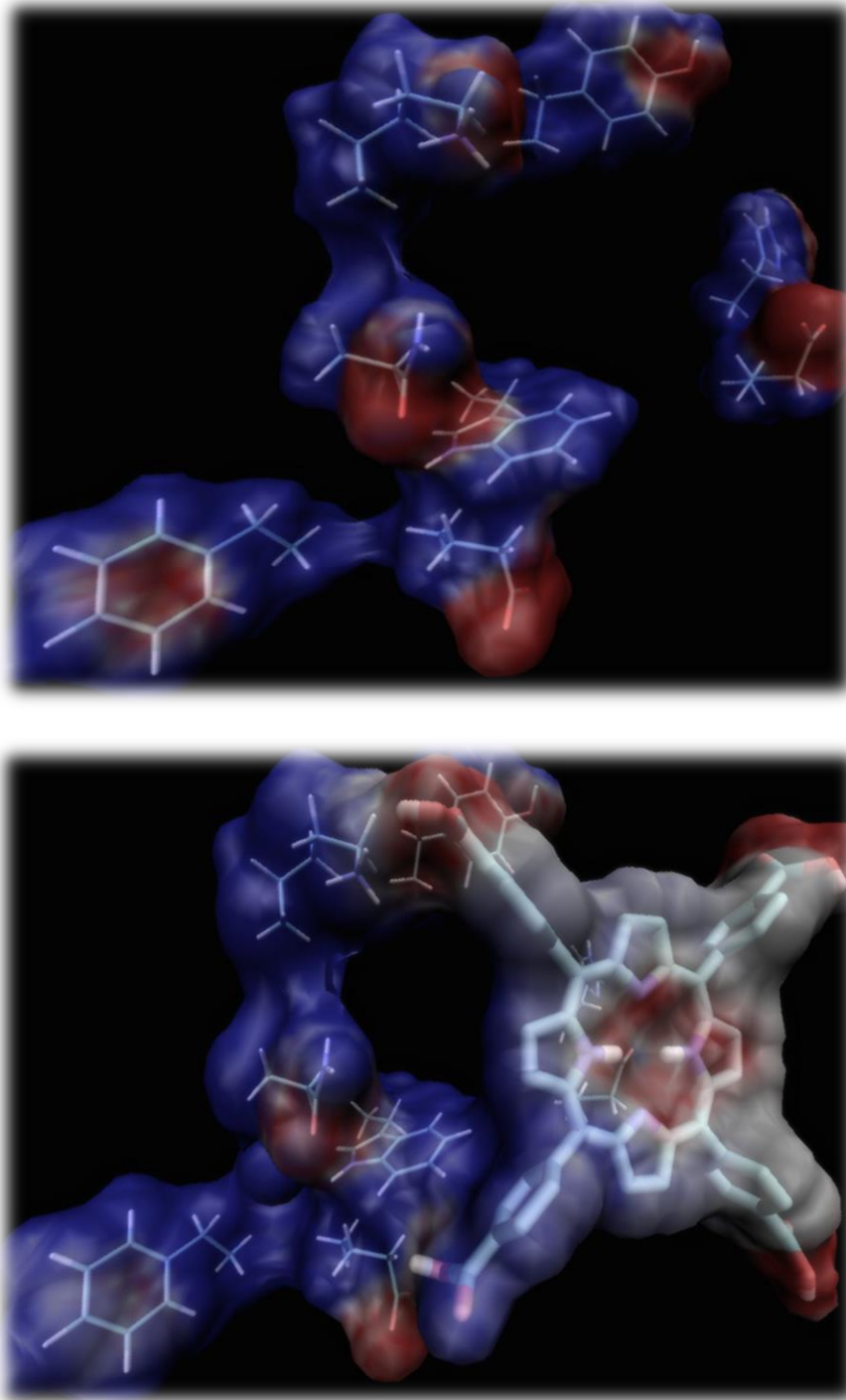


Figura 3.52. Superficies de potencial electrostático de la serie de residuos considerados como aminoácidos flexibles (a) y su interacción con H₂T(p-OH)PP (b).

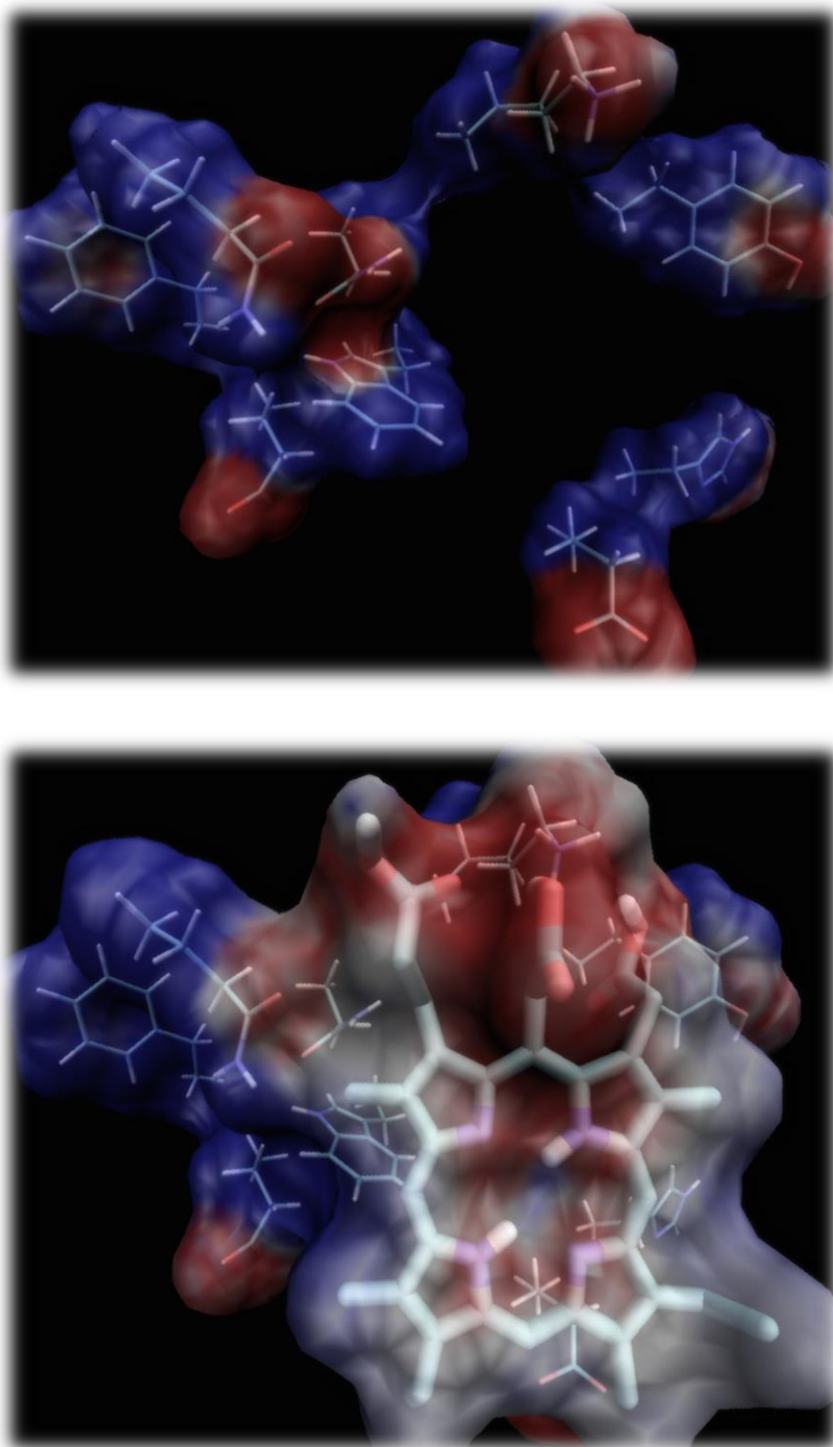


Figura 3.53. Superficies de potencial electrostático de la serie de residuos considerados como aminoácidos flexibles (a) y su interacción con clorina e6 (b).

Tabla 8. Distancia y tipo de interacción en los sistemas BSA-macrocielo tetrapirrólico (docking flexible)

Sistema	$\Delta\widehat{G}_{\text{solv}}$ (kJ/mol) $\times 10^4$	ΔG_{coul} (kJ/mol)	ΔG_{np} (kJ/mol)	ΔG_{uc}^* (kJ/mol) $\times 10^4$
BSA-H₂T(<i>p</i>-COOH)PP	-4.67	-506.0	-16.03	-4.66
<i>BSA-Clorina e6</i>	-4.65	-441.0	-17.78	-4.65

Capítulo IV: Conclusiones y perspectivas

Conclusiones

Se descartaron las especies $H_2T(p-OH)PP$, clorofila *a* y feofitina *a* para los estudios de interacción con BSA; debido al efecto de protonación o agregación que presentan estas especies en medios acuosos.

Para los estudios de interacción con BSA, se eligieron las especies $H_2T(p-OH)PP$ y clorina *e6* en base a su solubilidad y estabilidad en medios preponderantemente acuosos, mismas especies que en su caso se aislaron, purificaron o sintetizaron satisfactoriamente.

En la interacción de $H_2T(p-COOH)PP$ con BSA se observó una influencia importante del pH al no presentarse una interacción favorable a pH 8.5 seguramente debido a un efecto de repulsión de cargas. Sin embargo, a pH 7 la interacción BSA- $H_2T(p-COOH)PP$ es termodinámicamente estable estableciéndose un acoplamiento que sigue un modelo de sitios de unión independiente 1:1.

En el caso del sistema BSA-clorina *e6*, el pH no tiene un efecto relevante sobre la interacción entre ambas especies, a ambos pH de estudio la unión es termodinámicamente estable y se establece por medio de un modelo de sitios de unión independiente 1:1.

Con base a los parámetros termodinámicos calculados: ΔG , ΔH y ΔS inherentes al proceso de unión, se estableció que las principales fuerzas de interacción en ambos sistemas de estudio son resultado de las fuerzas de van der Waals del tipo dipolo-dipolo, puentes de Hidrógeno, así como de las de tipo no polar. El cambio de energía libre negativo (ΔG) muestra que ocurre una interacción espontánea.

Los estudios *in silico*, proporcionaron información importante sobre el posible sitio de fijación y la geometría aproximada del acoplamiento, que en el caso particular de ambos macrociclos tetrapirrólicos se localiza en las proximidades del sitio III de BSA. La formación de los complejos $H_2T(p-COOH)PP$ -BSA y *clorina-e6*-BSA, puede consolidarse principalmente a través de interacciones de tipo puente de hidrógeno periféricas e hidrofóbicas al centro del macrociclo. Al considerar como flexibles algunos residuos del sitio III de BSA (por medio del acoplamiento molecular flexible), se estableció una interacción directa con el residuo de *Trp 134*, especialmente con la especie $H_2T(p-COOH)PP$, lo cual está en concordancia con el apagamiento de BSA observado vía los análisis por espectroscopía de fluorescencia.

Se confirmó a través de los cálculos de energía libre que en la estabilización de los complejos formados se establece por medio de interacciones electrostáticas, de tipo coulombico y en menor medida a través de interacciones de tipo no polar.

Todas las evidencias presentadas muestran que el tamaño y la estructura de los macrociclos estudiados tienen un efecto importante en la formación y estabilidad de los complejos formados. En base a los resultados se considera importante la elección de los macrociclos tetrapirrólicos u otras especies activas, para la formulación de este tipo de sistemas para posibles aplicaciones médicas.

Perspectivas

Para futuros proyectos, sería importante considerar la metalación o sustitución con especies lantanoides de los macrociclos tetrapirrólicos empleados, con la finalidad de estudiar sus propiedades espectroscópicas y los efectos que se establecerían en la interacción con proteínas transportadoras.

Referencias

- 1.- S. Surgio A Karsima, S Mochizuki, M. Noda And K. Kobayashi Crystal Structure Of Human Serum Albumine At 2.5 A Resolution *Protein Engineering*. - 1999. - Vol. 12. - Pp. 439-446.
- 2.- Karolina A. Majorek et al Structural And Immunologic Characterization Of Bovine, Horse, And Rabbit Serum. *Molecular Immunology*. - 2012. - Vol. 52. - Pp. 174–182.
- 3.- Ali J. Ryan Jamie Ghuman , Patricia A. Zunszain , Chun-Wa Chung , Stephen Curry Structural Basis Of Binding Of Fluorescent, Site-Specific Dansylated Amino Acids. *Journal Of Structural Biology*. - 2011. - Vol. 174. - Pág. 84-91.
- 4.- Fayeze Samari, Bahram Hemmateenejad, Mojtaba Shamsipur, Mehdi Rashidi and Hamidreza Samouei Affinity of Two Novel Five-Coordinated Anticancer Pt(II) Complexes to Human and Bovine Serum Albumins: A Spectroscopic Approach. *Inorganic chemistry*. - 2012 Vol. 51, pág. 3454–3464.
- 5.- Quioco A. E. Hodel And F. A. *Protein–Ligand Interactions. International Tables For Crystallography*. - 2012. - Vol. F. - Pp. 755-765.
- 6.- Murphy, Kenneth P *Predicting Binding Energetics from Structure: Looking Beyond DG8*. John Wiley & Sons, Inc. . - 1999 Pág. 333-339.
- 7.- Klebe Stefan G. Krimmergerhard *Thermodynamics Of Protein–Ligand Interactions As A Reference For Computational Analysis: How To Assess Accuracy, Reliability And Relevance Of Experimental Data*. *Journal Of Computer-Aided Molecular Design*. - 2015. - Vol. 29. - Pág. 867-883.
- 8.- Xing Du 1 Yi Li , Yuan-Ling Xia , Shi-Meng Ai , Jing Liang, Peng Sang , Xing-Lai Ji , Shu-Qun Liu *Insights Into Protein–Ligand Interactions*. *Int. J. Mol. Sci*. 2016. - 2016. - Vol. 17. - Pág. 1-34.
- 9.- J.M.P. Viéville S. Charbonnier C, P. Eberling , J.-P. Starck , M.-A. Delsuc *A New NMR Technique To Probe Protein–Ligand Interaction*. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*. - 2014. - Vol. 89. - Pp. 18-23.
- 10.- Jacques Haiech Yves Gendrault, Marie-Claude Kilhoffer, Raoul Ranjeva, Morgan Madec, Christophe Lallement *Macromolecule, A General Framework Improving Teaching Ligand Binding To A Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Cell Research*. - 2014. - Vol. 1843. - Pp. 2348–2355.
- 11.- Gabor Mocz Justin A. Ross *Fluorescence Techniques In Analysis Of Protein–Ligand Interactions Protein-Ligand Interactions*. *Springer Protocols*, 2013. 455–461.
- 12.- Joseph R. Lakowick. *Principles Of Fluorescence Spectroscopy*. – 2006. Tercera Edición, Springer Science.
- 13.- Daniel C Harris. - *Análisis Químico Cuantitativo*. – 2003. Tercera Edición, Editorial Reverte

14. James R. Horn, John F. Brandts, and Kenneth P. Murphy van't Hoff and Calorimetric Enthalpies II: Effects of Linked Equilibria. *Biochemistry*. - 2002 Vol. 41, pág. 7501-7507.
- 15.-Douglas B. Kitchen Hélène Decornez, John R. Furr And J  rgen Bajorath Applications, Docking And Scoring In Virtual Screening For Drug Discovery. *Methods And Nature Reviews*. - 2004. - Vol. 3. - P  g. 935-949
- 16.- Oleg Trott And Arthur J. Olson. Autodock Vina: Improving The Speed And Accuracy Of Docking With A New Simulaci  n Function, Efficient Optimization, And Multithreading. *Comput Chem.*- 2010.- Vol 3.- P  g.
- 17.-García Sánchez M. A. Síntesis Y Caracterización De Complejos Macroc  clicos Mixtos Lantanoides, Tesis De Maestria, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa 1993
- 17.-García Sánchez M. A. Síntesis Y Caracterización De Complejos Macroc  clicos Mixtos Lantanoides, Tesis De Maestria, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa 1993
18. -K. M. Smith *Porphyryns And Metalloporphyryns*. – 1978. Academic Press, N. Y.
19. -Latos-Grazyrski M. Stepie  n And L. Aromaticity And Tautomerism In *Porphyryns And Porphyrinoids Top Heterocycl Chem*,Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 20.- Won-Seob Cho and Chang-Hee Lee. Convenient Synthesis of Difurylmethanes and Diethienylmethanes and Their Application to the Synthesis of Core-Modified Porphyrins. *Bull,Korean Chem Soc*, 1998.- Vol 19,
- 21.- Satoru Hiroto, Yoshihiro Miyake, and Hiroshi Shinokubo. Synthesis and Functionalization of Porphyrins through Organometallic Methodologies. *Chem. Rev.*, 2017, Vol 117 4 2910–3043
- 22.- John Mack. Expanded, contracted, and isomeric porphyrins: Theoretical aspects *Chem. Rev*, 2017.- Vol 117,-3444-3478.
- 23.- Takayuki Tanaka and Atsuhiko Osuka. Chemistry of meso-aryl-substituted expanded porphyrins: Aromaticity and molecular twist . *Chem. Rev*, 2017.-Vol 117, 2584-2640.
- 24.- Sunaina Singh, Amit Aggarwal, N. V. S. Dinesh K. Bhupathiraju, Gianluca Arianna Kiran Tiwari, and Charles Michael Drain. Glycosylated porphyrins, phthalocyanines, and other porphyrinoids for diagnostics and therapeutics *Chem. Rev*. 2015.- Vol 115, 10261-10306.
- 25.- Ethan D. Sternberg, David Dolphin. *Porphyryn-Based Photosensitizers For Use In Photodynamic Therapy*. *Tetrahedron*, 1998.- Vol 54 4151-4202
- 26.- Raymond Bonnett. *Photosensitizers Of The Porphyrin And Phthalocyanine Series For Photodynamic Therapy*. *Chem. Soc. Rev*. 1995.- Vol 24, 19-33

27.-Aisling E. O'Connor, William M. Gallagher and Annette T. Byrne. *Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy*. *Photochemistry and Photobiology*, 2009.- Vol 85, 1053–1074

28.- Frauke Schibilla, Linda Stegemann, Cristian A. Strassert, Fabio Rizzo and Bart Jan Ravoo. *Fluorescence quenching in β -cyclodextrin vesicles: Membrane confinement and host–guest interactions*. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2016 Vol 15, 235-243.

28.- Stephen G. DiMugno, J. C. *Fluorinated Porphyrins and Corroles: Synthesis, Electrochemistry, and Applications*. *Heterocyclic Chemistry*.- 2014. - Vol 1. – Pág 589-620.

30.- Ana V.C. Simõesa, A. A. *Amphiphilic meso(sulfonate ester fluoroaryl)porphyrins: refining the substituents of porphyrin derivatives for phototherapy and diagnostics*. *Tetrahedron* -. 2012 Vol. – 68. -Pág 8767–8772.

31.-Alexander S. Brandis, Y. S.. *Chlorophyll Sensitizers in Photodynamic Therapy In Advances in Photosynthesis and Respiration Vol. 25*. - Pág. 461-483

32.- A. A. Krasnovsky, J. K. *Photophysical studies of pheophorbide a and pheophytin a. Phosphorescence and photosensitized singlet oxygen luminescence*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* .-1990.- Vol. 5.- Pág 245-254.

32.-Mazor O, B. A.-B. *WST11, a novel water-soluble bacteriochlorophyll derivative; cellular uptake, pharmacokinetics, biodistribution and vascular-targeted photodynamic activity using melanoma tumors as a model*. *Photochem Photobiology* . -2005. – Vol.I 81. -Pág 342-351.

33.- Eliana Alves Maria A.F. Faustino , Maria G.P.M.S. Neves , Ângela Cunha, Helena Nadais , Adelaide Almeida *Potential Applications Of Porphyrins In Photodynamic Inactivation Beyond The Medical Scope*. *Journal Of Photochemistry And Photobiology C: Photochemistry Reviews*. - 2015. - Vol. 22. - Pág. 34–57.

34.- Guanying Chen Indrajit Roy, Chunhui Yang, and Paras N. Prasad *Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy*. *Chem. Rev.* - 2016. - Vol. 116. - pp. 2826–2885.

35.-Guanying Chen, H. Q. *Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics*. *Chem. Rev.* -2014. - Vol. 114 . - Pág 5161–5214.

36.-Yang, P.; Gai, S.; Lin, J. *Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery*. *Chem. Soc. Rev.* - 2012. – Vol. 41. - Pág 3679- 3698.

37.- Penon O Marín MJ, Amabilino DB, Russell DA, Pérez-García *Iron oxide nanoparticles functionalized with novel hydrophobic and hydrophilic porphyrins as potential agents for photodynamic therapy*. *J Colloid Interface Sci.* - 2016. - Vol. 15. - Pág. 154-165.

38.- V Biju *Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy.* Chem Soc Rev. - 2014. - Vol. 7. - Pág. 744-764.

39.-Kevin A. Carte et al. *Porphyrim–phospholipid liposomes permeabilized by near-infrared light [Journal] // Nature Communications.*- 2014. – Vol. 5. – Pág. 3546

40.- Sugisaki K, U. T. *Photodynamic therapy for corneal neovascularization using polymeric micelles encapsulating dendrimer porphyrins.* Invest Ophthalmol Vis Sci.- 2008. – Vol. 49. - Pág. 894-849.

41.- Temizel, S. *Delivery of lipophilic porphyrin by liposome vehicles: Preparation and photodynamic therapy activity against cancer cell lines .* Photodiagnosis Photodyn Ther. - 2014. - Vol.4. - Pág 537-545.

42.- M. B. Allen, J. . Katz, S. Aronoff, B. Ke, N. K. Boardman, W. Lwowski, L. Bogorad, J. M. Olson, L. J. Boucher, R. B. Park, W. L. Butler, G. R. Seely, R. K. Clayton, W. R. Siström, G. Cohen-Bazire, E. K. Stanton, R. C. Dougherty, H. H. Strain, J. C. Goedheer, W. A. Svec, A. S. Holt, and L. P. Vernon, "Chlorophylls", Academic Press, 1966, pp. 3-19

43.- A. P. Gerola, T. M. Tsubone, A. Santana, H. P. M. De Oliveira, N. Hioka, and W. Caetano, "Properties of chlorophyll and derivatives in homogeneous and microheterogeneous systems," J. Phys. Chem. B, 2011, vol. 115, pp. 7364–7373.

44.-T. Miyatake and H. Tamiaki, "Self-aggregates of natural chlorophylls and their synthetic analogues in aqueous media for making light-harvesting systems," Coord. Chem. Rev., 2010, vol. 254, pp. 2593–2602.

45.- D. J. Suggett, O. Prásil, and M. Borowitzka, "Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications" Springer 2010, pp 1-19

46.- R. Eugene and Govind Jee, "The Photosynthetic Pigments," Photosynthesis.,1969, pp. 102–123

47.- A. S. Brandis, Y. Salomon, and A. Scherz, "Chlorophyll Sensitizers in Photodynamic Therapy," Chlorophylls and Bacteriochlorophylls, 2006 pp. 461–483.

48.- A. A. Krasnovsky, K. V Neverov, B. Roeder, And T. Levald, "Photophysical Studies Of Pheophorbide a And Pheophytina Phosphorescenc e", 1990, Vol. 5, pp. 245–254.

8.- R. K. P. Shunqing Zhang, Nayan J. Patel And Ravindra K. Pandey, "Chlorophyll-A Analogs For Cancer Imaging And Therapy (Theranostics) Shunqing," Top. Heterocycl. Chem., 2014, Vol. 10, Pp. 1-30.

49.- O. Mazor, A. Brandis, V. Plaks, E. Neumark, V. Rosenbach-Belkin, Y. Salomon, and A. Scherz, "WST11, A Novel Water-Soluble Bacteriochlorophyll Derivative; Cellular uptake, Pharmacokinetics, Biodistribution, and Vascular Targeted Photodynamic Activity Against Melanoma tumors," Photochem. Photobiol., 2004, vol. 81, pp. 342–351.

- 50.- B. Grimm, R. J. Porra, and H. Scheer, *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls*, 2006, vol. 25, pp. 1-26
- 51.- Y. Li, Z. L. Cai, and M. Chen, "Spectroscopic properties of chlorophyll f," *J. Phys. Chem. B*, 2013 vol. 117, pp. 11309–11317.
- 52.- K. Sauer, J. R. L. Smith, and A. J. Schultz, "The Dimerization of Chlorophyll a, Chlorophyll b, and Bacteriochlorophyll in Solution," *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, vol. 88, pp. 2681–2688.
- 53.- A. Agostiano, M. Della Monica, G. Palazzo, and M. Trotta, "Chlorophyll a auto-aggregation in water rich region," *Biophys. Chem.*, 1993, vol. 47, pp. 193–202.
- 54.- A. Ben Fredj and M. F. Ruizlo, "Theoretical Study of Chlorophyll a Hydrates Formation in Aqueous Organic Solvents," 2010, vol. 114, pp. 681–687.
- 55.- L. L. Shipman, T. M. Cotton, J. R. Norris, and J. J. Katz, "An Analysis of the Visible Absorption Spectrum of Chlorophyll a Monomer, Dimer, and Oligomers in Solution," *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, Vol. 98, pp. 8222–8230.
- 56.- A. K. Chibisov, T. D. Slavnova, and H. Görner, "Effect of macromolecules and triton X-100 on the triplet of aggregated chlorophyll in aqueous solution," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 2003, vol. 72, pp. 11–16.
- 57.- P. Semeraro, G. Chimienti, E. Altamura, P. Fini, V. Rizzi, and P. Cosma, "Chlorophyll a in cyclodextrin supramolecular complexes as a natural photosensitizer for photodynamic therapy (PDT) applications," *Mater. Sci. Eng. C*, 2018, vol. 85, pp. 47–56.
- 58.-Jr. Theodore Peters *The Albumin Molecule" Its Structure. All About Albumin.* - 1995.
- 59.- Ghuman Jamie et al. *Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin.* *J. Mol. Biol.* . - 2005. - Vol. 353. - pp. 38-52.
- 60.-Joseph Lau Orit Jacobson, Gang Niu, Kuo-Shyan Lin, François Bénard and Xiaoyuan Chen *Bench to Bedside: Albumin Binders for Improved Cancer Radioligand Therapies.* *Bioconjugate Chem.* - 2019. - Vol. 30. - p. 487–502.
- 61.-Wang Zhong-min et al *Structural studies of several clinically important oncology drugs in complex with human serum albumin.* *Biochimica et Biophysica Acta.* - 2013. - Vol. 1830. - pp. 5356–5374.
- 62.-Rola Abboud Catherine Charcosset, Hélène Greige-Gerges *Interaction of triterpenoids with human serum albumin: A review.* *Chemistry and Physics of Lipids* . - 2017. - Vol. 207: 260–270.
- 63.-Caraceni Paolo Tufoni Manuel , Bonavita Maria Elena *Clinical use of albumin.* *Blood Transfus* . - 2013. - Vol. 11. - pp. 19-25.

64.-J. Stewart Alan *Albumin research in the 21st century. Biochimica et Biophysica Acta.* - 2013. - Vol. 1830. - pp. 5351–5353.

65.-Wu Y., Cheng H., Chen Y., Chen L., Fang Z, Liang. *Formation of a Multiligand Complex of Bovine Serum Albumin with Retinol, Resveratrol, and (-)-Epigallocatechin-3-gallate for the Protection of Bioactive Components. Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2017. Vol 65: 3019-3030.

66.-Jr. Theodore Peters *Ligand Binding by Albumin. All about albumin.* - [s.l.] : Elsevier, 1995.

67.-Hiroki Yoshikawa Atsushi Hirano, Tsutomu Arakawa, Kentaro Shiraki *Effects of alcohol on the solubility and structure of native and disulfide-modified bovine serum albumin. International Journal of Biological Macromolecules.* - 2012. - Vol. 50. - pp. 1286– 1291.

68.-Björn K.I. Meijers Bert Bammens, Kristin Verbeke and Pieter Evenepoel *A Review of Albumin Binding in CKD. American Journal of Kidney Diseases.* - 2008. - Vol. 51. - pp. 839-850.

69.-Leonardo G. Ferreira Ricardo N. Dos Santos, Glaucius Oliva And Adriano D. Andricopulo *Molecular Docking And Structure-Based Drug Design Strategies. Molecules.* - 2015. - Vol. 20. - Pp. 13384-13421.

70.- Jason B. Cross et al .*Comparison Of Several Molecular Docking Programs: Pose Prediction And Virtual. J. Chem. Inf. Model.* - 2009. - Vol. 49. - Pág. 1455–1474.

71.- Moitessier, Pablo Englebienne And Nicolas. *Docking Ligands into Flexible and Solvated Macromolecules. 4. Are Popular Simulation Functions. J. Chem. Inf. Model.* - 2010 Vol.- 49.- Pág 1568–1580.

72.-Jorgensen William L. *The Many Roles Of Computation In Drug Discovery. Science.* - 2004. - Vol. 303. - Pág. 1813-1818.

73.- Juan Andrés Y Juan Beltrán *Química Teórica Y Computacional*

74.- Shoichet John J. Irwin And Brian K. *Docking Screens For Novel Ligands Conferring New Biology . J. Med. Chem.* - 2016. - Vol. 59. - Pág. 4103–4120.

75.- Adler Alan D., Frederick R. Longo, William. Shergalis. *J. Am. Chem. Soc.* 1964, Vol 86, Pág. 3145-3149

76.- Keiji Iriyama Nagao Ogura, Atusi Takamiya *A Simple Method For Extraction And Partial Purification Of Chlorophyll From Plant Material, Using Dioxane. The Journal Of Biochemistry.* - 1974. - Vol. 76. - Pág. 901-904.

77.- Gabor Mocz Justin A. Ross *Fluorescence Techniques In Analysis Of Protein–Ligand Interactions Protein-Ligand Interactions.* - [Book Sction.]// Springer Protocols, 2013.

78.- Joseph R. Lakowick. *Principles Of Fluorescence Spectroscopy.* – 2006 [Book Section] // Tercera Edición, Springer Science.

79. James R. Horn, John F. Brandts, and Kenneth P. Murphy van't Hoff and Calorimetric Enthalpies II: Effects of Linked Equilibria. *Biochemistry*. - 2002 Vol. 41, pág. 7501-7507.

80.- Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch et al. 2016

81.- Koehl, Patrice. "Electrostatics Calculations: Latest Methodological Advances." *Current Opinion In Structural Biology*. 2006 Vol. 16 Pp. 142–151.

82.-- Baker, Nathan A. "Improving Implicit Solvent Simulations: A Poisson-Centric View." *Current Opinion In Structural Biology*, 2005. Vol. 15 Pp. 137-143.

83- Baker, N.A. Poisson-Boltzmann Methods For Biomolecular Electrostatics. *Methods Enzymol*, 2004. 383: 94-118.

84.- Rowan Raymond J. Abraham And A. E. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Of Chlorophyll [Book Section].

85.-S. G. Boxer G . L. Closs And J. J. Kat The Effect Of Magnesium Coordination On The And "N" Magnetic Resonance Spectra Of Chlorophyll A. *Journal Of The American Chemical Society* . - 1974. - Vol. 96. - Pp. 7056-7063.

86.- Brown Joseph J. Katz'and Charles E. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Of Chlorophylls And Corrins [Book Section] // *Bulletin Of Magnetic Resonance*. - Vol. 5.

87.- Guha D., Mitra S. Das R. and Mukherjee S. Luminol fluorescence quenching by triethyl amine and non-linear Stern- Volmer plot: Solvent effect. *Indian Journal of Chemistry*, 1999.- Vol. 38.- 760-767

88.- Roy R. and Mukherje S. Fluorescence Quenching Of Carbazole and Indole By Ethylenetrithiocarbonate. *Chemical Physics Letters*, 1987.- Vol. 140.- 210-214.

89.- Miguel.A.R.B and Manuel J.E. P Fluorescence quenching data interpretation in biological systems the use of microscopic models for data analysis and interpretation of complex systems. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1998.- Vol. 1373.- 1-16.

90.- Halina Mojzisova, Stéphanie Bonneau, ChristineVever-Bizet, DanielBrault. Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2007, Vol 1768. Pág 2748-2756

91.- Ross, P. D.; Subramanian, S. (1981) Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *biochemistry* 20: 3096–3102. doi.org/10.1021/bi00514a017

92.- Schrödinger Release 2020-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY.

93.- Amber M. Jones Brunette and David L. Farrens. Distance Mapping in Proteins Using Fluorescence Spectroscopy: Tyrosine, like Tryptophan, Quenches Bimane Fluorescence in a Distance-Dependent Manner. *Biochemistry*. 2014, Vol.53. Pág 6290–6301.

94.- UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. *J Comput Chem*. 2004 Oct;25(13):1605-12.

95.- Wallace A C, Laskowski R A & Thornton J M (1995). LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Prot. Eng.*, 8, 127-134.