



FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

**COMPLEJOS BIOSUPRAMOLECULARES DE DERIVADOS
HIDROFÓBICOS DE AZUL DE TOLUIDINA CON CUCURBIT[7]URIL
Y ALBÚMINA DE SUERO HUMANO, Y SU EFECTO FOTOTÓXICO EN
CÉLULAS TUMORALES CULTIVADAS *IN VITRO***

JOSÉ LUIS ROBINSON DUGGON

**Tesis para optar al Grado
Académico de Doctor en Química**

**Director de Tesis : Dr. Denis Alberto Fuentealba Patiño
Co-Directora de Tesis: Dra. Ana María Edwards Mujica**

Santiago de Chile, Diciembre, 2018

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

**“COMPLEJOS BIOSUPRAMOLECULARES DE DERIVADOS HIDROFÓBICOS DE AZUL
DE TOLUIDINA CON CUCURBIT[7]URILO Y ALBÚMINA DE SUERO HUMANO, Y SU
EFECTO FOTOTÓXICO EN CÉLULAS TUMORALES CULTIVADAS *IN VITRO*”**

Tesis presentada por:

JOSÉ LUIS ROBINSON DUGGON

Para optar al Grado Académico de Doctor en
Química.

APROBADA POR:

Dr. Camilo López Alarcón
Prof. Examinador

.....

Dr. Mario Faúndez Cáceres
Prof. Examinador

.....

Dr. Germán Günther Sapunar
Prof. Examinador

.....

Dr. Denis Alberto Fuentealba Patiño
Prof. Director de Tesis

.....

Dra. Ana María Edwards Mujica
Prof. Co-Directora de Tesis

.....

DICIEMBRE - 2018

A mi padre, José Beckman Robinson Hooker (q.e.p.d).

Agradecimientos

Primero a Dios todopoderoso por la vida y por todas las oportunidades que me ha brindado.

A la Facultad de Química por la oportunidad de formarme como investigador.

A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) por financiar mis estudios de doctorado con la beca de Doctorado Nacional 2015-21150894, al proyecto de investigación FONDECYT No. 1160443 por el financiamiento de esta tesis doctoral, al proyecto FONDEQUIP EQM 170120 y al proyecto FONDEQUIP/UHPLC MS/MS EQM 120065.

A mis tutores Dr. Denis Fuentealba y Dra. Ana María Edwards por todas las enseñanzas, apoyo y oportunidades de crecimiento académico y profesional que enriquecieron mi formación doctoral.

A mis compañeros de laboratorio Francisco, Luciano, Nory, Felipe, Fresia, Liliana y Elizabeth por todo el apoyo y por todos los momentos inolvidables que hemos compartido durante estos 4 años. A mis compañeros de la USACH Pablo y Daniel por todas las colaboraciones.

A mi comisión de Tesis, Dr. Camilo López Alarcón, Dr. Mario Faúndez Cáceres y Dr. German Günther Sapunar, por la guía y consejos para lograr los objetivos de este trabajo de investigación y poder culminar satisfactoriamente esta tesis.

A mi amada esposa, Johanna Rodríguez, por siempre creer en mí y ser mi apoyo incondicional durante todo este proceso. A mi hijo Ethan Robinson y mi hija Nathalia Robinson, por apoyarme en estos momentos y por disculparme por todos los momentos de familia que hemos sacrificado, que me han permitido llegar a la culminación de esta etapa profesional.

Lista de Abreviaciones

CB[7]	Cucurbit[7]urilo
HSA	Albúmina de suero humano
PDT	Terapia fotodinámica del cáncer
PS	Fotosensibilizador
ROS	Especies reactivas de oxígeno
BSA	Albúmina de suero bovino
DMF	Dimetilformamida
DIPEA	N,N,-diisopropiletilamina
Pyr	piridina
Trp	Triptófano
K _{sv}	Constante de Stern-Volmer
HeLa	Línea celular de carcinoma de útero
MC	Medio completo para crecimiento celular
¹ O ₂	Oxígeno singlete

Índice de Contenidos

Índice de Figuras	v
Índice de Tablas.....	xi
Índice de Esquemas	xii
Resumen	xiii
Abstract.....	xiv
Capítulo I. Introducción	1
1.1. Generalidades del Cáncer	2
1.2. Terapia Fotodinámica del Cáncer.....	3
1.3. Oxígeno Singlete	5
1.4. Fotosensibilizadores	6
1.5. Azul de Toluidina	7
1.6. Aspectos relevantes de la Terapia Fotodinámica del Cáncer	8
1.7. La Albúmina de suero humano y el transporte de fármacos.....	9
1.9. Complejos Biosupramoleculares	14
1.10. Hipótesis del Trabajo	15
1.11. Objetivos.....	16
<i>Objetivo general</i>	16
<i>Objetivos específicos</i>	16
Capítulo II. Parte Experimental	17
2.1. Reactivos.....	18
2.2. Síntesis y purificación del CB[7]	18
2.3. Síntesis de los derivados de azul de toluidina:	19
2.3.1. Síntesis del derivado del ácido caproico	19
2.3.2. Síntesis del derivado de ácido mirístico	19
2.4. Espectrometría UHPLC-MS/MS	20
2.5. Preparación de las soluciones stock.....	21
2.6. Determinación de la formación de los complejos de inclusión del TBO ⁺ y sus derivados con el CB[7] y los aductos con HSA	21

2.7. Determinación de las constantes de asociación con el CB[7]	21
2.8. Determinación de las constantes de asociación con la HSA	22
2.9. Tiempos de vida de fluorescencia	23
2.10. Determinación de las constantes de asociación por Calorimetría de Titulación Isotérmica.....	24
2.11. Irradiación de las muestras en solución.....	24
2.12. Determinación de oxígeno singlete.....	24
2.13. Mediciones del estado excitado triplete	25
2.14. Estudios computacionales para el TBO ⁺ y los derivados TBO ⁺ -C6 y TBO ⁺ -C14	25
2.15. Estudios computacionales para el TBO ⁺ @CB[7].....	26
2.16. Estudios computacionales de Acoplamiento Molecular Inducido (Docking) para el TBO ⁺ -C14@CB[7], TBO ⁺ -C14:HSA, TBO ⁺ - C14@CB[7]:HSA, TBO ⁺ -C6@CB[7].....	28
2.17. Cultivos celulares y ensayos de viabilidad celular	29
2.18. Determinación de la toxicidad en oscuro	29
2.19. Estudios de incorporación celular	30
2.20. Estudios de tinción con DAPI.....	31
2.21. Estudios de co-localización celular	32
2.21.1 Estudios co-localización celular Mitopainter blue y Syto 9	32
2.21.2. Estudios co-localización celular WGA-Alexa 350 y Syto 9	33
2.22. Estudios de microscopía de fluorescencia.....	34
2.23. Estudios de irradiación de los cultivos celulares.....	34
Capítulo III. Resultados y Discusión	36
3.1. Síntesis de los derivados	37
3.2. Propiedades Fotofísicas y Fotoquímicas de los derivados	39
3.2.1. Espectros de absorción y emisión de fluorescencia.....	39
3.2.2. Fluorescencia Resuelta en el Tiempo	40
3.2.3. Tiempo de vida del estado excitado triplete y generación de Oxígeno Singlete.....	41
3.3. Estudios de Fotodegradación del TBO ⁺	42

3.3.1. Fotodegradación en solución amortiguadora de fosfato de pH 7.	50
3.4. Caracterización de los Complejos de Inclusión del TBO ⁺ y sus derivados	53
3.4.1. Propiedades Fotofísicas de los derivados y sus complejos.....	53
3.4.2. Estudios de Fluorescencia Resuelta en el Tiempo.....	56
3.4.3. Estudios de las Propiedades Fotoquímicas.....	57
3.4.4. Resumen de las Propiedades Fotofísicas y Fotoquímicas del TBO ⁺ , TBO ⁺ -C6 y TBO ⁺ -C14.....	59
3.4.5. Determinación de la constante de formación de los complejos de inclusión con CB[7].....	62
3.4.6. Estudios Teóricos y de Acoplamiento Molecular Inducido.....	65
3.5. Aductos Fotosensibilizador-Proteína	67
3.6. Determinación del Sitio de Unión del Fotosensibilizador a la HSA	70
3.7. Complejos Biosupramoleculares	74
3.8. Estudios de Acoplamiento Molecular Inducido	77
3.9. Estudios de Asociación por Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)	79
3.10. Comparación de las constantes de asociación obtenidas por medio de las técnicas de fluorescencia y por ITC.	84
3.11. Estudios de toxicidad en oscuro en células HeLa cultivadas <i>in vitro</i>	87
3.12. Estudios de Microscopía de Fluorescencia en células HeLa cultivadas <i>in vitro</i>	87
3.12.1 Tinción con DAPI de células HeLa	87
3.13. Incorporación de los fotosensibilizadores por los diferentes sistemas de transporte	97
3.14. Estudio del efecto fototóxico de los fotosensibilizadores en los diferentes sistemas de transporte en células HeLa cultivadas <i>in vitro</i>	99
3.15. Incorporación de los fotosensibilizadores versus efecto fototóxico de los fotosensibilizadores en los diferentes sistemas de transporte en células HeLa cultivadas <i>in vitro</i>	111
Capítulo IV. Conclusiones.....	115
5. Bibliografía.....	118

Anexos.....	135
Publicaciones.....	177

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química del Azul de Toluidina (TBO ⁺).....	8
Figura 2. Estructura cristalográfica de la HSA. Se presenta los sub-dominio I, II, III, sitios Sudlow I y II y los sitios de unión del ácido mirístico.[44].....	11
Figura 3. Cucurbit[n]urilos. Las dimensiones son: (a) ancho externo 13.1-20.0 Å, (b) ancho de cavidad 4.4-11.7 Å, (c) ancho del portal 2.4-10.0 Å y (d) altura 9.1 Å.[61]	12
Figura 4. Espectro de absorción normalizado de TBO ⁺ , TBO ⁺ -C6 y TBO ⁺ -C14 en acetonitrilo (rojo, $\lambda_{\max}$ 626 nm), (negro, $\lambda_{\max}$ 547 nm) y (verde, $\lambda_{\max}$ 548 nm) respectivamente (izquierda). Espectro de emisión de fluorescencia normalizado excitando al máximo de absorbancia de cada fotosensibilizador (TBO ⁺ , rojo, λ_{ex} 626 nm, $\lambda_{\max}$ 658 nm), (TBO ⁺ -C6, negro, λ_{ex} 547 nm, $\lambda_{\max}$ 622 nm) y (TBO ⁺ -C14, verde, λ_{ex} 548 nm, $\lambda_{\max}$ 627 nm) respectivamente en las mismas condiciones experimentales (derecha).	40
Figura 5. Espectro de absorción del TBO ⁺ en acetonitrilo irradiado durante tres horas. La línea roja representa el espectro del TBO ⁺ a tiempo cero con un máximo de absorción de 626 nm en acetonitrilo.....	43
Figura 6. Estructura química y masa calculada para el TBO ⁺	44
Figura 7. Espectrometría de masas del TBO ⁺ en acetonitrilo control en oscuro.	45
Figura 8. Estructura química y masa calculada para el fotoproducto del TBO ⁺ a una hora de irradiación.	45
Figura 9. Espectrometría de masas del TBO ⁺ en acetonitrilo después de una hora de irradiación.	46
Figura 10. Estructura química y masa calculada para el fotoproducto del TBO ⁺ a tres horas de irradiación.	46
Figura 11. Estructura química y masa calculada para el fotoproducto oxigenado del TBO ⁺ generado durante la irradiación.	47
Figura 12. Espectrometría de masas del TBO ⁺ en acetonitrilo después de tres horas de irradiación.	47

Figura 13. Espectro de absorción del TBO ⁺ en acetonitrilo irradiado durante cinco horas. La línea azul representa el TBO ⁺ a tiempo cero y la línea roja el TBO ⁺ después de cinco horas de irradiación.....	48
Figura 14. Espectrometría de masas del TBO ⁺ en acetonitrilo después de cinco horas de irradiación.	49
Figura 15. Cinética de la fotodegradación del TBO ⁺ irradiado en acetonitrilo durante 230 minutos. Círculos rojos representa la cinética de fotodegradación a 595 nm, cuadrados azules a 610 nm y círculos verdes sin rellenar a 650 nm.	50
Figura 16. Espectro de absorción del TBO ⁺ en solución amortiguadora 0.1 M pH = 7 e irradiadas durante tres horas.....	51
Figura 17. Espectrometría de masas del TBO ⁺ en solución amortiguadora de fosfato 0.1 M pH = 7 e irradiadas durante tres horas.	52
Figura 18. Cinética de la fotodegradación del TBO ⁺ irradiado durante 230 minutos en solución amortiguadora de fosfato 0.1 M pH = 7. Círculos rojos representan la cinética de fotodegradación a 609 nm y círculos verdes sin rellenar verdes a 650 nm.	53
Figura 19. Espectro de Absorción de TBO ⁺ (4 µM) en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato en ausencia (rojo, λ _{max} 636 nm), en presencia de CB[7] 50 µM (azul, λ _{max} 631 nm)(izquierda). Espectro de emisión de fluorescencia excitado a 620 nm en ausencia (rojo, λ _{max} 670 nm) y presencia CB[7] (azul, λ _{max} 655 nm) en las mismas condiciones experimentales (derecha).	54
Figura 20. Espectro de absorción de TBO ⁺ -C6 en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato en ausencia (negro, λ _{max} 604 nm) y en presencia de CB[7] 50 µM (morado) (izquierda). Espectro de emisión de fluorescencia excitado a 610 nm en ausencia (negro, λ _{max} 645 nm) y presencia CB[7] (morado) en las mismas condiciones experimentales (derecha).	55
Figura 21. Espectro de absorción Normalizado de TBO ⁺ -C14 en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato en ausencia (verde, λ _{max} 609 nm) y en presencia de CB[7] 50 µM (anaranjado, λ _{max} 613 nm) (izquierda). Espectro de emisión de fluorescencia excitado a 610 nm en ausencia (verde, λ _{max} 651 nm) y presencia CB[7] excitado a 620 nm (anaranjado, λ _{max} 652 nm) en las mismas condiciones experimentales (derecha).	55
Figura 22. Fluorescencia normalizada para el ABMA (1.6 µM) a 412 nm cuando se irradia con TBO ⁺ (4 µM) en la ausencia de CB[n]s (círculos rojos), en presencia de 50 µM CB[7] (cuadrados morados). Cuando se irradia con	

TBO⁺-C14 (4 μ M) en la ausencia de CB[n]s (cuadrados azules) y en presencia de 50 μ M CB[7] (cruces grises) en solución amortiguadora 10 mM de fosfato pH 7.0. Las muestras fueron irradiadas en el máximo de absorción con igual intensidad. 58

Figura 23. Isotherma de unión del TBO⁺ 2 μ M en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a CB[7] (0-30 μ M), excitando a 620 nm y recolectando los datos a 655 nm. 64

Figura 24. Isotherma de unión del TBO⁺-C6 2 μ M en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a CB[7] (0-30 μ M), excitando a 620 nm y recolectando los datos a 655 nm. 64

Figura 25. Isotherma de unión del TBO⁺-C14 2 μ M en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a CB[7] (0-30 μ M), excitando a 620 nm y recolectando los datos a 655 nm. 65

Figura 26. Estructura molecular optimizada del sistema TBO⁺-CB[7]. Dos conformaciones fueron analizadas (1 y 2). Las líneas verdes representan las interacciones de puentes de hidrógeno. Las distancias están en angstroms (Å). Código de colores: Blanco (H); gris (C), azul (N), amarillo (S). 66

Figura 27. Estructura optimizada del complejo de inclusión TBO⁺-C6@CB[7]. Dos conformaciones energéticamente posibles A y B fueron encontradas. . 67

Figura 28. Estructura optimizada del complejo de inclusión TBO⁺-C14@CB[7]. Dos conformaciones energéticamente posibles A y B fueron encontradas. . 67

Figura 29. Isotherma de unión del TBO⁺ 2 μ M en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a HSA (0-30 μ M), excitando a 550 nm y recolectando los datos a 660 nm. 68

Figura 30. Isotherma de unión del TBO⁺-C6 2 μ M en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a HSA (0-30 μ M), excitando a 550 nm y recolectando los datos a 660 nm. 69

Figura 31. Isotherma de unión del TBO⁺-C14 2 μ M en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a HSA (0-30 μ M), excitando a 550 nm y recolectando los datos a 660 nm. 69

Figura 32. Estudios de desplazamiento de competidores por medio de fluorescencia de HSA 5 μ M. Apagamiento de la fluorescencia intrínseca del Trp por la warfarina (0-10 μ M) (círculos rojos) excitando a 280 nm. Desplazamiento del TBO⁺-C14 10 μ M de HSA 5 μ M por la warfarina (0-10 μ M) (cuadrados azules) excitando a 280 nm. Inserto: Desplazamiento del TBO⁺-C14 10 μ M de HSA 5 μ M por la warfarina (0-10 μ M) (círculos rojos) excitando

a 550 nm. Experimentos realizados en solución amortiguadora de fosfato 10 mM pH 7.0. 72

Figura 33. Estudios de desplazamiento de competidores por medio de fluorescencia de HSA 2 μ M con warfarina 2 μ M por TBO⁺-C14 (0-10 μ M) excitando a 325 nm. Experimentos realizados en solución amortiguadora de fosfato 10 mM pH 7.0..... 73

Figura 34. Estudios de desplazamiento de competidores por medio de fluorescencia del TBO⁺-C14 10 μ M de HSA 5 μ M por el 4-iodobenzoato (0-10 μ M) excitando a 280 nm. Inserto: Desplazamiento del TBO⁺-C14 10 μ M de HSA 5 μ M por el 4-iodobenzoato (0-10 μ M) excitando a 550 nm. Experimentos realizados en solución amortiguadora de fosfato 10 mM pH 7.0. 74

Figura 35. Gráfico de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia del Trp de la HSA (5 μ M) por el TBO⁺ (0-10 μ M) en ausencia (círculos rojos) y presencia de CB[7] 50 μ M (cuadrados azules) en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato, excitando a 280 nm y recolectando los datos a 350 nm. 75

Figura 36. Gráfico de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia del Trp de la HSA (5 μ M) por el TBO⁺-C6 (0-10 μ M) en ausencia (círculos rojos) y presencia de CB[7] 50 μ M (cuadrados azules) en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato, excitando a 280 nm y recolectando los datos a 350 nm. 76

Figura 37. Gráfico de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia del Trp de la HSA (5 μ M) por el TBO⁺-C14 (0-10 μ M) en ausencia (círculos rojos) y presencia de CB[7] 50 μ M (cuadrados azules) en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato, excitando a 280 nm y recolectando los datos a 350 nm..... 76

Figura 38. Estudio de acoplamiento molecular inducido del derivado TBO⁺-C14 con la HSA (A) y el CB[7] con la HSA (B)..... 78

Figura 39. Estudio de acoplamiento molecular inducido del complejo biosupramolecular..... 79

Figura 40. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con DAPI (canal azul) y la incorporación de TBO⁺ 4 μ M solo y con los diferentes sistemas de transporte (canal rojo), en presencia de CB[7] 50 μ M (TBO⁺@CB[7]), CB[7] 50 μ M y HSA 15 μ M (TBO⁺@CB[7]:HSA) y HSA 15 μ M (TBO⁺:HSA). 89

Figura 41. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con DAPI (canal azul) y la incorporación de TBO⁺ 0.4 μ M solo y con los

diferentes sistemas de transporte (canal rojo), en presencia de CB[7] 50 μM ($\text{TBO}^+@\text{CB}[7]$), CB[7] 50 μM y HSA 15 μM ($\text{TBO}^+@\text{CB}[7]:\text{HSA}$) y HSA 15 μM ($\text{TBO}^+:\text{HSA}$). 89

Figura 42. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con DAPI (canal azul) y la incorporación de $\text{TBO}^+-\text{C6}$ 0.4 μM solo y con los diferentes sistemas de transporte (canal rojo), en presencia de CB[7] 50 μM ($\text{TBO}^+-\text{C6} @\text{CB}[7]$), CB[7] 50 μM y HSA 15 μM ($\text{TBO}^+-\text{C6}@\text{CB}[7]:\text{HSA}$) y HSA 15 μM ($\text{TBO}^+-\text{C6}:\text{HSA}$). 90

Figura 43. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con DAPI (canal azul) y la incorporación de $\text{TBO}^+-\text{C14}$ 0.4 μM solo y con los diferentes sistemas de transporte (canal rojo), en presencia de CB[7] 50 μM ($\text{TBO}^+-\text{C6} @\text{CB}[7]$), CB[7] 50 μM y HSA 15 μM ($\text{TBO}^+-\text{C14}@\text{CB}[7]:\text{HSA}$) y HSA 15 μM ($\text{TBO}^+-\text{C14}:\text{HSA}$). 91

Figura 44. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con DAPI (canal azul) y con SYTO 9 (canal verde). La superposición muestra los organelos teñidos. 92

Figura 45. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con WGA-Alexa 350 (canal azul), SYTO 9 (canal verde) y la incorporación de TBO^+ 0.4 μM (canal rojo) por medio del sistema de transporte de CB[7] 50 μM y HSA 15 μM ($\text{TBO}^+@\text{CB}[7]:\text{HSA}$). La superposición de los canales muestra en morado la localización subcelular del TBO^+ 94

Figura 46. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con Mitopainter Blue (canal azul), SYTO 9 (canal verde) y la incorporación de TBO^+ 0.4 μM (canal rojo) por medio del sistema de transporte de CB[7] 50 μM y HSA 15 μM ($\text{TBO}^+@\text{CB}[7]:\text{HSA}$). La superposición de los canales muestra en morado la localización subcelular del TBO^+ 95

Figura 47. (Izquierda) Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con WGA Alexa 350 (canal azul), SYTO 9 (canal verde) y la incorporación de $\text{TBO}^+-\text{C14}$ 0.4 μM (canal rojo, arriba) y $\text{TBO}^+-\text{C6}$ 0.4 μM (canal rojo, abajo), por medio del sistema de transporte de CB[7] 50 μM y HSA 15 μM ($\text{TBO}^+\text{C14}@\text{CB}[7]:\text{HSA}$, arriba) y ($\text{TBO}^+\text{C6}@\text{CB}[7]:\text{HSA}$, abajo). (Derecha) Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con Mitopainter Blue (canal azul), SYTO 9 (canal verde) y la incorporación de $\text{TBO}^+-\text{C14}$ 0.4 μM (canal rojo, arriba) y $\text{TBO}^+\text{C6}$ 0.4 μM (canal rojo, abajo), por medio del sistema de transporte de CB[7] 50 μM y HSA 15 μM ($\text{TBO}^+\text{C14}@\text{CB}[7]:\text{HSA}$, arriba) y ($\text{TBO}^+\text{C6}@\text{CB}[7]:\text{HSA}$, abajo). La superposición de los canales muestra en morado la localización subcelular del $\text{TBO}^+-\text{C14}$ (arriba) y $\text{TBO}^+-\text{C6}$ (abajo). 96

Figura 48. Estudios de incorporación del TBO⁺ y del derivado TBO⁺-C14 solos y con los diferentes sistemas de transporte a 90 minutos de incorporación. (Izquierda) TBO⁺-C14 0.4 μM solo y con los diferentes sistemas de transporte, en presencia de CB[7] 50 μM (TBO⁺-C14@CB[7]), CB[7] 50 μM y HSA 15 μM (TBO⁺-C14@CB[7]:HSA) y HSA 15 μM (TBO⁺-C14:HSA). (Derecha) TBO⁺ 0.4 μM solo y con los diferentes sistemas de transporte, en presencia de CB[7] 50 μM (TBO⁺@CB[7]), CB[7] 50 μM y HSA 15 μM (TBO⁺@CB[7]:HSA) y HSA 15 μM (TBO⁺:HSA). 99

Figura 49. Estudios de fototoxicidad del TBO⁺ solo y con los diferentes sistemas de transporte. Los sistemas fueron incorporados durante 5 minutos e irradiadas durante 90 minutos. Barras oscuras controles en oscuro y barras en rojo muestras irradiadas. TBO⁺ 0.4 μM solo y con los diferentes sistemas de transporte, en presencia de CB[7] 50 μM (TBO⁺@CB[7]), CB[7] 50 μM y HSA 15 μM (TBO⁺@CB[7]:HSA) y HSA 15 μM (TBO⁺:HSA). 101

Figura 50. Estudios de fototoxicidad del TBO⁺ solo y con los diferentes sistemas de transporte. Los sistemas fueron incorporados durante 90 minutos e irradiadas durante 90 minutos. Barras oscuras controles en oscuro y barras en rojo muestras irradiadas. TBO⁺ 0.4 μM solo y con los diferentes sistemas de transporte, en presencia de CB[7] 50 μM (TBO⁺@CB[7]), CB[7] 50 μM y HSA 15 μM (TBO⁺@CB[7]:HSA) y HSA 15 μM (TBO⁺:HSA). 103

Figura 51. Estudios de fototoxicidad del TBO⁺-C14 solo y con los diferentes sistemas de transporte. Los sistemas fueron incorporados durante 90 minutos e irradiadas durante 90 minutos. Barras oscuras controles en oscuro y barras en rojo muestras irradiadas. TBO⁺-C14 0.4 μM solo y con los diferentes sistemas de transporte, en presencia de CB[7] 50 μM (TBO⁺-C14@CB[7]), CB[7] 50 μM y HSA15 μM (TBO⁺-C14@CB[7]:HSA) y HSA 15 μM (TBO⁺-C14:HSA). 110

Figura 52. Estudios de fototoxicidad del TBO⁺-C6 solo y con los diferentes sistemas de transporte. Los sistemas fueron incorporados durante 90 minutos e irradiadas durante 90 minutos. Barras oscuras controles en oscuro y barras en rojo muestras irradiadas. TBO⁺-C6 0.4 μM solo y con los diferentes sistemas de transporte, en presencia de CB[7] 50 μM (TBO⁺-C6@CB[7]), CB[7] 50 μM y HSA15 μM (TBO⁺-C6@CB[7]:HSA) y HSA 15 μM (TBO⁺-C6:HSA). 111

Índice de Tablas

Tabla 1. Valores calculados de log P y log D ^a para los derivados.....	38
Tabla 2. Tiempos de vida de fluorescencia para el TBO ⁺ y los derivados TBO ⁺ -C6 y TBO ⁺ -C14 en CH ₃ CN bajo una atmósfera de nitrógeno.	40
Tabla 3. Determinación del tiempo de vida del estado excitado triplete en atmósfera de Argón y rendimiento cuántico de oxígeno singlete para el TBO ⁺ TBO ⁺ -C6 y TBO ⁺ -C14 en acetonitrilo. Equilibrado a la atmósfera.	42
Tabla 4. Tiempos de vida de fluorescencia para el TBO ⁺ , TBO ⁺ -C6, TBO ⁺ -C14 solos y en complejos con CB[7] en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato.	57
Tabla 5. Determinación del tiempo de vida del estado excitado triplete y rendimiento cuántico de oxígeno singlete para el TBO ⁺ y TBO ⁺ @CB[7].	59
Tabla 6. Resumen de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del TBO ⁺ , TBO ⁺ -C6 y TBO ⁺ -C14.	60
Tabla 7. Resumen de las constantes de asociación obtenidas por fluorescencia. Las soluciones fueron preparadas en solución amortiguadora (pH = 7) de fosfato 10 mM.	77
Tabla 8. Resumen de los parámetros termodinámicos obtenidos por ITC. Las soluciones fueron preparadas en solución amortiguadora (pH = 7) de fosfato 10 mM.	81
Tabla 9. Comparación de las constantes de asociación obtenidas para los fotosensibilizadores con el CB[7] y HSA por medio de técnicas de fluorescencia y por ITC. Las soluciones fueron preparadas en solución amortiguadora (pH = 7) de fosfato 10 mM.	84
Tabla 10. Resultados de toxicidad en oscuro a 24 horas de incubación de diferentes concentraciones de fotosensibilizadores en células HeLa cultivadas <i>in vitro</i>	87

Índice de Esquemas

Esquema 1. (a) Representación de la PDT y como el PS induce muerte celular, (b) Diagrama de Jablonski de un PS en donde se representa su desactivación de estados excitados y reacciones fotoquímicas. 3

Esquema 2. Reacción del TBO⁺ con el ácido caproico (C6) y con el ácido mirístico (C14) para preparar los respectivos derivados. 37

Resumen

En el contexto de la terapia fotodinámica del cáncer, en este trabajo se prepararon derivados hidrofóbicos del fotosensibilizador azul de toluidina con ácidos grasos para incrementar su hidrofobicidad y así aumentar su afinidad con la proteína albúmina de suero humano y de igual manera mejorar su incorporación a células tumorales cultivadas *in vitro*. La investigación se centró en la caracterización de los complejos de inclusión del azul de toluidina y sus derivados hidrofóbicos con el macrociclo cucurbit[7]urilo (CB[7]), los aductos del fotosensibilizador y sus derivados hidrofóbicos con la proteína albúmina de suero humano (HSA) y los complejos biosupramoleculares constituidos de los tres componentes. Los resultados obtenidos demuestran que la longitud de la cadena hidrocarbonada tiene un efecto en asociación tanto con el CB[7] como con la HSA. Se pudo evidenciar que la encapsulación genera más oxígeno singlete que las moléculas solas. Por medio de microscopía de fluorescencia se determinó la localización subcelular de los fotosensibilizadores y se pudo observar que independientemente del sistema de transporte utilizado el azul de toluidina y los derivados hidrofóbicos se localizan preferentemente en las mitocondrias y en menor medida en otros organelos como el Retículo Endoplasmático y/o el Aparato de Golgi. Los experimentos de fototoxicidad en las células tumorales cultivadas *in vitro*, demostraron que mientras que para el derivado hidrofóbico del azul de toluidina con ácido mirístico independiente del sistema de transporte utilizado el efecto fototóxico es similar; sin embargo para el azul de toluidina tanto el complejo biosupramolecular como el aducto de inclusión con HSA presentaron una fototoxicidad considerablemente más altas que el azul de toluidina solo y su complejo de inclusión correspondiente. Los resultados muestran el potencial de los complejos biosupramoleculares en terapia fotodinámica.

Abstract

As a contribution to the research in the area of photodynamic therapy, hydrophobic derivatives of the photosensitizer toluidine blue were prepared with fatty acids in order to increase its hydrophobicity, and the affinity to human serum albumin protein, as well as, the incorporation within tumor cells cultivated *in vitro*. The research revolved around the characterization of the inclusion complexes of toluidine blue and its hydrophobic derivatives with the macrocycle cucurbit[7]uril (CB[7]), the protein adducts between the human serum albumin (HSA) and the photosensitizer and its hydrophobic derivatives, and the biosupramolecular assemblies constituted by the interaction of the three components. The results reported herein demonstrated that the length of the hydrophobic chain had an effect on the association with CB[7], as well as with HSA. It was clear from the results that the encapsulation within CB[7] generated more singlet oxygen. The cellular sub-localization of the photosensitizers was determined by fluorescence microscopy, and it was observed that regardless of the drug delivery system used, the photosensitizers accumulated preferentially at the Mitochondria and to a lesser extent in another organelles, such as Endoplasmic Reticulum and/or Golgi Apparatus. The experiments of phototoxicity in the tumor cells cultivated *in vitro* showed that the hydrophobic derivative prepared with myristic acid, regardless of the drug delivery system used, the phototoxicity was similar; nevertheless, for the parent compound toluidine blue the biosupramolecular assembly, as well as the protein adduct with HSA showed a considerable phototoxicity when compared with toluidine blue by itself and its corresponding inclusion complex. These results demonstrated the potential applications of biosupramolecular assemblies in photodynamic therapy.

Capítulo I. Introducción

1.1. Generalidades del Cáncer

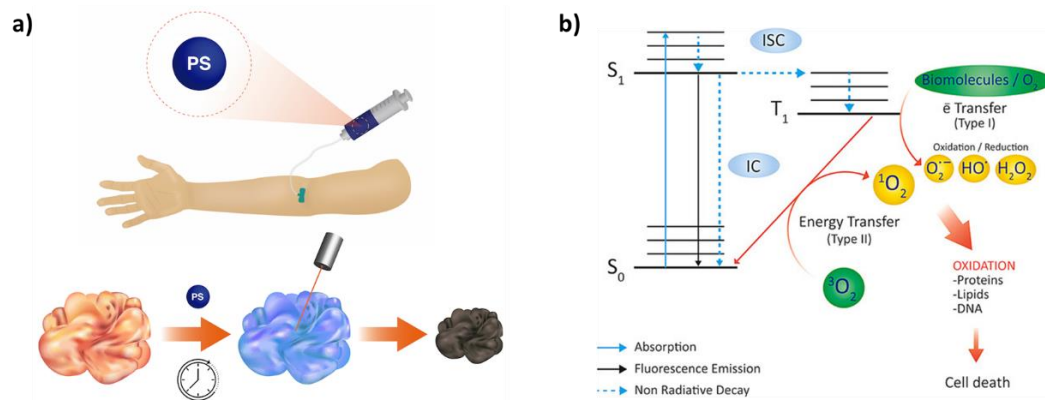
El término cáncer se refiere a un conjunto de enfermedades en las cuales células anormales se dividen sin control y pueden invadir tejidos cercanos. De igual manera, el cáncer también se puede distribuir a otras partes del cuerpo por medio de la sangre o el sistema linfático. Ésta es una enfermedad que está entre las principales razones de mortalidad en el mundo en donde se estima que fallecerán en el 2018 aproximadamente 9.6 millones de personas y aproximadamente 18.1 millones de casos nuevos a nivel mundial para este 2018. Solamente en América, se estima un 21.0% de incidencia y 14.4% de la mortalidad mundial para este año.[1]

Se han realizado muchas inversiones para crear fármacos para el tratamiento de esta enfermedad. Diversos grupos de investigación trabajan alrededor del mundo en busca de fármacos con actividad biológica contra el cáncer, mejorando su relación estructura-actividad. A pesar de esto, las pruebas clínicas para los diversos tipos de fármacos que han demostrado potencial actividad lamentablemente no han tenido el resultado óptimo.[2]

Además de lo anteriormente expuesto, otro gran problema que presentan los agentes terapéuticos utilizados para el tratamiento sintomático del cáncer es la resistencia que se presenta para los fármacos utilizados en la quimioterapia, lo que también limita el tratamiento.[3] Se ha evidenciado que el cuerpo puede presentar resistencia intrínseca o adquirida. Esto quiere decir, que en la resistencia intrínseca, los tumores tienen factores preexistentes que hacen que la quimioterapia sea inefectiva. En cuanto a la resistencia adquirida, ésta se desarrolla durante el tratamiento del paciente por mutaciones durante la misma, también como respuestas de adaptación, tales como incrementar la expresión del blanco terapéutico y la activación de rutas alternas de señalización.[3, 4] Por ello es importante buscar alternativas terapéuticas en las cuales el organismo genere menor resistencia para el tratamiento de este

conjunto de enfermedades y obtener mejores resultados para mejorar la calidad de vida de los pacientes.

1.2. Terapia Fotodinámica del Cáncer



Esquema 1. (a) Representación de la PDT y como el PS induce muerte celular, (b) Diagrama de Jablonski de un PS en donde se representa su desactivación de estados excitados y reacciones fotoquímicas.[5]

La terapia fotodinámica del cáncer (PDT por sus siglas en inglés) fue descrita por primera vez en los inicios del 1900 y aprobada hace dos décadas como técnica para el tratamiento de enfermedades neoplásicas y no malignas por diversos países europeos y por la agencia de los Estados Unidos para la Administración de Alimentos y Fármacos, FDA (por sus siglas en inglés US Food and Drug Administration). Este tipo de terapia tiene la ventaja que puede cubrir los actuales estándares clínicos para su utilización.[6]

La PDT consiste en la incorporación selectiva de un fotosensibilizador (PS por sus siglas en inglés) al tejido o célula tumoral, y la posterior irradiación de este fotosensibilizador con luz de energía adecuada para que penetre el tejido a la longitud de onda de absorción del fotosensibilizador. Con esto se generan

especies reactivas de oxígeno lo que conlleva a la muerte de las células anormales. El mecanismo se basa en la excitación electrónica del fotosensibilizador por la acción de la luz, éste es excitado desde su estado basal (S_0) al primer estado singlete excitado (S_1), luego ocurre un cruce entre sistemas del fotosensibilizador del estado S_1 a un estado triplete excitado (T_1), que es desde el cual se llevan a cabo las reacciones químicas (Esquema 1). En la ausencia de un cruce entre sistemas (o bajo rendimiento cuántico del estado triplete) el fotosensibilizador retorna a su estado basal con la emisión de luz, proceso que es denominado como fluorescencia o por procesos de desactivación no radiativos o conversión interna. Un buen PS para PDT presenta un alto rendimiento cuántico de cruce entre sistemas. Es a partir de T_1 que se generan especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), principalmente oxígeno singlete (1O_2). El oxígeno molecular (O_2) en su estado basal existe como estado triplete y al recibir la energía del fotosensibilizador genera 1O_2 , proceso denominado mecanismo del Tipo II. Cabe destacar que en el mecanismo tipo II se regenera el PS por lo que este mecanismo es deseado en PDT. Adicionalmente algunos fotosensibilizadores pueden reaccionar directamente con moléculas orgánicas por procesos de transferencia de carga y formar radicales, proceso que se conoce como mecanismo del Tipo I (Esquema 1).[7] Dentro del contexto biológico, las proteínas son el principal blanco del oxígeno singlete debido a la oxidación de aminoácidos específicos, las bases nitrogenadas del ADN y los ácidos grasos de las membranas lo que puede llevar a la muerte celular de las células anormales ya sea por necrosis, apoptosis o autofagia.[7, 8]

1.3. Oxígeno Singlete

El oxígeno singlete fue descubierto en 1924 pero no fue hasta después de 1963 que se intensificó su estudio cuando Khan y Kasha interpretaron la quimioluminiscencia de la reacción de hipoclorito-peróxidos como causa de la generación de oxígeno singlete.[9] El oxígeno molecular tiene dos estados excitados singlete $^1\Delta_g$ de 95 kJ mol^{-1} ($22.5 \text{ kcal mol}^{-1}$) y $^1\Sigma_g^+$ de 158 kJ mol^{-1} ($31.5 \text{ kcal mol}^{-1}$) por encima del triplete basal $^3\Sigma_g^-$. [10] La configuración electrónica de estos estados se diferencia solamente por sus orbitales moleculares π -antienlazantes.[11]

La transición desde $^1\Delta_g$ hasta $^3\Sigma_g^-$ está prohibida por el espín, por lo cual $^1\Delta_g$ O_2 es una especie excitada con un tiempo de vida relativamente largo. La segunda especie excitada de oxígeno es de corta vida debido a la transición permitida por el espín al estado $^1\Delta_g$. Esta diferencia en estabilidad fue confirmada por los tiempos de vida de O_2 ($^1\Delta_g$) y O_2 ($^1\Sigma_g^+$) de 45 minutos y 7-12 s en fase gaseosa[12] y de 10^{-6} - 10^{-3} y 10^{-11} - 10^{-9} en solución respectivamente, dependiendo del solvente.[13]

Una vez formado el oxígeno singlete este puede ser desactivado por otras especies a su estado basal por medio de una desactivación física en la cual solo se desactiva el oxígeno singlete sin generar la formación de productos. Otra manera, es la desactivación química donde el desactivador reacciona con el oxígeno singlete para generar nuevos productos.[11]

La producción fotosensibilizada de oxígeno singlete tiene mucha importancia para las áreas de fotooxidación, daño al ADN, terapia fotodinámica del cáncer y para la ciencia de los polímeros.[11] Como previamente fue mencionado, por medio de la utilización de oxígeno molecular, luz de longitud de onda apropiada y un fotosensibilizador que absorba y pueda transferir esa energía para excitar el oxígeno a su estado singlete. Esta generación fotosensibilizada

de oxígeno singlete es simple y puede controlarse, lo que explica que forma parte de un amplio campo de investigación.[11]

Cada molécula de fotosensibilizador típicamente puede producir 10^3 - 10^5 moléculas de $^1\text{O}_2$ antes de ser degradadas por fotoblanqueo por el $^1\text{O}_2$ o por otros procesos.[11] La generación de oxígeno singlete por fotosensibilizadores se mide por medio de su rendimiento cuántico de oxígeno singlete. El rendimiento cuántico para la desactivación de oxígeno se puede determinar por medio de la consideración de los diversos procesos fotofísicos y fotoquímicos involucrados.[11]

1.4. Fotosensibilizadores

Los fotosensibilizadores utilizados en PDT son clasificados como del tipo porfirinas y no porfirinas. Los fotosensibilizadores del tipo porfirina son clasificados además como de primera, segunda y tercera generación.[14] Los fotosensibilizadores de primera generación incluyen el derivado de la Hematoporfirina (HpD) y Photofrin®. Debido a problemas de fotosensibilidad cutánea y poca penetración de la luz requerida en el tejido, se desarrollaron los fotosensibilizadores de segunda generación como las ftalocianinas, metaloporfirinas, protoporfirinas, clorinas y otros.[15] En cuanto a los fotosensibilizadores de tercera generación se han denominado con este nombre a los fotosensibilizadores de segunda generación asociados a transportadores tales como anticuerpos y liposomas (para potenciar su acumulación selectiva en el tejido tumoral).[16] A pesar que los fotosensibilizadores del tipo porfirina son los más utilizados, también se han realizados estudios para caracterizar y obtener fotosensibilizadores del tipo no porfirina, como lo son las cianinas, antraciclinas, azul de metileno, azul de toluidina y otros.[17]

Los fotosensibilizadores como pieza fundamental de la terapia fotodinámica deben poseer características específicas para maximizar su utilidad y potenciar sus efectos. Entre estas características deben: (1) tener un alto rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete; (2) alto coeficiente de absorción entre los 600 nm a 800 nm; (3) no presentar toxicidad en oscuro y sólo ser citotóxico en presencia de luz; (4) no generar metabolitos tóxicos; (5) acumularse selectivamente en el tejido tumoral y ser eliminado eficientemente; (6) distribuirse de manera adecuada lo cual se favorece al ser anfifílico para que sea soluble en agua y también pueda cruzar la membrana de la célula; (7) ser químicamente estable y soluble para la preparación en formulaciones farmacéuticas inyectables; (8) ser químicamente puro y ser sintetizado fácilmente; (9) de bajo costo y disponible de manera comercial y (10) no debe ser agente mutagénico o cancerígeno.[18]

A la fecha se encuentran aprobado clínicamente para ser utilizados en terapia fotodinámica para el cáncer la Photofrin[®], Levulan[®], Metvix[®], Foscan[®], NPe6 y otros.[19] Actualmente, se continua investigando arduamente para obtener un fotosensibilizador con las características ideales, pero todavía no se ha podido lograr.[20]

1.5. Azul de Toluidina

El azul de toluidina (TBO⁺) es un colorante orgánico catiónico de la familia de las fenotiazinas (ver figura 1). Se ha reportado que una vez irradiado puede erradicar varios agentes microbianos *in vitro*. [21-23] También se ha demostrado que tiende a acumularse en las células tumorales *in vivo*. [24-26] El TBO⁺ se ha utilizado en aplicaciones tópicas por más de treinta años para ayudar en la detección ciertos tipos de cáncer de la cavidad oral y de la parte superior del tracto gastrointestinal. [24-26] Es utilizado como fotosensibilizador

en PDT porque ha presentado baja toxicidad en oscuro, selectividad hacia el tejido neoplásico y puede inducir apoptosis.[27]

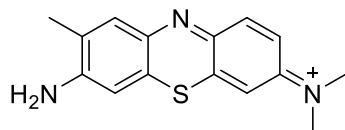


Figura 1. Estructura química del Azul de Toluidina (TBO⁺).

1.6. Aspectos relevantes de la Terapia Fotodinámica del Cáncer

Una de las características importantes de resaltar de la terapia fotodinámica como tratamiento terapéutico es su capacidad de poder ser utilizada en combinación con otras técnicas de tratamiento de estas patologías. Se ha combinado satisfactoriamente con otras modalidades terapéuticas tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia, hipertermia y terapia sonodinámica, entre otras.[28]

La terapia fotodinámica del cáncer, dependiendo de la sublocalización celular del fotosensibilizador y la dosificación de la luz utilizada, puede generar apoptosis, necrosis o autofagia como mecanismo de muerte celular. Se ha reportado que se pueden utilizar combinaciones de fotosensibilizadores que se acumulen en diferentes compartimientos celulares para incrementar la eficacia de la terapia.[29, 30]

Otra característica importante de resaltar de la PDT es que se ha propuesto que se puede utilizar para mitigar el problema de la resistencia a los fármacos utilizados en los tratamientos del cáncer,[31] ya que se ha reportado que la PDT puede ocasionar fotodaño a las proteínas asociadas a la resistencia de los fármacos utilizados en terapias para el cáncer. Algunos regímenes de baja dosificación de la terapia también pueden estimular inmunidad antitumoral

solo[32, 33] o en combinación con agentes inmunoestimulatorios.[34] De igual manera estos, en combinación con regímenes de alta dosificación pueden lograr el control del tumor con supresión de la inmunidad.[33] Otra aplicabilidad de la PDT es que se ha utilizado el intervalo de administración con el de irradiación para diferentes blancos en los compartimientos del tumor.[35-37] Se ha postulado que la PDT se puede utilizar para incrementar el transporte de los fármacos, ya que incrementaría de manera transitoria la permeabilidad de los vasos sanguíneos lo cual permite el incremento del transporte de fármacos que utilizan como sistemas de transporte macromoléculas y nanopartículas hacia el tumor.[38-40] Esto lo han denominado SUPR, por sus siglas en inglés que significan super-enhanced permeability and retention, porque hacen que incremente mucho más lo denominado EPR, por sus siglas en inglés enhanced permeability and retention effect, que es ampliamente conocido que los tumores tienen mayor permeabilidad y retención que el tejido normal.[41] Aunado a esto, puede facilitar el transporte de fármacos macromoleculares que normalmente no ingresan a las células. La internalización fotoquímica de fármacos utiliza los mismos principios que la PDT para controlar el acceso de agentes terapéuticos que no pueden ingresar a los blancos intracelulares.[42]

1.7. La Albúmina de suero humano y el transporte de fármacos

Los fármacos aprobados para el tratamiento del cáncer utilizados en quimioterapia no presentan selectividad para su incorporación y solamente bajas dosis de los mismos logran alcanzar el tejido tumoral.[43] Para mejorar el transporte de los fármacos utilizados en la terapia contra el cáncer se han utilizado macromoléculas como los anticuerpos, proteínas séricas como la albúmina y lipoproteínas de baja densidad.[43] A medida que se da el crecimiento de los tumores éstos se expanden y forman redes de capilares las cuales necesitan la constante provisión de nutrientes para mantener su

crecimiento, motivo por el cual para garantizar su sostenibilidad las células tumorales selectivamente permiten el ingreso de vitaminas, factores de crecimiento y proteínas séricas que circulan en el torrente sanguíneo.[43] La vascularidad anómala de las células tumorales permite la incorporación de las proteínas más abundantes del plasma como es la albúmina de suero humano (HSA por sus siglas en inglés) que tiene una concentración aproximada de 35-50 mg/mL, la transferrina (2.5-3.5 mg/mL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés, 5-20 mg/mL).[43, 44] La HSA es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo, motivo por el cual se ha utilizado como agente transportador de fármacos ya que su función biológica es transportar ácidos grasos, moléculas endógenas y exógenas.[44, 45] Debido a su largo periodo de circulación en el torrente sanguíneo se ha estudiado ampliamente para su utilización como transportador de agentes terapéuticos y se ha descrito la farmacocinética y farmacodinámica de los agentes que se asocian a ella.[43-46] La HSA cuenta con cinco sitios específicos de unión para ácido mirístico (Myr)[47] y dos sitios conocidos como Sudlow I y Sudlow II (ver figura 2), que fueron ampliamente descritos y sus propiedades fisicoquímicas estudiadas por el investigador Sudlow.[48] En estos sitios dónde muchos fármacos y agentes utilizados para la terapia fotodinámica se unen cuando son transportados por la HSA.[48-54]

La HSA es una proteína monomérica de 585 residuos de aminoácidos que posee tres dominios homólogos helicoidales (I-III), que a su vez se subdividen en dos sub-dominios cada uno. La estructura cristalográfica de la HSA está disponible lo cual hace posible el diseño de fármacos cuyas estructuras se unan de manera específica a los sitios Sudlow I ó II (según la Figura 2),[48] los cuales se encuentran dentro de los subdominios IIA y IIIA respectivamente (Figura 2).[55] La HSA contiene 35 residuos de cisteína (Cys) de los cuales 34 participan en 17 puentes de disulfuro para darle estabilidad a su estructura terciaria y una Cys (SH) libre, 18 residuos de tirosina (Tyr) y un sólo residuo de triptófano (Trp 214) que se encuentra en el sitio Sudlow I lo cual permite

utilizar el apagamiento de la fluorescencia intrínseca para determinar la unión específica a este sitio.[52-54, 56, 57]

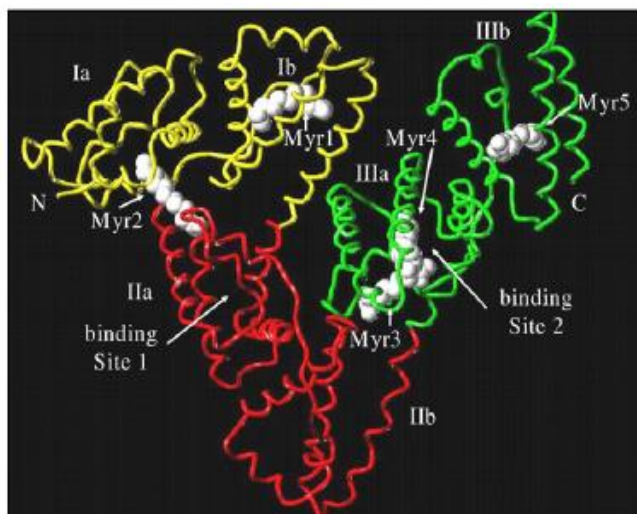


Figura 2. Estructura cristalográfica de la HSA. Se presenta los sub-dominio I, II, III, sitios Sudlow I y II y los sitios de unión del ácido mirístico.[44]

Las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los fotosensibilizadores cuando están asociados a la HSA pueden sufrir cambios que disminuyan la generación de ROS, al igual que se favorece el proceso de fotooxidación de la HSA, llevando a una disminución de la fototoxicidad. [58, 59] Es por esto por lo que existen otros vehículos capaces de mejorar las propiedades fotoquímicas de los fotosensibilizadores.

1.8. Los Cucurbiturilos y su potencial como transportadores de fármacos

Los cucurbiturilos, ($CB[n] = 5-8, 10$), son una familia de contenedores moleculares que se han designado así por su forma parecida a la de una calabaza (Figura 3). Los $CB[n]$ son macrociclos sintéticos constituidos por la condensación de unidades de glicourilos, unidas a través de puentes de metileno para formar un macrociclo con una cavidad hidrofóbica, la cual es

accesible a las moléculas huésped por medio de dos portales idénticos.[60] Estos macrociclos han generado mucha discusión y trabajo en la última década por sus propiedades de unión a moléculas con carga positiva y neutras.[61] Para esta investigación estos macrociclos son de interés ya que se ha demostrado que pueden asociarse con colorantes orgánicos,[62] que pueden ser utilizados como fotosensibilizadores en la terapia fotodinámica. Estas moléculas interaccionan con los CB[n] por medio de interacciones hidrofóbicas o por cationes metálicos y las aril o alquilaminas a través de interacciones ion-dipolo con los carbonilos del portal del macrociclo.[63]

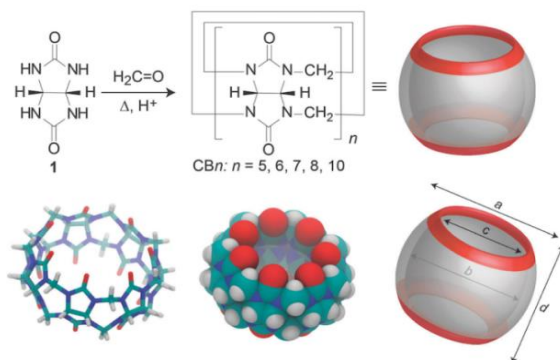


Figura 3. Cucurbit[n]urilos. Las dimensiones son: (a) ancho externo 13.1-20.0 Å, (b) ancho de cavidad 4.4-11.7 Å, (c) ancho del portal 2.4-10.0 Å y (d) altura 9.1 Å.[61]

El incremento en el tamaño del portal a lo largo de la serie de los cucurbiturilos les confiere propiedades de reconocimiento diferentes. El CB[5] se asocia a moléculas pequeñas como gases y cationes.[63] CB[6] forma complejos con diaminoalcanos, bencilaminas y iones de metales alcalinos.[63, 64] Dentro de esta familia de macrociclos, CB[7] ha generado mucho interés por su elevada solubilidad en agua, además de su tamaño que permite el ingreso de moléculas de interés para formar complejos 1:1.[63] Para las aplicaciones estudiadas en la presente tesis se ha determinado que el CB[7] forma complejos estables con colorantes fluorescentes lo que lo hace muy útil para este trabajo.[63, 65-67] El CB[8] tiene una cavidad más grande, por lo cual forma complejos del tipo 1:2 ó complejos ternarios 1:1:1.[68-71] Dentro de esta

serie el más grande es el CB[10] el cual puede encapsular al CB[5] y cromóforos más grandes.[72]

Los CB[*n*] se han estudiado por sus aplicaciones como vehículo para el transporte de fármacos, ya que tienen la capacidad de secuestrar las moléculas en su interior generando una barrera estérica que evita la degradación y desactivación de las propiedades terapéuticas de los fármacos.[73, 74] Además de esto, evitan la agregación de fármacos mejorando su solubilidad,[62, 74] característica que es muy deseada para la formulación.[73, 74] En el contexto de esta investigación, interesa que las interacciones generadas por la química de huésped-anfitrión puedan permitir influenciar las propiedades fotofísicas de los fotosensibilizadores.[75, 76]

No se ha reportado toxicidad intrínseca de los cucurbiturilos y se ha demostrado que: pueden atravesar la membrana celular, potencian la actividad terapéutica de los fármacos y los protegen de la fotodegradación de acuerdo con estudios reportados por diversos investigadores.[73, 74, 77-79]

Se reportó que la encapsulación con CB[7] protege a la Camptotecina (CPT) de la hidrólisis, asociada a efectos secundarios adversos como agente anti-cáncer y ha generado limitaciones en su uso en aplicaciones clínicas; al evitar la hidrólisis de la lactona se minimiza la citotoxicidad no específica.[80] La encapsulación de la benzocaína y su metabolito el ácido para-aminobenzoico en CB[7] incrementa la bioadsorción y reduce la metahemoglobinemia al igual que las reacciones alérgicas ocasionadas por el ácido para-aminobenzoico cuando la benzocaína es metabolizada en el organismo.[81] De igual forma, se demostró que la encapsulación del anestésico general mesilato de tricaína (TM por sus siglas en inglés) en CB[7] podría revertir el efecto anestésico del mismo, lo cual tiene amplia aplicabilidad para pacientes sensibles a los anestésicos.[82] Otra aplicación importante es que se demostró que la encapsulación con CB[7] inhibe la actividad neurodegenerativa de la neurotoxina *N*-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP por sus siglas en

inglés), la que cuando es metabolizada se transforma en *N*-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺), utilizado como modelo para estudiar la enfermedad de Parkinson.[83] Estos experimentos son ejemplos de la aplicabilidad que tiene la formación de complejos utilizando CB[7] en la industria farmacéutica y biomédica. A pesar de ello, los CB[*n*]s no muestran selectividad por las células tumorales, como sí lo muestra la HSA. Es por esto por lo que se propone combinar ambos sistemas en un solo vehículo formando un complejo *biosupramolecular*.

1.9. Complejos Biosupramoleculares

En la literatura solamente hay tres investigaciones reportadas en la generación de complejos biosupramoleculares que incluyen Fotosensibilizadores-Cucuribiturilo-Proteína, de los cuales dos son utilizando albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés)[84, 85] y uno con HSA.[76] Bhasihuttan y colaboradores demostraron que la asociación entre las tres especies incrementa la fluorescencia del colorante.[84] Lei y colaboradores reportaron que con la formación del complejo hay un incremento en la constante de asociación a la proteína.[85] Scholtbach y colaboradores demostraron que la interacción que se genera entre el macrociclo y el colorante orgánico es tan fuerte que estos son los que interaccionan con la proteína, caracterizado por medio de la utilización de fluorescencia resuelta en el tiempo y anisotropía.[76]

Si se utiliza solamente los CB[*n*] habría que derivatizarlos para hacerlos específicos contra células tumorales,[86] pero tienen la ventaja que puede controlarse la liberación del fármaco.[87, 88] Al utilizar la HSA como transportador de fármacos tiene la desventaja de que la liberación del fármaco no es específica, ni puede controlarse.[44] Sin embargo, por su largo periodo de circulación en el torrente sanguíneo se ha utilizado exitosamente en la formulación de insulina de larga duración, Levemir[®] y Tresiba[®], y por su acumulación en tejido tumoral en el fármaco antitumoral Abraxane[®]. [45]

La formación de los complejos biosupramoleculares abre la puerta a una nueva área de investigación que no ha sido explorada. El uso de HSA y los CB[n] en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas como sistema transporte de fotosensibilizadores, para ser utilizados en la terapia fotodinámica, permitirían la acumulación de la HSA en los tejidos tumorales[44] y controlar la liberación de los fármacos encapsulándolos en el CB[7],[73] y así modificar sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas. Para ello es fundamental que el fotosensibilizador utilizado tenga afinidad tanto por el CB[7] como por HSA. Por esto se propone derivatizar el azul de toluidina, el cual ya es conocido por su acción anticancerígena, con ácidos grasos para hacerlo más afín a la HSA, al mismo tiempo que la estructura de fenotiazina con carga positiva de la molécula lo haga afín al CB[7], de manera de favorecer la formación de un complejo biosupramolecular. Se propone utilizar dos largos de cadena de 14 y 6 átomos de carbono, basados en el ácido mirístico que como se discutió presenta alta afinidad con la HSA, y otro basado en el ácido caproico para observar si el largo de cadena tiene algún efecto en la formación de los complejos y la fototoxicidad.

1.10. Hipótesis del Trabajo

El Azul de toluidina (TBO⁺) es un fotosensibilizador con potencial para aplicaciones en terapia fotodinámica. La obtención de derivados hidrofóbicos del TBO⁺, junto con la formación de complejos biosupramoleculares del tipo PS-CB[7], PS-HSA y PS-CB[7]-HSA permitirá mejorar su fotoactividad junto con su incorporación a células tumorales cultivadas *in vitro* y con esto potenciar la fototoxicidad.

1.11. Objetivos

Objetivo general

Preparar derivados hidrofóbicos de TBO⁺ para mejorar su transporte en complejos biosupramoleculares de derivados de TBO⁺-CB[7]-HSA y evaluar la fototoxicidad del TBO⁺ y de sus derivados en células tumorales cultivadas *in vitro*.

Objetivos específicos

1. Sintetizar derivados hidrofóbicos de TBO⁺ con ácidos grasos.
2. Caracterizar fotofísica y fotoquímicamente el TBO⁺ y sus derivados.
3. Determinar la asociación del TBO⁺ y sus derivados con el CB[7].
4. Determinar la asociación del TBO⁺ y sus derivados a la HSA.
5. Estudiar la formación de los complejos biosupramoleculares del tipo PS-CB[7]-HSA.
6. Determinar la sublocalización celular del TBO⁺, sus derivados y los complejos en células tumorales cultivadas *in vitro*.
7. Determinar la incorporación del TBO⁺, sus derivados y los complejos en células tumorales cultivadas *in vitro*.
8. Determinar la fototoxicidad de los complejos biosupramoleculares en células tumorales cultivadas *in vitro*.

Capítulo II. Parte Experimental

2.1. Reactivos

Cucurbit[7]urilo (CB[7]), Albúmina de suero humano (HSA $\geq 99\%$), ácido 9,10-antracenodiil-bis(metileno)dimalónico (ABMA por sus siglas en inglés), Rosa de Bengala, hexafluorofosfato de bis(ciclopentadienil) cobalto (III) ($\text{Cob}^+ \geq 98\%$), HATU, N,N-diisopropiletilamina (DIPEA), dimetilformamida (DMF) y piridina fueron obtenidos de Sigma y utilizados sin ninguna purificación. Los marcadores celulares DAPI, SYTO 9 y WGA-Alexa 350 se obtuvieron de Thermofisher. Mitopainter Blue (MitoBlue o Cytopainter) se obtuvo de abcam. Azul de Toluidina (TBO^+) fue obtenido de Sigma y purificado por cromatografía de capa fina, utilizando como eluyente etanol/HCl (99:1) y almacenado en metanol. El TBO^+ fue caracterizado por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H .

2.2. Síntesis y purificación del CB[7]

Se hicieron reaccionar 5.0 g de glicoluril con 2.0 g de paraformaldehído disueltos en 10 mL de una mezcla de 20% H_2SO_4 y 80% HCl. Se calentó a 80°C por 3 horas y luego se llevó a 100°C por 5 horas adicionales. La mezcla de productos fue precipitada con metanol, filtrada y secada en estufa a 70°C . El sólido fue sonificado en 60 mL de agua ultrapura y agitado por 1 hora a 40°C . La suspensión filtrada y se repitió el proceso una vez más con el sólido restante. El filtrado que contenía una mezcla de CB[7] y CB[5] se precipitó con metanol. El sólido fue agitado en 28 mL de una solución 20% glicerol en agua por 1 hora a 70°C , filtrado y nuevamente precipitado con metanol. Por último el sólido fue redissuelto en agua y se le adicionó la mitad del volumen de metanol para precipitar selectivamente el CB[7]. El producto se caracterizó por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y Espectrometría de Masas (EM).

2.3. Síntesis de los derivados de azul de toluidina:

2.3.1. Síntesis del derivado del ácido caproico

El ácido caproico (21.5 mg, 0.185 mmol) fue agitado por 30 minutos bajo una atmósfera de nitrógeno con HATU (70.0 mg, 0.185 mmol) en 2 mL de DMF, luego TBO⁺ (70.0 mg, 0.23 mmol) disueltos en 5 mL de DMF, DIPEA (37.1 mg, 0.287 mmol) y 20 µL de piridina fueron adicionados a la mezcla de la reacción, los cuales fueron agitados por 24 h bajo N₂ a temperatura ambiente. Los productos fueron extraídos con acetato de etilo después de una dilución del DMF con agua. La fase orgánica fue rotaevaporada hasta sequedad. La purificación de los productos fue realizada por una columna de silica gel eluyendo con CH₃CN 100%, luego CH₃CN:H₂O (99:1) y CH₃OH para obtener 29 mg del compuesto como un sólido de color azul/morado con un rendimiento de la reacción del 43%. El compuesto fue caracterizado por ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN-*d*₃) δ 0.89 (t, 3H), 1.30 (m, 4H), 1.55 (m, 2H), 1.86 (s, 3H), 2.25 (t, 2H), 2.73 (s, 6H). ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃CN) δ 14.08, 22.35, 22.92, 25.21, 31.86, 34.21, 38.73, 175.60. (ESI) *m/z* calcd., C₂₁H₂₆N₃OS⁺ [M]⁺ 368.18, detectada 368.37, espectroscopía UV-Vis: (CH₃CN) λ_{max} 547 nm, (H₂O) λ_{max} 604 nm, y emisión de fluorescencia: (CH₃CN) λ_{max} 622 nm, (H₂O) λ_{max} 645 nm.

2.3.2. Síntesis del derivado de ácido mirístico

El ácido mirístico (43.0 mg, 0.185 mmol) fue agitado por 30 minutos bajo una atmósfera de nitrógeno con HATU (70.0 mg, 0.185 mmol) en 2 mL de DMF, luego TBO⁺ (70.0 mg, 0.23 mmol) disueltos en 5 mL de DMF, DIPEA (37.1 mg, 0.287 mmol) y 20 uL de piridina fueron adicionados a la mezcla de la reacción, los cuales fueron agitados por 24 h bajo N₂ a temperatura ambiente. Los productos fueron extraídos con acetato de etilo después de una dilución del

DMF con agua. La fase orgánica fue rotaevaporada hasta sequedad. La purificación de los productos fue realizada por una columna de silica gel eluyendo con CH₃CN 100%, luego CH₃CN:H₂O (99:1) y CH₃OH para obtener 9 mg del compuesto como un sólido de color azul/morado con un rendimiento de la reacción del 10%. El compuesto fue caracterizado por ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*) δ 0.88 (t, 3H), 1.25 (m, 20H), 1.63 (m, 2H), 2.03 (s, 3H), 2.34 (t, 2H), 2.80 (s, 6H). (ESI) m/z calcd., C₂₉H₄₂N₃OS⁺ [M]⁺ 480.30, detectada 480.51, espectroscopía UV-Vis: (CH₃CN) λ_{max} 548 nm, (H₂O) λ_{max} 609 nm y emisión de fluorescencia: (CH₃CN) λ_{max} 627 nm, (H₂O) λ_{max} 650 nm.

2.4. Espectrometría UHPLC-MS/MS

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

2.5. Preparación de las soluciones stock

Una solución concentrada de TBO⁺ y de cada derivado fue preparada en metanol aproximadamente 1 mM y alícuotas fueron tomadas para preparar las diferentes soluciones a las concentraciones necesarias realizar los distintos experimentos. Se prepararon soluciones 100 mM de Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄, fueron mezcladas para preparar una solución amortiguadora 10 mM de fosfato de pH 7. Se prepararon soluciones concentradas de CB[7] aproximadamente 1 mM. Las soluciones de CB[7] fueron tituladas con una solución de concentración conocida de Cob⁺ por medio de espectroscopia UV-Vis para determinar la concentración exacta de cada solución del macrociclo.[89]

2.6. Determinación de la formación de los complejos de inclusión del TBO⁺ y sus derivados con el CB[7] y los aductos con HSA

Los espectros de absorción se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro HP8453. Los espectros de emisión de fluorescencia fueron obtenidos excitando las muestras al máximo de absorción para las moléculas solas y en un punto donde no cambiara la absorción cuando se formaban los complejos y aductos con la HSA en un fluorímetro Perkin Elmer LS55. La temperatura fue mantenida a 25°C.

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

La asociación del TBO⁺ y sus derivados al CB[7] se determinó por medio de una curva de unión, en la cual se prepararon dos soluciones una con PS en concentración de 2 µM y la otra con el PS en concentración 2 µM y 30 µM del CB[7], ambas en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7. Se mezclaron ambas soluciones manteniendo constante la concentración del PS y variando la concentración del CB[7] de 0 hasta 30 µM, midiendo los cambios de intensidad de la fluorescencia en el máximo de emisión y se realizó análisis

numérico (Ecuación 1-4) para obtener las constantes de asociación.[76, 90] / corresponde a la intensidad de fluorescencia normalizada en presencia de CB[7] e I_0 en ausencia de CB[7]. C_{11} corresponde al cociente entre los rendimientos cuánticos de fluorescencia en presencia y ausencia de CB[7]. β_{11} corresponde a la constante de equilibrio para la formación del complejo 1:1 con CB[7]. El subíndice GF se refiere al CB[7] libre del huésped.

$$I = \frac{I_0}{TBO^+_{total}} \times ([TBO^+] + C_{11} \times [TBO^+@CB[7]]) \quad (1)$$

$$\beta_{11} = \frac{[TBO^+@CB[7]]}{[TBO^+][CB[7]]_{GF}} \quad (2)$$

$$[TBO^+]_{total} = [TBO^+] + [TBO^+@CB[7]] \quad (3)$$

$$[CB[7]]_{total} = [CB[7]]_{GF} + [TBO^+@CB[7]] \quad (4)$$

Ecuaciones 1-4. Ecuaciones utilizadas en el análisis numérico.

2.8. Determinación de las constantes de asociación con la HSA

La asociación del TBO^+ y sus derivados a la HSA se determinó por medio de una curva de unión, en la cual se prepararon dos soluciones una con PS en concentración de 2 μ M y la otra con PS en concentración 2 μ M y 30 μ M de la HSA, ambas en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7. Se mezclaron ambas soluciones manteniendo constante la concentración del PS y variando la concentración de la HSA de 0 hasta 30 μ M, se midieron los cambios de intensidad de la fluorescencia en el máximo de emisión y se realizó análisis numérico para obtener las constantes de asociación de manera análoga a la mostrada arriba con el CB[7].[76, 90] De igual manera, por medio del apagamiento de la fluorescencia intrínseca del Trp de la HSA se construyó un gráfico de Stern-Volmer por medio del cual se obtuvo las constantes de

unión para el PS-HSA y para el complejo biosupramolecular PS-CB[7]-HSA.[76] La localización del azul de toluidina y sus derivados en la HSA se determinó por medio de la unión de inhibidores que bloquean los sitios I y II como lo son warfarina y el 4-iodobenzoato respectivamente.[91]

2.9. Tiempos de vida de fluorescencia

Los tiempos de vida se determinaron mediante la técnica TCSPC utilizando un fluorímetro resuelto en el tiempo LifeSpecII de Edinburgh Instruments provisto de un detector PMT Hamamatsu, doble monocromador para evitar la dispersión temporal. Las muestras en solución amortiguadora fueron excitadas utilizando un diodo láser de 638 nm y las muestras en acetonitrilo fueron excitadas utilizando un diodo láser de 506 nm y la emisión fue colectada en el máximo de emisión entre 2,000 y 5,000 cuentas.[76, 91, 92] El decaimiento de la fluorescencia (I) fue colectado para el TBO⁺, TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 solos y en la presencia de CB[7] preparados en solución amortiguadora de fosfato 10 mM de pH 7. También se colectó el decaimiento de fluorescencia (I) para el TBO⁺, TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 en acetonitrilo. Se ajustaron los decaimientos a una ecuación exponencial (Ecuación 5), donde τ_i corresponde a los tiempos de vida de fluorescencia de las especies i y A_i corresponden a los factores pre-exponenciales. La respuesta del instrumento (IRF) se midió utilizando una solución de Ludox (silica gel) diluida en agua. Se verificó que el ajuste sea el adecuado si los valores de χ^2 están entre 0.9 y 1.2, y si los residuales están distribuidos al azar.[90]

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

Ecuación 5. Ajuste del decaimiento de fluorescencia.

2.10. Determinación de las constantes de asociación por Calorimetría de Titulación Isotérmica

Se prepararon muestras de los PS a concentraciones de 15 μM y 40 μM para determinar las constantes de asociación con CB[7] de concentración 864 μM y HSA de concentración 900 μM . Se utilizó un microcalorímetro MicroCal PEAQ-ITC de Malvern Panalytical para determinar las constantes de asociación y los parámetros termodinámicos a una temperatura de 25 °C. Se realizaron 18 inyecciones de 2 μL del CB[7] o la HSA sobre el fotosensibilizador. Los datos obtenidos fueron ajustados a un modelo de asociación de 1:1.

2.11. Irradiación de las muestras en solución

Las muestras en solución fueron irradiadas por 15 minutos en el máximo de absorción utilizando una intensidad de luz de 45 W m^{-2} medida con un radiómetro, YSI Kettering 65A radiómetro, en un equipo PTI con una lámpara de Xenón de 150 W como fuente de luz. La longitud de onda para la irradiación fue seleccionada con un monocromador con un ancho de banda de 10 nm, las muestras fueron agitadas constantemente con un agitador magnético y la temperatura controlada por un baño termostático a 20 °C. Las soluciones fueron equilibradas al aire. Para los experimentos de fotodegradación las muestras fueron irradiadas durante 230 minutos con un proyector con un espectro de luz de 350 a 850 nm con un máximo de 550 nm medido con un espectroradiómetro Luzchem modelo SPR-01-235-850 nm y una intensidad de 195 W / m^2 medido con un fotoradiómetro Delta OHM modelo HD 2302.0.

2.12. Determinación de oxígeno singlete

La generación de oxígeno singlete se determinó en forma indirecta siguiendo la disminución de la emisión de fluorescencia del ácido 9,10-antracenediil-

bis(metileno)dimalónico (ABMA por sus siglas en inglés) 1.6 μM excitando las muestras a 395 nm con una emisión a 412 nm.[93] La determinación directa de oxígeno singlete se realizó determinando los decaimientos de la luminiscencia utilizando un espectrómetro Fluotime 200 que cuenta con un escalador multicanal Nanoharp 200. Las muestras fueron excitadas a 532 nm con un láser FTSS355-Q3 (Crystal Laser, Berlin, Germany) trabajando a 1 kHz de periodo de repetición. La detección a 1270 nm se realizó por medio de un NIR PMT H10330A (Hamamatsu). Los rendimientos cuánticos relativos de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) fueron evaluados comparando los términos pre-exponenciales al tiempo cero para las señales a 1270 nm ajustada a la misma densidad óptica. Adicionalmente, el tiempo de vida del estado excitado triplete fue determinando por el tiempo de crecimiento del decaimiento. Se utilizó como referencia Rosa de bengala ($\Phi_{\Delta}=0.76$).[94]

2.13. Mediciones del estado excitado triplete

Los espectros de absorción transiente y los tiempos de vida de los transientes se obtuvieron utilizando un espectrómetro de Láser Flash Fotólisis de Edinburgh Instruments LP980. La bomba de la fuente excitación consiste de un sistemas Aurora II Integra30 Nd:YAG/OPO, el cual permite la selección de la longitud de onda de excitación, y el detector es un PMT (tiempo de vida) o cámara CCD (espectro). Las muestras fueron purgadas con Argón antes de las medidas. Las bandas del estado excitado triplete en el espectro de absorción transiente se asignaron basado en la desactivación del oxígeno.

2.14. Estudios computacionales para el TBO⁺ y los derivados TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14

Los cálculos fueron realizados utilizando la Teoría de la Funcional de la densidad (DFT por sus siglas en inglés) con el programa

Gaussian09.[95] Se obtuvieron puntos estacionarios de la superficie de la energía potencial utilizando la funcional híbrida B3LYP.[96, 97] Se realizó una completa optimización de la geometría molecular de estado basal del TBO⁺ y los derivados en acetonitrilo utilizando el conjunto de bases 6-311++G (d,p) para todos los átomos.[98, 99] Para asegurar que las estructuras moleculares han alcanzado un mínimo de energía, se realizaron cálculos analíticos de frecuencias. Una vez se obtuvo la geometría optimizada, se realizaron cálculos de estados electrónicamente excitados utilizando metodología dependiente del tiempo TD-DFT para adquirir el espectro de absorción UV-visible para cada sistema molecular. [100, 101] Con la finalidad de obtener la mejor funcional que pudiese predecir los resultados experimentales obtenidos, se realizaron estudios de calibración de la funcional. Para realizar esto se calcularon los espectros de absorción electrónica con diferentes funcionales, tales como B97D, [102] PBE, [103, 104] BKM, [105] M06, [106] B3LYP, CAM-B3LYP, [107] HSEH1PBE, wB97 y wB97x. [105] La funcional que pudiese predecir con menor desviación de los resultados fue seleccionada. El espectro UV-visible fue obtenido por medio de las transiciones verticales singlete-singlete del tipo Franck-Condon utilizando 30 estados excitados. El espectro fue calculado en fase de solución (solvente acetonitrilo). El modelamiento del solvente fue realizado con el método continuo dieléctrico C-PCM con el parámetro estandarizado para cada solvente.[108]

2.15. Estudios computacionales para el TBO⁺@CB[7]

Los estudios teóricos fueron realizados al nivel de la teoría del funcional de la densidad (DFT por sus siglas en inglés) en el programa ORCA 3.0.3.[96, 109] La funcional B3LYP[96] fue utilizada en combinación con el conjunto de bases DEF2-SVP para todos los átomos.[110] La funcional

B3LYP fue seleccionada debido a sus aplicaciones para estudios relacionados con complejos huésped-anfitrión de los cucurbiturilos.[111-114] Las correcciones de dispersión de fuerza para las energías y gradientes fueron incluidas por medio del método DFT-D3, en combinación con la función de damping de Becke-Johnson.[115] En el método DFT-D3, la corrección por dispersión (E_{disp}) está incluido en las energías SCF-DFT ($E_{SCF-DFT}$), los cuales fueron obtenidas con la funcional de la correlación-intercambio; por lo cual las energías corregidas están expresadas como la suma electrónica y las contribuciones de dispersión: $E_{DFT-D3}=E_{SCF-DFT}+E_{disp}$. Los errores para la superposición del conjunto de bases fueron corregidos por medio de counterpoise geométrico.[116] Todos los sistemas fueron totalmente optimizados sin restricciones de simetría o geometría. El efecto continuo de solvente fue incluido con el método COSMO en el programa ORCA, utilizando agua como solvente.[117] Las energías de unión (E_{bind}) fueron obtenidas como $E_{bind}=E_{A-B}-(E_A+E_B)$, donde, E_A , E_B y E_{A-B} corresponden a la energía total de los fragmentos A, B, y del complejo A-B, respectivamente; entre menor sea el valor E_{int} , más fuerte será la interacción. En este sentido, la energía total de unión también puede descomponerse en la suma de las contribuciones electrónicas y de dispersión: $E_{bind}=E_{bind-SCF-DFT}+E_{vdW}$, donde $E_{bind-SCF-DFT}$ es la contribución electrónica y sería la energía de unión sin las correcciones por dispersión; mientras que E_{vdW} es la contribución por dispersión obtenida como $E_{vdW}=E_{disp(A-B)}-(E_{disp(A)}+E_{disp(B)})$, donde $E_{disp(i)}$ son las correcciones de dispersión DFT-D3 del sistema huésped-anfitrión y los fragmentos aislados. Los análisis de función de onda fueron realizados utilizando el programa Multiwfn;[118] las cargas atómicas fueron obtenidas por el análisis Mulliken en el programa ORCA.

2.16. Estudios computacionales de Acoplamiento Molecular Inducido (Docking) para el TBO⁺-C14@CB[7], TBO⁺-C14:HSA, TBO⁺-C14@CB[7]:HSA, TBO⁺-C6@CB[7]

Para la generación de parámetros para el huésped y el anfitrión los compuestos fueron construidos utilizando Spartan 10 y las cargas parciales de los compuestos fueron corregidas utilizando la metodología ESP. La topología y los parámetros para TBO⁺-C14 y CB[7] fueron obtenidos utilizando ParamChem server, la cual utiliza un campo de fuerza CHARMM27 y la base de datos para compuestos orgánicos. Para obtener la información de las principales interacciones entre el huésped-anfitrión y proteína-huésped-anfitrión por medio de acoplamiento molecular inducido (Docking) del TBO⁺-C14 en el CB[7] y del complejo TBO⁺-C14@CB[7] dentro de la cavidad de la HSA se utilizó el programa AutoDock 4.0.[119] La HSA fue obtenida de la base de datos de proteína PDBid: 4Z69. En general, para el complejo TBO⁺-C14@CB[7] el mapa de la grilla fue calculado utilizando la opción autogrid4 y fueron localizados en el centro del CB[7]. Para TBO⁺-C14@CB[7]:HSA fueron localizados en el centro de la cavidad de unión de la proteína. Los volúmenes utilizados para el mapa de la grilla fueron 80 x 80 x 80 puntos (con un espaciado de los puntos de la grilla de 0.375 Å). La opción de autotors fue utilizada para definir los enlaces rotantes en el ligando. En el docking del algoritmo genético Lamarckian (LGA por sus siglas en inglés), una población inicial de 1500 individuos aleatorios con un tamaño de población de 100 individuos, un número máximo de 2.5×10^6 de evaluaciones energéticas, un número máximo de generaciones de 27,000, fueron utilizadas una velocidad de mutación de 0.02 y una velocidad de cruce de 0.80. Los acoplamientos de los compuestos en los complejos fueron construidos utilizando las posiciones de unión con menor energía de acoplamiento.

2.17. Cultivos celulares y ensayos de viabilidad celular

Las células HeLa fueron cultivadas en medio Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM por sus siglas en inglés), suplementando con 10% suero fetal bovino, antibióticos (7.5×10^{-5} M estreptomycin y penicilina 100 UI/mL) y antimicótico (0.25 µg/mL anfotericina B) a 37°C, 5% CO₂ y 100% de humedad (denominado MC10%). Las células HeLa, las cuales forman monocapas, fueron tripsinadas antes del conteo y antes de ser sembradas. El conteo de las células se realizó por duplicado con la ayuda de un hemocitometro, utilizando un microscopio invertido con contraste de fase Carl Zeiss Axiovert 25. La exclusión de azul de tripan se utilizó como un criterio para la viabilidad celular cuando las células fueron contadas al iniciar los experimentos. El ensayo de viabilidad celular colorimétrico utilizando MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) fue utilizado para cuantificar los resultados de los experimentos,[120] y la absorbancia de las muestras fueron medidas a 570 nm en un lector de placas Biotek synergy HT.

2.18. Determinación de la toxicidad en oscuro

Se colocaron 100 µL de células HeLa de una concentración 1.5×10^5 células/mL en MC10% en una placa de 96 pocillos por cuadruplicado. Se dejan crecer durante la noche. Al día siguiente se agregó en la primera columna 11 µL de TBO⁺ o sus derivados preparados en MC 10% a una concentración de 400 µM. Quedando una concentración final de ~40 µM. Una vez homogenizado el contenido de los pocillos, se tomaron 11 µL de la primera columna y fueron transferidos a la segunda columna de pocillos, de modo de generar una dilución de ~10, llevando la concentración de estos pocillos hasta ~0.0004 µM. Esto se realizó de manera sucesiva hasta la última serie de pocillos, desde los cuales luego de ser homogenizados se tomaron 11 µL de

MC10% con los compuestos y fueron desechados para mantener el volumen de 100 μ L en todos los pocillos. En la misma placa se colocaron por cuadruplicados controles de MC 10% y de células sin exposición a los compuestos. Las placas fueron dejadas en la incubadora (37°C, 5% CO₂, 100% humedad) por 24 horas para realizar el ensayo de viabilidad celular empleando MTT.

2.19. Estudios de incorporación celular

Se sembraron 250 000 células HeLa por pocillo en placas de seis pocillos. Se adicionó 2 mL del medio suplementado de MC 10% con rojo de fenol. Las placas fueron colocadas en la incubadora durante 24 horas hasta que hubiese aproximadamente un 70-80% de confluencia. El medio fue removido de cada pocillo y lavadas tres veces con 1 mL de medio sin suplementar de MC (sin rojo de fenol). Se adicionaron en los 6 pocillos de cada placa de seis pocillos de acuerdo con los experimentos, 2 mL de medio sin suplementar que contenía 0.4 μ M del PS, 2 mL del medio sin suplementar que contenía 0.4 μ M del PS y 50 μ M CB[7], 2 mL del medio sin suplementar que contenía 0.4 μ M del PS más 50 μ M CB[7] y 15 μ M de HSA y 2 mL del medio sin suplementar que contenía 0.4 μ M del PS y 15 μ M de HSA. Las placas fueron colocadas en la incubadora durante 90 minutos (37°C, 5% CO₂, 100% humedad). Las células fueron lavadas tres veces con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) y 1 mL de tripsina fue adicionando a cada pocillo y las células fueron incubadas durante 10 minutos (37°C, 5% CO₂, 100% humedad). Luego las células fueron colectadas y transferidas a un tubo falcón de 15 mL y centrifugadas durante 10 minutos a 1000 rpm. El precipitado fue resuspendido en 2 mL HBSS y centrifugado cada vez por 10 minutos a 1000 rpm. Al precipitado de células se le adicionó 500 μ L de SDS al 2% y se colocaron en la incubadora durante toda la noche. La solución fue centrifugada durante 10 minutos a 1000 rpm y al sobrenadante se le midió su espectro de fluorescencia y con la intensidad al

máximo de emisión de fluorescencia se determinó la cantidad de picomoles / 10^6 células de PS que eran incorporado por cada sistema de transporte en las células HeLa. La concentración del fotosensibilizador fue determinada por medio de una curva de calibrado graficando la intensidad de emisión de fluorescencia versus concentraciones conocidas del fotosensibilizador.

2.20. Estudios de tinción con DAPI

Se sembraron 50 000 células HeLa en 3 cámaras de portaobjetos por separado con dos pocillos por cámara de portaobjetos. Se adicionó 1 mL del medio suplementado de MC 10% con rojo de fenol. Las cámaras fueron colocadas en la incubadora durante 48 horas hasta que hubiese aproximadamente un 70-80% de confluencia. El medio fue removido de cada cámara y lavadas dos veces con 1 mL de medio sin suplementar de MC (sin rojo de fenol). Se adicionaron en los 5 pocillos de acuerdo con los experimentos 1 mL de medio sin suplementar, 1mL del medio sin suplementar que contenía 0.4 μ M del PS o 4 μ M del PS de acuerdo al experimento, 1 mL del medio sin suplementar que contenía PS de la concentración requerida y 50 μ M CB[7], 1 mL del medio sin suplementar que contenía PS de la concentración requerida más 50 μ M CB[7] y 15 μ M de HSA y 1 mL del medio sin suplementar que contenía PS de la concentración requerida y 15 μ M de HSA. Las cámaras fueron colocadas en la incubadora durante 90 minutos. Las células fueron lavadas dos veces con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) y 1 mL de paraformaldehído al 4% previamente calentado fue adicionando y las células fueron incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos en la oscuridad. Luego las células fueron lavadas 2 veces con PBS que contenía 5 mM NH_4Cl (7 minutos cada una). Las células luego fueron lavadas dos veces con PBS frío y las cámaras fueron removidas utilizando la llave proporcionada. Se colocó el cubreobjetos con tres gotas de la solución de montaje de anti-decoloración prolong Gold® con tinción de DAPI.

2.21. Estudios de co-localización celular

2.21.1 Estudios co-localización celular Mitopainter blue y Syto 9

Se sembraron 50 000 células HeLa en 3 cámaras de portaobjetos por separado con dos pocillos por cámara de portaobjetos. Se adicionó 1 mL del medio suplementado de MC 10% con rojo de fenol. Las cámaras fueron colocadas en la incubadora durante 48 horas hasta que hubiese aproximadamente un 70-80% de confluencia. El medio fue removido de cada cámara y lavadas dos veces con 1 mL de medio sin suplementar de MC (sin rojo de fenol). Se adicionaron en los 5 pocillos de acuerdo con los experimentos 1 mL de medio sin suplementar, 1mL del medio sin suplementar que contenía 0.4 μ M del PS, 1 mL del medio sin suplementar que contenía 0.4 μ M PS y 50 μ M CB[7], 1 mL del medio sin suplementar que contenía 0.4 μ M PS más 50 μ M CB[7] y 15 μ M de HSA y 1 mL del medio sin suplementar que contenía 0.4 μ M PS y 15 μ M. Las cámaras fueron colocadas en la incubadora durante 90 minutos. Las células fueron lavadas dos veces con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). Se preparó la solución de trabajo de Mitopainter blue, diluyendo 10 μ L del stock 500X en 5 mL de HHBS (HBSS + 20 mM de la solución amortiguadora HEPES. Se le adicionó 0.5 mL de la solución de trabajo del Mitopainter blue más 1.5 mL del medio sin suplementar (sin rojo de fenol) y las células fueron incubadas durante 2 horas a 37°C (5% CO₂). Las células fueron lavadas dos veces con HBSS. Las células fueron fijadas. Se le adicionó 1 mL de paraformaldehído al 4% previamente calentado y las células fueron incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos en la oscuridad. Luego las células fueron lavadas 2 veces con PBS que contenía 5 mM NH₄Cl (7 minutos cada una). Las células luego fueron lavadas dos veces con PBS frío y se le adicionó 1.0 mL de 1 μ M SYTO 9 a cada cámara y se incubó durante 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las cámaras fueron lavadas cuatro veces con HBSS y las cámaras fueron removidas utilizando la

llave proporcionada. Se colocó el cubreobjetos con la solución de montaje.

2.21.2. Estudios co-localización celular WGA-Alexa 350 y Syto 9

Se sembraron 50 000 células HeLa en 3 cámaras de portaobjetos por separado con dos pocillos por cámara de portaobjetos. Se adicionó 1 mL del medio suplementado de MC 10% con rojo de fenol. Las cámaras fueron colocadas en la incubadora durante 48 horas hasta que hubiese aproximadamente un 70-80% de confluencia. El medio fue removido de cada cámara y lavadas dos veces con 1 mL de medio sin suplementar de MC (sin rojo de fenol). Se adicionaron en los 5 pocillos de acuerdo con los experimentos 1 mL de medio sin suplementar, 1mL del medio sin suplementar que contenía 0.4 μ M del PS, 1 mL del medio sin suplementar que contenía 0.4 μ M PS y 50 μ M CB[7], 1 mL del medio sin suplementar que contenía 0.4 μ M PS más 50 μ M CB[7] y 15 μ M de HSA y 1 mL del medio sin suplementar que contenía 0.4 μ M PS y 15 μ M. Las cámaras fueron colocadas en la incubadora durante 90 minutos. Las células fueron lavadas dos veces con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). Las células fueron fijadas. Se le adicionó 1 mL de paraformaldehído al 4% previamente calentado y las células fueron incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos en la oscuridad. Luego las células fueron lavadas 2 veces con PBS que contenía 5 mM NH_4Cl (7 minutos cada una). Las células luego fueron lavadas dos veces con PBS frío. Luego 0.5 mL de una solución 5.0 $\mu\text{g/mL}$ de Wheat Germ Agglutinin-350 nm Alexa (WGA-350) y 0.5 mL de 1 μ M SYTO 9 fueron adicionados a cada cámara y fueron incubadas durante 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las cámaras fueron lavadas cuatro veces con HBSS y las cámaras fueron removidas utilizando la llave proporcionada. Se colocó el cubreobjetos con la solución de montaje.

2.22. Estudios de microscopía de fluorescencia

Las imágenes de las células fueron realizadas en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200M equipado con una cámara AxioCam MR utilizando el objetivo 63X con aceite de inmersión. La integración se mantuvo menor o igual a 300 ms para minimizar las contribuciones de fondo. Los experimentos de co-localización se realizaron en las condiciones donde se minimizaba el fotoblanqueo de los colorantes. Las muestras de los controles sin los fotosensibilizadores no presentaron emisión cuando fueron excitadas.[121]

2.23. Estudios de irradiación de los cultivos celulares

Los cultivos celulares fueron irradiados en placas de 96 pocillos en un fotoreactor Luzchem LED (modelo LED-L16). La fuente de luz de la cámara es un arreglo de 16 lámparas LED de 630 nm. La temperatura dentro del fotoreactor se mantuvo en 37°C. La intensidad de la luz fue de 2.52 mW / cm² medida con un radiómetro Smart Sensor, Intell Instruments Plus, empleando la función de carrusel del equipo para asegurar una irradiación homogénea. En dos placas (una para ser irradiada y otra como control en oscuro) se cargó por sextuplicado 100 µL de células HeLa con una concentración de 1.5×10^5 células/mL en MC10% en placas de 96 pocillos. Las placas fueron dejadas durante la noche para que se adhirieran. Los fotosensibilizadores solos o con sus distintos sistemas de transporte (PS, PSA:HSA, PS@CB[7] y PS@CB[7]:HSA) fueron preparados a las concentraciones deseadas en Medio Completo sin rojo de fenol, suero bovino fetal, antibióticos ni antimicóticos (MC). Previo a la carga de los sistemas en las placas, el MC10% de cada pocillo fue removido por aspiración, éstos fueron lavados dos veces con PBS para luego agregar 100 µL de los distintos sistemas por sextuplicado. Se

incubaron las placas por 90 minutos a 37°C, 100% humedad y 5% CO₂. Al término de la incubación una placa fue colocada en el sistema de irradiación durante 90 minutos mientras que la otra fue almacenada en una caja oscura por el mismo tiempo. Luego de la irradiación, los sistemas en MC fueron removidos por aspiración y se repuso en cada pocillo MC10% (100 µL). Las placas fueron dejadas durante 24 horas en la incubadora antes de realizar el ensayo de viabilidad con MTT.

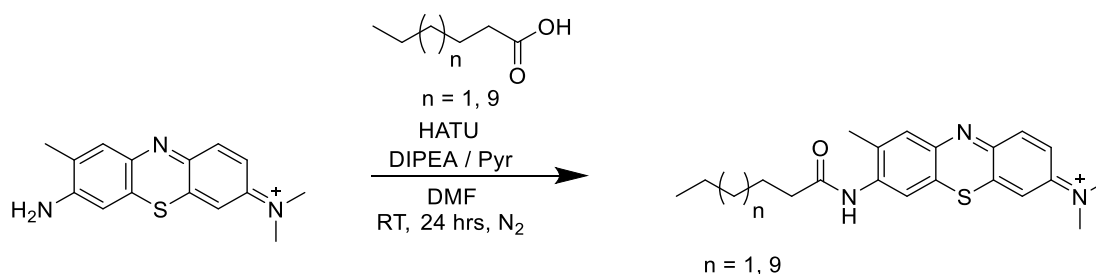
Capítulo III. Resultados y Discusión

3.1. Síntesis de los derivados

Se realizó la condensación de los ácidos grasos de diferentes longitudes de cadena hidrocarbonada, ácido caproico (C6) y el ácido mirístico (C14), con el azul de toluidina (TBO^+) utilizando el agente acoplante HATU para generar la amida correspondiente como producto principal (esquema 2, anexo 1 y 7). Los derivados de TBO^+ y ácidos grasos luego de 24 horas de reacción se obtuvieron con un porcentaje de rendimiento de 43% para el $\text{TBO}^+\text{-C6}$ y 10% para el $\text{TBO}^+\text{-C14}$.

Los productos fueron identificados por medio de espectrometría UHPLC-MS/MS. El $\text{TBO}^+\text{-C6}$ (masa calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{OS}^+$ $[\text{M}]^+ = 368.18$, detectada 368.37) (ver anexo 5). Para el derivado $\text{TBO}^+\text{-C14}$ (masa calculada para $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{OS}^+$ $[\text{M}]^+ = 480.30$, detectada 480.53) (ver anexo 8).

Cuando el compuesto correspondiente fue sometido a una disociación inducida por colisión (CID por sus siglas en inglés) en la masa detectada, se pudo detectar un único fragmento de 270.08 m/z y 270.10 m/z para los compuestos $\text{TBO}^+\text{-C6}$ (anexo 6) y $\text{TBO}^+\text{-C14}$ (anexo 9), respectivamente. Esto es consistente con la fragmentación de moléculas con un enlace amida como ha sido reportado anteriormente,[122] por consiguiente generando la masa de la molécula de TBO^+ precursor.



Esquema 2. Reacción del TBO^+ con el ácido caproico (C6) y con el ácido mirístico (C14) para preparar los respectivos derivados.

La solubilidad del TBO⁺ es muy limitada en solventes orgánicos no polares, mientras que es ligeramente soluble en agua ($\approx 1 \text{ mg mL}^{-1}$). Para evaluar la solubilidad de los derivados de ácidos grasos del TBO⁺, se calcularon los valores del log P y log D (dependiente del pH) para cada compuesto utilizando el software Marvin (ChemAxon) y se reportan en la tabla 1.

Tabla 1. Valores calculados de log P y log D^a para los derivados.

Derivado	log P	log D		
		pH 3	pH 7	pH 11
TBO ⁺	-1.04	-1.44	-1.04	-1.04
TBO ⁺ -C6	1.06	1.05	1.06	1.08
TBO ⁺ -C14	4.61	4.60	4.61	4.63

^a Nótese que los valores de log D calculados son dependientes de la localización de la carga positiva en la molécula. Los valores calculados representan las estructuras en el anexo 1 y 7.

La asignación estructural para los compuestos TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 fue corroborada por técnicas de RMN. Aunque los compuestos eran solubles en solventes orgánicos (acetonitrilo, metanol, cloroformo, acetona), las señales aromáticas eran parcialmente enmascaradas por las señales del acetonitrilo en el RMN protónico del TBO⁺-C6 producto de la solubilidad del compuesto en este solvente. Al no disolver adecuadamente la muestra no es posible resolver bien las señales.[123] En cuanto al derivado TBO⁺-C14, las señales residuales del solvente (cloroformo) en el espectro de RMN protónico se observan a 7.26 ppm, por lo cual enmascaraban las señales aromáticas del derivado. Por consiguiente, se enfocó en las señales de la porción alifática de la molécula para ambos derivados para corroborar las estructuras de los derivados con los datos obtenidos por espectrometría de masas. El compuesto TBO⁺-C6 fue caracterizado por espectros de ¹H, ¹³C, HSQC y HMBC. El compuesto TBO⁺-C6 fue el más soluble en CH₃CN, lo cual permitió identificar las señales de los grupos metilo del núcleo aromático de la molécula (identificado como e) y del grupo dimetilamonio (identificado como f) en la estructura del TBO⁺-C6 y en el espectro de RMN de ¹H en el anexo 1. Estas señales aparecen como singletes

a 1.86 ppm y 2.73 ppm, respectivamente. En el espectro de RMN del ^{13}C estas señales corresponden a 22.35 ppm y 38.73 ppm (anexo 2), y su correlación se puede observar en el espectro de HSQC (anexo 3, tabla S1 del anexo). El espectro de HMBC (anexo 4) para el $\text{TBO}^+\text{-C6}$ demuestra las correlaciones para los protones a 2.25 ppm (identificados como d) con el grupo carbonilo a 175.68 ppm (ver tabla S2 del anexo). Las asignaciones para el $\text{TBO}^+\text{-C14}$ se realizaron de la misma manera.

3.2. Propiedades Fotofísicas y Fotoquímicas de los derivados

3.2.1. Espectros de absorción y emisión de fluorescencia

Debido a que en agua y/o solución amortiguadora las absorbancias y las intensidades de fluorescencia de los derivados eran muy bajas se decidió medir los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia del TBO^+ , $\text{TBO}^+\text{-C6}$ y $\text{TBO}^+\text{-C14}$ en acetonitrilo. Los espectros de absorción y de fluorescencia en acetonitrilo son reportados en la figura 4. Los máximos de absorción obtenidos en acetonitrilo fueron de 626 nm, 547 nm y 548 nm para el TBO^+ , $\text{TBO}^+\text{-C6}$ y $\text{TBO}^+\text{-C14}$, respectivamente. En cuanto al máximo de emisión de fluorescencia en la figura 4 se reportaron 658 nm, 622 nm y 627 nm para el TBO^+ , $\text{TBO}^+\text{-C6}$ y $\text{TBO}^+\text{-C14}$, respectivamente. Como se puede observar con la derivatización los fotosensibilizadores presentan un desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorción y de emisión en solvente orgánico.

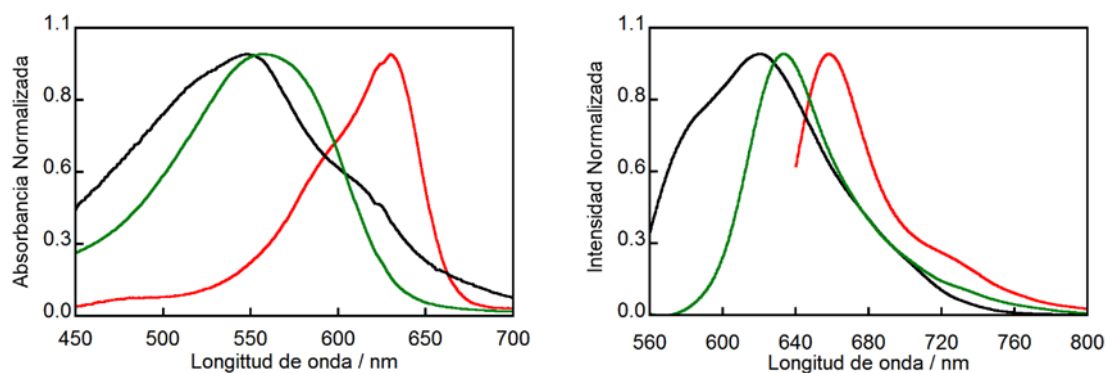


Figura 4. Espectro de absorción normalizado de TBO⁺, TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 en acetonitrilo (rojo, λ_{max} 626 nm), (negro, λ_{max} 547 nm) y (verde, λ_{max} 548 nm) respectivamente (izquierda). Espectro de emisión de fluorescencia normalizado excitando al máximo de absorbancia de cada fotosensibilizador (TBO⁺, rojo, λ_{ex} 626 nm, λ_{max} 658 nm), (TBO⁺-C6, negro, λ_{ex} 547 nm, λ_{max} 622 nm) y (TBO⁺-C14, verde, λ_{ex} 548 nm, λ_{max} 627 nm) respectivamente en las mismas condiciones experimentales (derecha).

3.2.2. Fluorescencia Resuelta en el Tiempo

Los tiempos de vida de fluorescencia para los compuestos fueron medidos en CH₃CN, en presencia y ausencia de oxígeno. Los tiempos de vida de fluorescencia medidos en una atmósfera de nitrógeno son reportados en la tabla 2.

Tabla 2. Tiempos de vida de fluorescencia para el TBO⁺ y los derivados TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 en CH₃CN bajo una atmósfera de nitrógeno.

Fotosensibilizador	$\tau_1(\text{ns})/ A_1$	$\tau_2(\text{ns})/ A_2$	χ^2
TBO ⁺	0.56 (74.6%)	0.78 (25.4%)	0.983
TBO ⁺ -C6	0.35 (98.3%)	1.71 (1.7%)	1.618
TBO ⁺ -C14	1.18 (94.9%)	2.33 (5.1%)	0.969

Para el TBO⁺ se reportan dos tiempos de vida uno de 0.56 ns con una contribución de 74.6% y 0.78 ns con una contribución de 25.4%. Para el TBO⁺-C6 se observaron dos tiempos de vida de fluorescencia de 0.35 ns con una contribución de 98.3% y 1.71 ns con 1.7% de contribución. El TBO⁺-C14 también presentó dos tiempos de vida de 1.18 ns, el cual representa una contribución de 94.9%, y 2.33 ns con una contribución de 5.1%. No se observaron diferencias en los tiempos de vida de fluorescencia en la presencia de oxígeno, indicando que el estado excitado singlete no es desactivado por el oxígeno (ver tabla S3 de los anexos).

Los porcentajes reportados en las contribuciones de los tiempos de vida de fluorescencia, para las tablas de los tiempos de vida de fluorescencia, son calculados en función de los porcentajes de contribución de los estados excitados a la intensidad del factor pre-exponencial del fluoróforo correspondiente.

3.2.3. Tiempo de vida del estado excitado triplete y generación de Oxígeno Singlete

Los tiempos de vida del triplete fueron medidos en atmósfera de Argón para el TBO⁺, TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 en acetonitrilo donde el TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 presentaban mayor absorbancia y fluorescencia. Los resultados son reportados en la tabla 3. Se puede observar que el tiempo de vida del estado excitado triplete para el TBO⁺ en acetonitrilo es de 6.3 μ s mientras que los derivados TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 presentaron un tiempo de vida de 0.4 μ s y 0.7 μ s, respectivamente. La generación de oxígeno singlete se determinó en función de las intensidades de emisión del oxígeno singlete excitando a 532 nm y se puede observar que si el TBO⁺ lo consideramos como referencia (valor de 1), el derivado TBO⁺-C6 tendría un rendimiento cuántico de oxígeno singlete de 0.03, mientras que el derivado TBO⁺-C14 tendría un rendimiento

cuántico de oxígeno singlete de 0.3 en comparación con el TBO⁺.

Tabla 3. Determinación del tiempo de vida del estado excitado triplete en atmósfera de Argón y rendimiento cuántico de oxígeno singlete para el TBO⁺ TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 en acetonitrilo. Equilibrado a la atmósfera.

Fotosensibilizador	$\tau_T / \mu s$	Φ_Δ
TBO ⁺	6.3	1
TBO ⁺ -C6	0.4	0.03
TBO ⁺ -C14	0.7	0.3

3.3. Estudios de Fotodegradación del TBO⁺

Las muestras de TBO⁺ utilizadas en los experimentos de fotodegradación fueron ajustadas en acetonitrilo a la misma absorbancia de 0.5 antes de iniciar los experimentos. El TBO⁺ fue irradiado con un proyector con luz blanca con un espectro de 350 a 850 nm, con un máximo de 550 nm y con una intensidad de 195 W / m² en presencia de oxígeno y como referencia para las aplicaciones biológicas también se evaluó la fotodegradación en presencia de oxígeno utilizando solución amortiguadora de fosfato 0.1 M. El TBO⁺ fue preparado en acetonitrilo e irradiado durante 230 minutos. Los espectros de absorción fueron medidos cada 5 minutos por la primera hora, luego cada 10 minutos por el resto del tiempo. Para evaluar el efecto prolongado de la irradiación una muestra fue irradiada por 5 horas y el espectro de absorción fue medido al tiempo cero y a las 5 horas. Para la identificación de los fotoproductos generados como resultado de la irradiación de las muestras, las muestras de los espectros de absorción a tiempos cero, 1 hora, tres horas y 5 horas fueron analizadas por espectrometría de masas. Estos experimentos también fueron realizados para las muestras que fueron irradiadas en solución amortiguadora en la presencia de oxígeno (la espectrometría de masas fue realizada solo para el fotoproducto generado al final de los experimentos de irradiación). Primeramente, el TBO⁺ fue irradiado durante 3 horas y el espectro de absorción fue medido cada 5 minutos durante la primera hora y cada 10

minutos durante las siguientes dos horas. Como se puede observar en la figura 5 el proceso de fotodegradación ocurre en dos pasos. En el primer paso el primer grupo metilo de la molécula que contiene los dos grupos metilos en el dimetilamonio del TBO^+ se pierde y se presenta un desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorción de 626 nm a 610 nm en acetonitrilo. Posterior a esto el segundo grupo metilo se pierde para culminar con un máximo de 595 nm en acetonitrilo. Los espectros de absorción molecular para el TBO^+ y los dos productos desmetilados fueron calculados a nivel de mecánica cuántica por métodos de química computacional. Estos se presentan en los anexos 12-15.

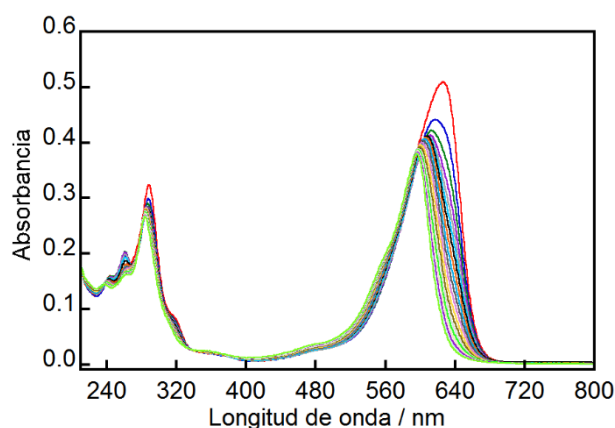


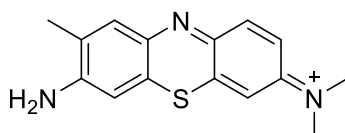
Figura 5. Espectro de absorción del TBO^+ en acetonitrilo irradiado durante tres horas. La línea roja representa el espectro del TBO^+ a tiempo cero con un máximo de absorción de 626 nm en acetonitrilo.

Después la primera hora de irradiación se puede observar fotoblanqueo y un pequeño desplazamiento hipsocrómico hacia 610 nm (figura 5).

Se realizaron experimentos de espectrometría de masas para seguir el curso de la reacción. Para ello se requiere determinar el MS del control oscuro del TBO^+ , la cual es reportada en la figura 7. La masa calculada para el TBO^+ fue de 270.11 m/z y la detectada fue 270.08 m/z como se reporta en las figuras 6 y 7. Muy pocas señales para los productos desmetilados se pueden observar

en la figura 7.

El principal fotoproducto responsable del espectro de absorción a 610 nm (Fig. 5), fue caracterizado como el primer fotoproducto desmetilado, con una masa calculada de 256.09 m/z y se detectó 256.06 m/z como se reporta en las figuras 8 y 9. Es importante resaltar, que a una hora para la aparición de este fotoproducto no se requiere que se haya consumido todo el TBO⁺ (masa de 270.08 m/z). Se puede observar el inicio de la formación del segundo fotoproducto que ha perdido los dos metilos de la parte dimetilamonio de la estructura del TBO⁺. La fotodegradación del TBO⁺ por un total de tres horas genera predominantemente un producto con un máximo de absorción a 595 nm en acetonitrilo, con una masa calculada de 242.07 m/z y detectada 242.08 m/z como es reportado en las figuras 10 y 12, respectivamente. Un producto de 272.05 m/z también es observado, el cual puede corresponder al producto de reducción denominado leuco TBO⁺. También se puede observar en las figuras 9 y 12 una masa de 286.13 m/z y 286.05 m/z respectivamente, la cual corresponde a un producto oxigenado del TBO⁺ cuya estructura química ha sido previamente reportada y se presenta en la figura 11.[124] Este producto se encontró presente en pequeñas cantidades.



Exact Mass: 270.11

m/z: 270.11 (100.0%), 271.11 (16.2%), 272.10 (4.5%), 272.11 (1.2%), 271.10 (1.1%)

Figura 6. Estructura química y masa calculada para el TBO⁺.

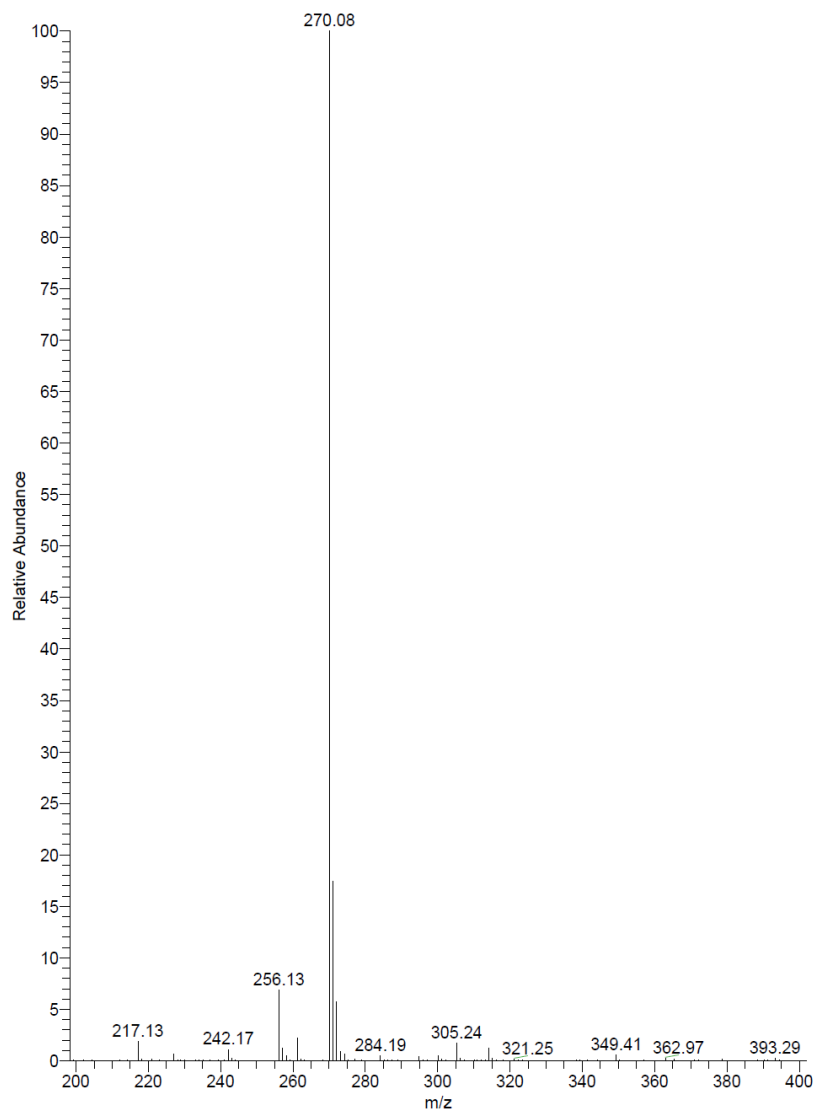
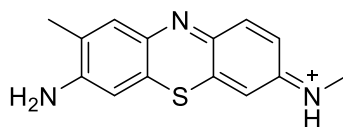


Figura 7. Espectrometría de masas del TBO⁺ en acetonitrilo control en oscuro.



Exact Mass: 256.09

m/z: 256.09 (100.0%), 257.09 (15.1%), 258.09 (4.5%), 257.09 (1.1%), 258.10 (1.1%)

Figura 8. Estructura química y masa calculada para el fotoproducto del TBO⁺ a una hora de irradiación.

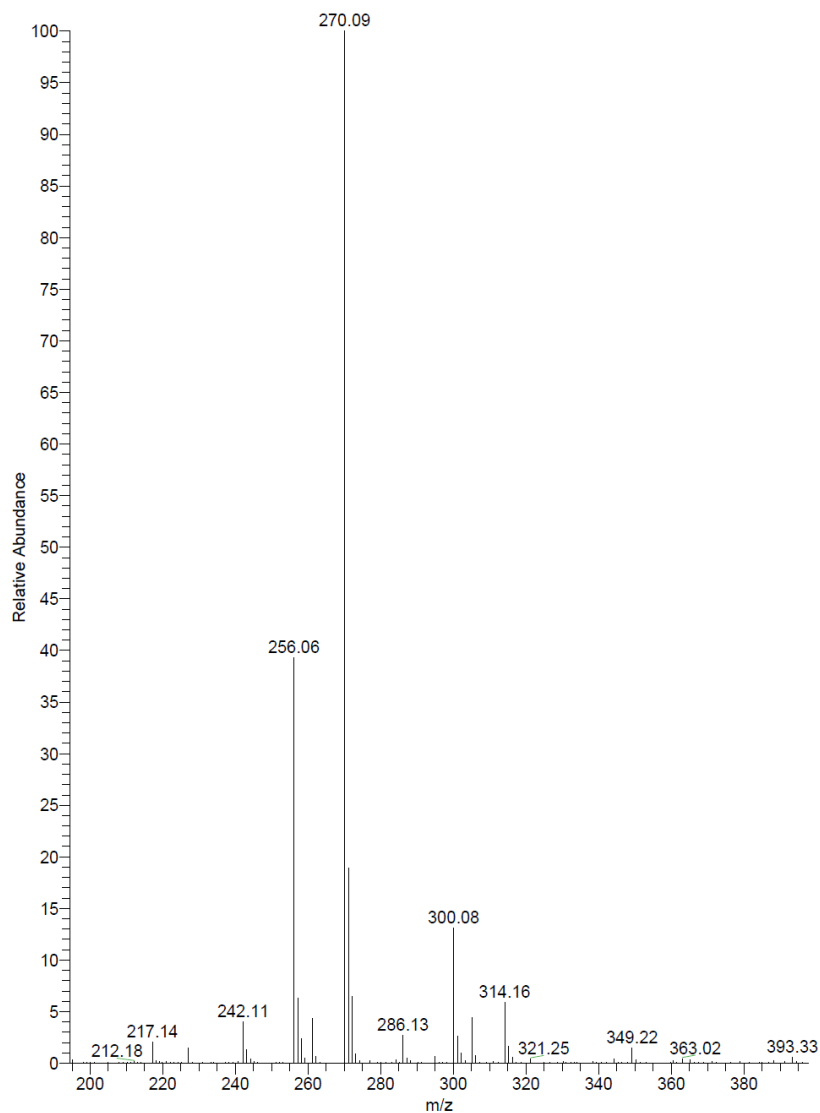
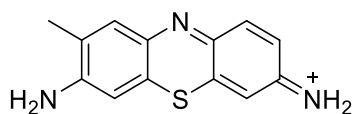
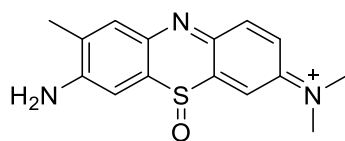


Figura 9. Espectrometría de masas del TBO⁺ en acetonitrilo después de una hora de irradiación.



Exact Mass: 242.07
 m/z: 242.07 (100.0%), 243.08 (14.1%), 244.07 (4.5%), 243.07 (1.1%)

Figura 10. Estructura química y masa calculada para el fotoproducto del TBO⁺ a tres horas de irradiación.



Exact Mass: 286.10

m/z: 286.10 (100.0%), 287.10 (16.2%), 288.10 (4.5%), 288.11 (1.2%), 287.10 (1.1%)

Figura 11. Estructura química y masa calculada para el fotoproducto oxigenado del TBO⁺ generado durante la irradiación.

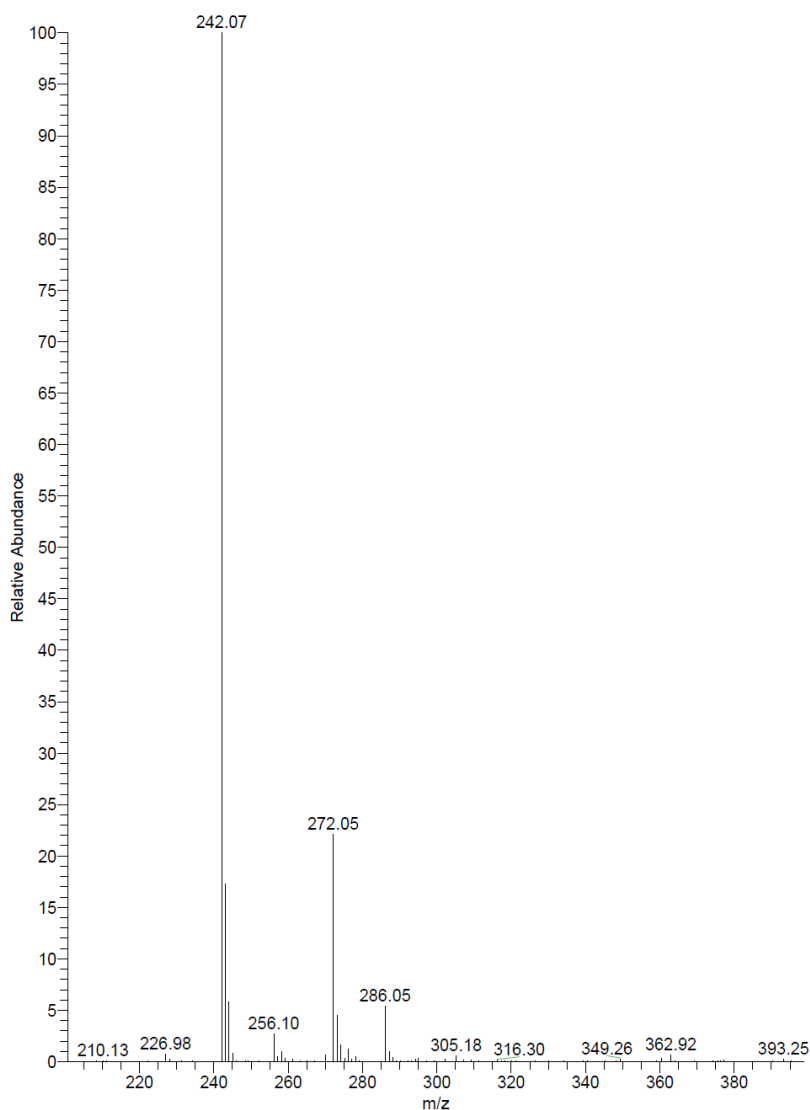


Figura 12. Espectrometría de masas del TBO⁺ en acetonitrilo después de tres horas de irradiación.

Cuando el TBO^+ fue sometido a una irradiación extendida por un periodo de 5 horas, se obtuvo un cambio espectral con un máximo a 595 nm (línea roja) similar al que se observa en la figura 13 y con una masa detectada de 242.08 m/z (ver figura 14), tal como fue reportado en la figura 10 para el experimento de tres horas de irradiación. Por consiguiente, a 5 horas de irradiación el fotoproducto con esta masa permanece como el principal fotoproducto, al igual que en el experimento de irradiación durante 3 horas. El fotoproducto oxigenado con una masa de 286.08 m/z también pudo ser observado cómo se reporta en la figura 14, pero en mayor cantidad que lo reportado en las figuras 9 y 12, pero en comparación con el principal fotoproducto de este experimento la participación de este producto es poco significativa.

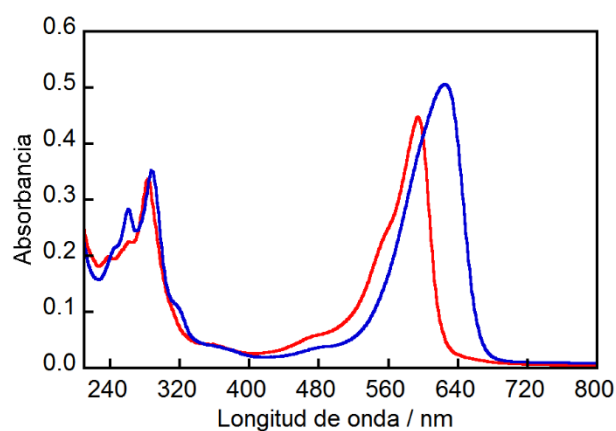


Figura 13. Espectro de absorción del TBO^+ en acetonitrilo irradiado durante cinco horas. La línea azul representa el TBO^+ a tiempo cero y la línea roja el TBO^+ después de cinco horas de irradiación.

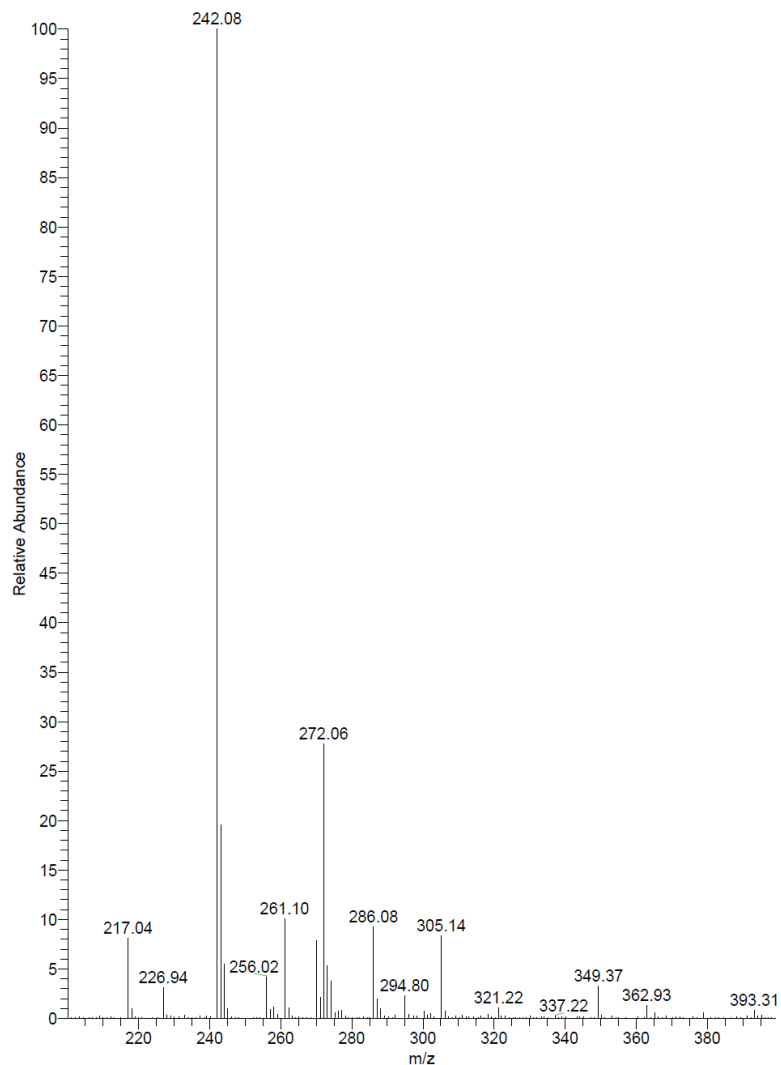


Figura 14. Espectrometría de masas del TBO⁺ en acetonitrilo después de cinco horas de irradiación.

El perfil cinético del fotoproceso se obtuvo graficando la absorbancia a 595 nm, 610 nm y 650 nm (ver figura 15). Estas longitudes de onda corresponden al máximo de absorción de los fotoproductos para la pérdida de los dos grupos metilo, un grupo metilo y la absorbancia de la molécula de TBO⁺ como se reporta en la figura 5 (a 650 nm ninguno de los fotoproductos absorbe). Se puede observar que durante la primera hora el TBO⁺ comienza a desmetilarse, lo cual es acompañado por una disminución en la absorbancia a 626 nm. A medida que el TBO⁺ pierde el primer grupo metilo de la porción dimetilamonio

de la molécula y el primer fotoproducto es formado éste se mantiene constante durante este periodo de tiempo, lo cual es apreciado a 610 nm. Este comportamiento puede indicar que el fotoproducto es desmetilado constantemente para formar el fotoproducto final, el cual se puede observar que incrementa con el tiempo a 595 nm. Después de la primera hora, el fotoproducto sin grupos metilos en la porción dimetilamonio de la molécula se mantiene constante.

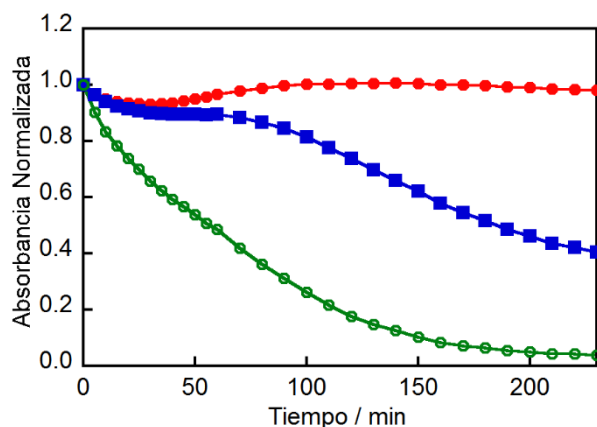


Figura 15. Cinética de la fotodegradación del TBO⁺ irradiado en acetonitrilo durante 230 minutos. Círculos rojos representa la cinética de fotodegradación a 595 nm, cuadrados azules a 610 nm y círculos verdes sin rellenar a 650 nm.

3.3.1. Fotodegradación en solución amortiguadora de fosfato de pH 7.

Debido a que el TBO⁺ tiene varias aplicaciones biológicas se evaluó el efecto de la irradiación de la muestra en solución amortiguadora. La absorbancia de la muestra fue ajustada a 0.5 e irradiada durante tres horas como se observa en la figura, 16. El máximo de absorción sufrió un desplazamiento hipsocrómico de 631 nm a 609 nm.

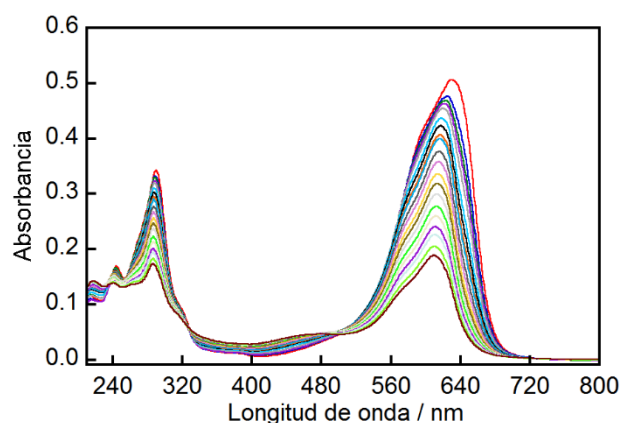


Figura 16. Espectro de absorción del TBO⁺ en solución amortiguadora 0.1 M pH = 7 e irradiadas durante tres horas.

La muestra irradiada en solución amortiguadora presenta un comportamiento fotoquímico diferente a la muestra irradiada en acetonitrilo. Los dos fotoproductos sin un grupo metilo y sin los dos grupos metilos se encontraban presentes luego de las 3 horas de irradiación (ver figura 17); la fotodegradación fue significativamente más lenta. Esto es importante para las aplicaciones biológicas de PDT, donde la forma leuco del fotosensibilizador necesita ser evitada.[125] El perfil cinético de la fotodegradación fue graficada para las longitudes de onda de máxima absorbancia de 609 nm del fotoproducto y a 650 nm donde solo absorbe el TBO⁺ (figura 18). El comportamiento de la fotodegradación fue diferente a lo observado en acetonitrilo, ya que se observó una disminución continua en la absorbancia en comparación con los experimentos.

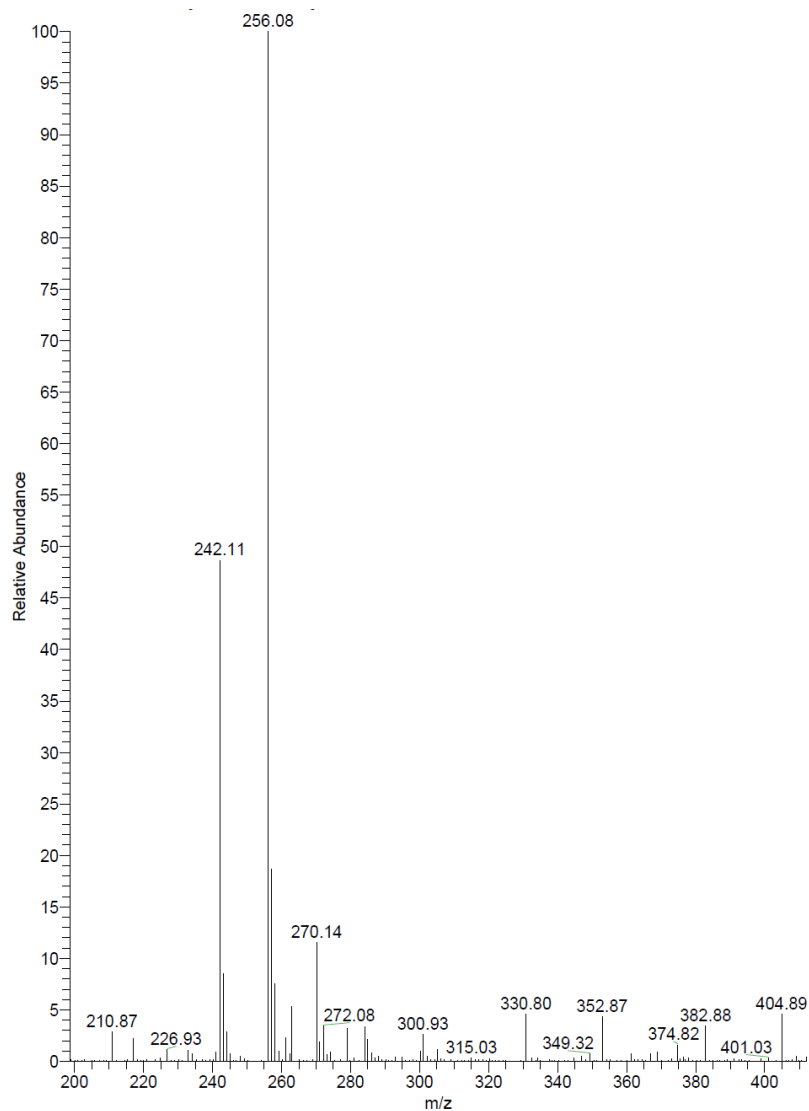


Figura 17. Espectrometría de masas del TBO⁺ en solución amortiguadora de fosfato 0.1 M pH = 7 e irradiadas durante tres horas.

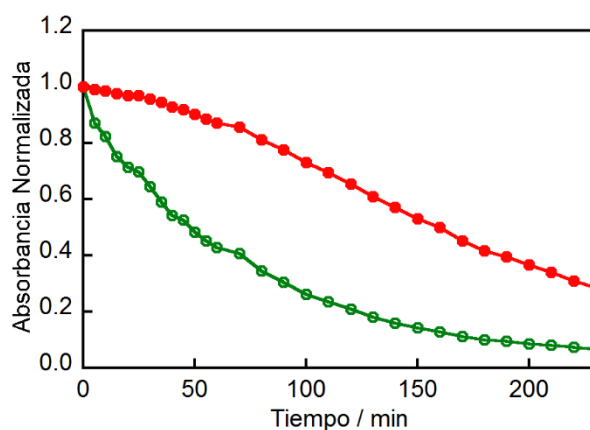


Figura 18. Cinética de la fotodegradación del TBO⁺ irradiado durante 230 minutos en solución amortiguadora de fosfato 0.1 M pH = 7. Círculos rojos representan la cinética de fotodegradación a 609 nm y círculos verdes sin rellenar verdes a 650 nm.

3.4. Caracterización de los Complejos de Inclusión del TBO⁺ y sus derivados

3.4.1. Propiedades Fotofísicas de los derivados y sus complejos

La caracterización fotofísica se llevó a cabo por medio de espectroscopia de absorción molecular y de fluorescencia en estado estacionario. La figura 19 presenta el espectro de absorción y de emisión del TBO⁺ solo y en presencia de CB[7]. Los máximos de absorción y emisión fueron observados a 636/670 nm y 631/655 nm para TBO⁺ y TBO⁺@CB[7], respectivamente. Cabe destacar que el CB[7] incrementa la intensidad de la fluorescencia.[126]

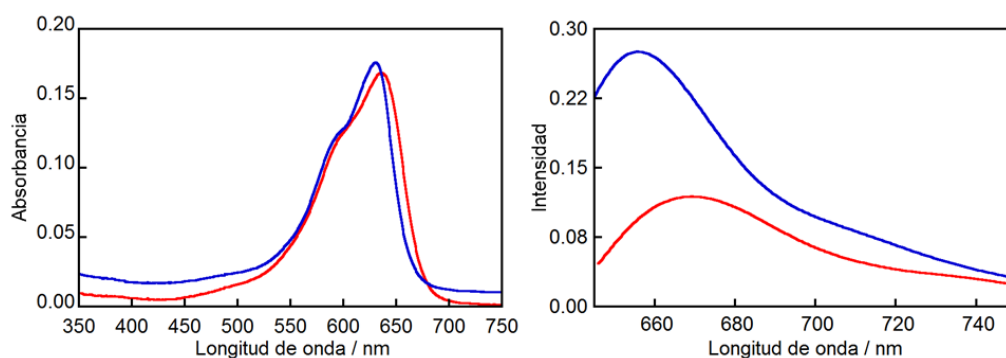


Figura 19. Espectro de Absorción de TBO^+ ($4 \mu\text{M}$) en solución amortiguadora ($\text{pH} = 7$) 10 mM de fosfato en ausencia (rojo, λ_{max} 636 nm), en presencia de $\text{CB}[7]$ $50 \mu\text{M}$ (azul, λ_{max} 631 nm)(izquierda). Espectro de emisión de fluorescencia excitado a 620 nm en ausencia (rojo, λ_{max} 670 nm) y presencia $\text{CB}[7]$ (azul, λ_{max} 655 nm) en las mismas condiciones experimentales (derecha).

Una vez debidamente caracterizados el TBO^+ en sus propiedades fotofísicas se estudió los derivados preparados para ver los cambios que se generan producto de la derivatización. Se determinaron los espectros de absorción y emisión de ambos derivados solos y su complejo en presencia de $\text{CB}[7]$. Para las aplicaciones celulares que se buscan es importante aumentar la fluorescencia, ya que mejora la detección *in vivo*. En este sentido, el $\text{CB}[7]$ incrementa la intensidad de la fluorescencia como ha sido reportado anteriormente para compuestos similares.[76] Los complejos de inclusión para el TBO^+ y sus dos derivados, la figura 19, presentan un desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorción y un incremento en la intensidad de fluorescencia (figura 19).[61, 62, 76, 127] Mientras que en las figuras 20 y 21 se observa un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción y un incremento en la intensidad de fluorescencia como se ha reportado anteriormente.[128] Los máximos de absorción y emisión para el derivado $\text{TBO}^+\text{-C6}$ en solución amortiguadora, fueron $604/645 \text{ nm}$, pero producto de la baja absorción y emisión en solución amortiguadora, no se pueden observar claramente los cambios en los máximos de absorción o emisión con la formación del complejo de inclusión $\text{TBO}^+\text{-C6@CB}[7]$. Lo que sí es apreciable

(figura 20) es el incremento en la intensidad de fluorescencia con la formación del complejo de inclusión. Mientras que para el derivado TBO⁺-C14 y su complejo de inclusión TBO⁺-C14@CB[7] los máximos de absorción y emisión fueron observados a 609/651 nm y 613/652 nm.

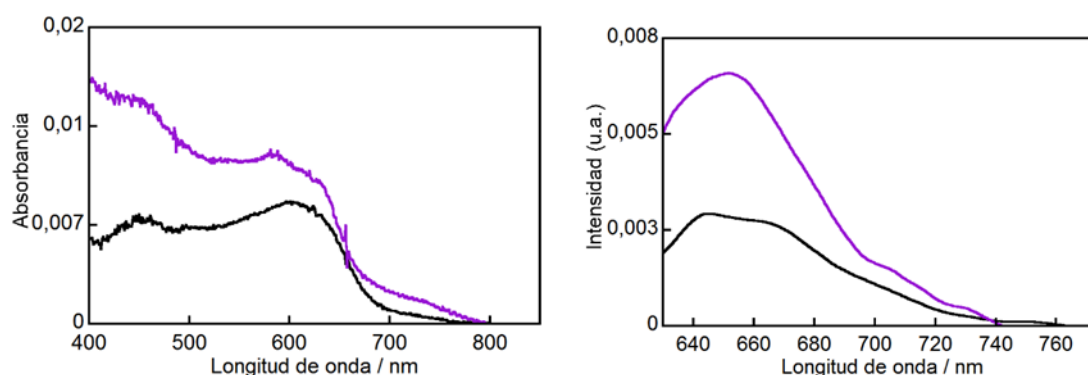


Figura 20. Espectro de absorción de TBO⁺-C6 en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato en ausencia (negro, λ_{max} 604 nm) y en presencia de CB[7] 50 μM (morado) (izquierda). Espectro de emisión de fluorescencia excitado a 610 nm en ausencia (negro, λ_{max} 645 nm) y presencia CB[7] (morado) en las mismas condiciones experimentales (derecha).

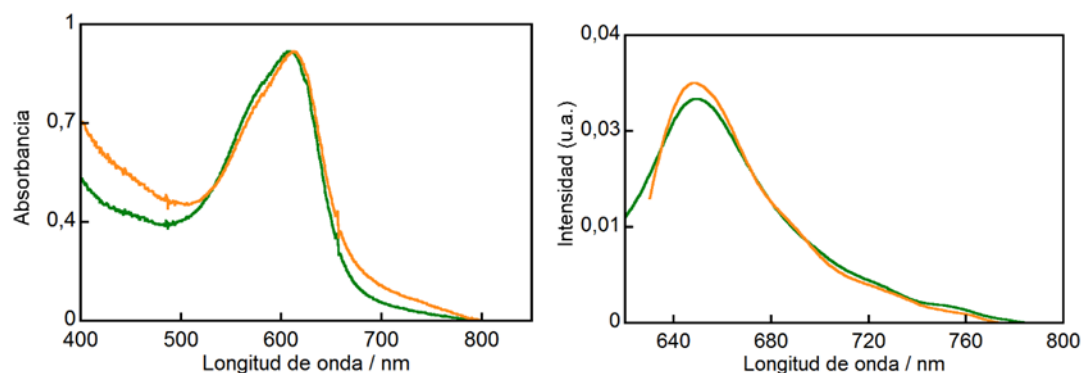


Figura 21. Espectro de absorción Normalizado de TBO⁺-C14 en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato en ausencia (verde, λ_{max} 609 nm) y en presencia de CB[7] 50 μM (anaranjado, λ_{max} 613 nm) (izquierda). Espectro de emisión de fluorescencia excitado a 610 nm en ausencia (verde, λ_{max} 651 nm) y presencia CB[7] excitado a 620 nm (anaranjado, λ_{max} 652 nm) en las mismas condiciones experimentales (derecha).

3.4.2. Estudios de Fluorescencia Resuelta en el Tiempo

Los tiempos de vida de fluorescencia del TBO^+ y de los derivados $\text{TBO}^+\text{-C6}$ y $\text{TBO}^+\text{-C14}$ fueron determinados para las moléculas solas y en complejos con el CB[7] en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato. Los resultados son presentados en la tabla 4.

Se puede observar que el TBO^+ presenta un solo tiempo de vida de fluorescencia de 0.26 ns, mientras que los derivados $\text{TBO}^+\text{-C6}$ y $\text{TBO}^+\text{-C14}$ presentan dos tiempos de vida de fluorescencia. El $\text{TBO}^+\text{-C6}$ tiene los tiempos de vida de fluorescencia de 0.23 ns con una contribución de 62% y 0.37 ns con una contribución de 38%. El $\text{TBO}^+\text{-C14}$ tiene los tiempos de vida de fluorescencia de 0.27 ns con una contribución de 97% y 0.56 ns con una contribución de 3%. El primer tiempo de vida de fluorescencia observado para ambos derivados pueden deberse a una transferencia de carga interna de la molécula, lo cual se puede explicar por el efecto solvatocrómico observado en los máximos de emisión en las figuras 4, 20 y 21. En cuanto al segundo tiempo de vida de fluorescencia observado para ambos derivados este puede asociarse posiblemente a un estado de agregación, ya que se observó que el espectro de absorción del derivado $\text{TBO}^+\text{-C14}$ no cambia significativamente con el incremento de la concentración. Mientras que el espectro de absorción del derivado $\text{TBO}^+\text{-C6}$ se modificó con un incremento en la concentración. Este fenómeno puede verse reflejado en el incremento de la contribución del segundo componente del tiempo de vida de fluorescencia del derivado $\text{TBO}^+\text{-C6}$, con respecto al derivado $\text{TBO}^+\text{-C14}$ al formarse los complejos de inclusión. Cuando se forma el complejo de inclusión con CB[7] se observa que hay un incremento en el tiempo de vida de fluorescencia que es característico de la formación de complejos de inclusión producto de la baja polarizabilidad del interior del macrociclo y la restricción del movimiento de la molécula, esto ayuda a incrementar el rendimiento cuántico de la fluorescencia.[61] Los complejos de inclusión presentaron dos tiempos de vida de fluorescencia, un

tiempo de vida corto de 0.53 ns con un porcentaje de 82% para el TBO⁺, 0.24 ns para el TBO⁺-C6 con una contribución de 28% y 0.27 ns con un porcentaje de 90% para el TBO⁺-C14, y un componente con un tiempo de vida más largo de 0.83 ns equivalente al 18% el TBO⁺. El de 0.61 ns equivalente al 72% para el TBO⁺-C6 y 0.63 ns para el TBO⁺-C14 con una contribución del 10%. La presencia de dos tiempos es consistente con los resultados de los estudios teóricos de dos conformaciones posibles para las moléculas TBO⁺, TBO⁺-C6 y el TBO⁺-C14 cuando se forman los complejos de inclusión.

Tabla 4. Tiempos de vida de fluorescencia para el TBO⁺, TBO⁺-C6, TBO⁺-C14 solos y en complejos con CB[7] en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato.

Fotosensibilizador	$\tau_1(\text{ns})/A_1$	$\tau_2(\text{ns})/A_2$	χ^2
TBO ⁺	0.26	---	1.211
TBO ⁺ @CB[7]	0.53 (82%)	0.83 (18%)	1.055
TBO ⁺ -C6	0.23 (62%)	0.37 (38%)	0.929
TBO ⁺ -C6@CB[7]	0.24 (28%)	0.61 (72%)	0.944
TBO ⁺ -C14	0.27 (97%)	0.56 (3%)	1.152
TBO ⁺ -C14@CB[7]	0.27 (90%)	0.63 (10%)	1.182

3.4.3. Estudios de las Propiedades Fotoquímicas

La capacidad de generación de oxígeno singlete fue evaluada de manera indirecta por medio de la disminución de la emisión del ABMA[93] para el TBO⁺ y el TBO⁺-C14 y reportados en la figura 22. Debido a la baja solubilidad en solución acuosa no se pudieron realizar estos estudios del TBO⁺-C6. Esto también fue evaluado de manera directa para el TBO⁺ y su complejo de inclusión con el CB[7] y reportados en la tabla 5.

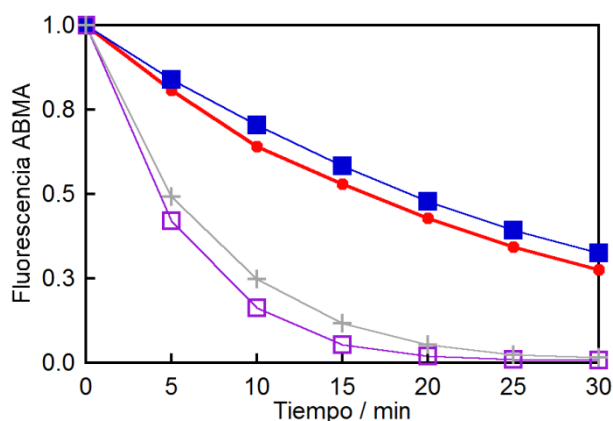


Figura 22. Fluorescencia normalizada para el ABMA (1.6 μM) a 412 nm cuando se irradia con TBO^+ (4 μM) en la ausencia de $\text{CB}[\text{n}]$ s (círculos rojos), en presencia de 50 μM $\text{CB}[\text{7}]$ (cuadrados morados). Cuando se irradia con $\text{TBO}^+\text{-C14}$ (4 μM) en la ausencia de $\text{CB}[\text{n}]$ s (cuadrados azules) y en presencia de 50 μM $\text{CB}[\text{7}]$ (cruces grises) en solución amortiguadora 10 mM de fosfato pH 7.0. Las muestras fueron irradiadas en el máximo de absorción con igual intensidad.

Como se puede observar en la figura 22 el TBO^+ genera más oxígeno singlete que el derivado $\text{TBO}^+\text{-C14}$. Los complejos de inclusión de ambos generan mucho más oxígeno singlete que las correspondientes moléculas solas.

Recientemente se reportó la medición directa de la generación de oxígeno singlete, a partir de este se determinó el tiempo de vida del triplete del TBO^+ y de su complejo de inclusión con $\text{CB}[\text{7}]$. Estos tiempos de vida del estado excitado triplete también fueron determinados por láser flash fotólisis.[126] Se ha reportado que el tiempo de vida del triplete es incrementado al formar los complejos de inclusión en $\text{CB}[\text{7}]$, mientras que el rendimiento cuántico de oxígeno singlete se ve afectado dependiendo del tipo de complejo y la accesibilidad del oxígeno molecular al fotosensibilizador.[129] En la tabla 5 se puede observar que el tiempo de vida del triplete para el TBO^+ incrementa de 2.2 μs a 8.1 μs en $\text{CB}[\text{7}]$ en aire y de 7.8 μs a 13.8 μs respectivamente en argón. Cuando el experimento fue realizado en una solución amortiguadora en presencia de oxígeno estos tiempos de vida disminuyen lo cual permitió asignar los tiempos de vida del estado excitado triplete para el TBO^+ y el

TBO⁺@CB[7]. En cuanto al rendimiento cuántico de oxígeno singlete para el TBO⁺ en ausencia del macrociclo es 0.18, encapsulado en CB[7] incrementa a 0.27 lo que es equivalente a 1.5 veces mayor rendimiento que el TBO⁺ solo.[126]

Tabla 5. Determinación del tiempo de vida del estado excitado triplete y rendimiento cuántico de oxígeno singlete para el TBO⁺ y TBO⁺@CB[7].

Fotosensibilizador	Sin CB[n]		CB[7]	
	$\tau_T / \mu\text{s}$	Φ_Δ	$\tau_T / \mu\text{s}$	Φ_Δ
TBO ⁺ (argón)	7.8		13.8	
TBO ⁺ (aire)	2.2	0.18	8.1	0.27
TBO ⁺ (oxígeno)	0.47		3.9	

Otra propiedad importante que presentan los complejos de inclusión es que protege al fotosensibilizador de la fotodescomposición.[67] Cuando se realizó la determinación indirecta de la generación de oxígeno singlete se pudo observar que no hay presencia de fotodescomposición tanto en el complejo de inclusión del TBO⁺ como del TBO⁺-C14 con el CB[7], y por esta razón estos complejos pueden ser reutilizados para generar más oxígeno singlete lo cual es interesante para aplicaciones biomédicas.

3.4.4. Resumen de las Propiedades Fotofísicas y Fotoquímicas del TBO⁺, TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14

En la tabla 6 se presenta un resumen de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas determinadas para el TBO⁺, los derivados TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 solos y con sus respectivos complejos de inclusión. Estas propiedades son de importancia para el diseño experimental de la aplicación biológica en el marco de esta tesis doctoral.

Tabla 6. Resumen de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del TBO⁺, TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14.

Fotosensibilizador	Absorción ($\lambda_{\max}$ / nm)	Emisión ($\lambda_{\max}$ / nm)	$\langle \tau_f \rangle$ (ns)	τ_T (μ s)	Φ_{Δ}
CH ₃ CN					
TBO ⁺	626	658	0.61	6.3	1 ^a
TBO ⁺ -C6	547	622	0.37	0.4	0.03 ^a
TBO ⁺ -C14	548	627	1.24	0.7	0.3 ^a
Solución amortiguadora					
TBO ⁺	636	670	0.26	2.2	0.18 ^b
TBO ⁺ @CB[7]	631	655	0.58	8.1	0.27 ^b
TBO ⁺ -C6	604	645	0.28	---	---
TBO ⁺ -C6@CB[7]	~605	~652	0.51	---	---
TBO ⁺ -C14	609	651	0.28	---	---
TBO ⁺ -C14@CB[7]	613	652	0.31	---	---

Nota: (a. medición del rendimiento cuántico de oxígeno singlete usando como valor de referencia el TBO⁺; b. medición del rendimiento cuántico de oxígeno singlete usando como referencia Rosa de Bengala. El tiempo de vida de fluorescencia promedio, $\langle \tau_f \rangle$, se calcula como la $\Sigma(\tau_i \times A_i)/100$

De acuerdo con lo reportado en la tabla 6, se puede observar que los máximos de absorción y de emisión para el TBO⁺ y los derivados TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 presentan un efecto solvatocrómico en donde los máximos de absorción y emisión sufren un desplazamiento batocrómico en solventes polares. Estos fotosensibilizadores se comportan de manera diferente al formar los complejos de inclusión, ya que el complejo de inclusión TBO⁺@CB[7] presenta un desplazamiento hipsocrómico, mientras que el complejo de inclusión del TBO⁺-C14 presenta un desplazamiento batocrómico. Esto da un indicio del tipo de estructura que puede tener este complejo de inclusión. Se ha reportado que los complejos de inclusión donde la molécula se encuentra totalmente insertada dentro de la cavidad hidrofóbica del macrociclo se asocian a un desplazamiento hipsocrómico en el máximo de absorción y de emisión. Mientras cuando solo una parte de la molécula se encuentra insertada dentro de la cavidad del macrociclo el desplazamiento es batocrómico. De igual manera, estas diferencias estructurales se ven reflejadas en el máximo de

emisión de fluorescencia y en el incremento de la intensidad de emisión. Aunque las diferencias en los máximos de absorción y de emisión para el derivado $\text{TBO}^+\text{-C6}$ no pudieron ser observadas producto de su baja solubilidad en solución acuosa, el incremento en la intensidad de fluorescencia para la formación del complejo de inclusión fue apreciado claramente.

También se puede observar en la tabla 6, el tiempo de vida de fluorescencia promedio medido en acetonitrilo y en solución amortiguadora de fosfato 10 mM ($\text{pH} = 7$). En acetonitrilo el $\text{TBO}^+\text{-C14}$ presentó un tiempo de vida promedio mayor que el tiempo de vida de fluorescencia promedio del TBO^+ . Al medir estos tiempos de vida de fluorescencia promedio para el TBO^+ , $\text{TBO}^+\text{-C6}$ y el $\text{TBO}^+\text{-C14}$ en solución amortiguadora se puede observar que son muy similares. Lo cual indica que la derivatización no afectó significativamente las propiedades de fluorescencia en solución amortiguadora de acuerdo con el tiempo de vida de fluorescencia promedio observada. Cuando estos fotosensibilizadores forman los respectivos complejos de inclusión con el $\text{CB}[7]$, es apreciable que el tiempo de vida de fluorescencia promedio para los complejos de inclusión $\text{TBO}^+\text{@CB}[7]$ y $\text{TBO}^+\text{-C6@CB}[7]$ aumentan considerablemente. Este comportamiento denota una inclusión de la molécula dentro de la cavidad hidrofóbica del macrociclo, sin embargo, el tiempo de vida de fluorescencia promedio para el $\text{TBO}^+\text{-C14@CB}[7]$ no incrementa con respecto a la molécula sin encapsular.

Al medir los tiempos de vida del estado excitado triplete en acetonitrilo se puede observar que la derivatización para incrementar la hidrofobicidad de la molécula TBO^+ resulta en una disminución del tiempo de vida del estado excitado triplete de $6.3 \mu\text{s}$ a $0.4 \mu\text{s}$ para el $\text{TBO}^+\text{-C6}$ y $0.7 \mu\text{s}$ en el $\text{TBO}^+\text{-C14}$ (tabla 6). Cuando se realizó este experimento en solución amortiguadora para el TBO^+ y su complejo de inclusión, observó una disminución del tiempo de vida del estado excitado triplete del TBO^+ hasta $2.2 \mu\text{s}$, pero acompañada de un incremento de hasta $8.1 \mu\text{s}$ en el $\text{TBO}^+\text{@CB}[7]$ producto de la encapsulación. Esto se atribuye a la disminución en el decaimiento no radiativo

como ha sido reportado anteriormente.[126, 129]

Se determinaron los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete en acetonitrilo para el TBO⁺ y los derivados TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14, utilizando como valor de referencia el TBO⁺; a éste se le asignó el valor de 1. Al comparar el rendimiento cuántico de oxígeno singlete podemos observar en la tabla 6 que el TBO⁺-C6 presenta un valor de 0.03 y el TBO⁺-C14 0.3, con respecto al TBO⁺. Estos valores de rendimiento cuántico representan una disminución del 97% del rendimiento cuántico de oxígeno singlete para el TBO⁺-C6 y 70% para el TBO⁺-C14 con respecto al TBO⁺. La derivatización del TBO⁺ para incrementar su hidrofobicidad disminuyó la generación de oxígeno singlete en acetonitrilo. También se determinó el rendimiento cuántico de oxígeno singlete para el TBO⁺ y para su complejo de inclusión TBO⁺@CB[7] en solución amortiguadora. Como se reporta en la tabla 6, la encapsulación incrementó el rendimiento cuántico de oxígeno singlete del TBO⁺ de 0.18 a 0.27, lo cual representa un incremento de 1.5 veces. Al determinar de manera relativa la generación de oxígeno singlete por medio de la sonda AMBA se observó que el TBO⁺-C14 genera aproximadamente la misma cantidad de oxígeno singlete que el TBO⁺, pero lo que fue claramente evidente que el complejo de inclusión de ambos fotosensibilizadores generaba más oxígeno singlete que el correspondiente fotosensibilizador solo.

3.4.5. Determinación de la constante de formación de los complejos de inclusión con CB[7]

Utilizando la información obtenida de los máximos de absorción y de emisión se determinó la longitud de onda donde no se presentaba un cambio notable en la absorbancia para poder excitar el complejo de inclusión para determinar las constantes de asociación del TBO⁺ y de ambos derivados de manera individual con el CB[7]. Posterior a esto se construyó una curva de unión (ver

figuras 23-25) y por medio de análisis numérico previamente descritos en la literatura[76], se determinó que el TBO⁺ y sus dos derivados forman complejos de inclusión con el CB[7] con una estequiometria de 1:1, al igual que otros fotosensibilizadores similares.[54, 61, 76, 127] Para los complejos de inclusión 1:1 que se forman entre el TBO⁺ y ambos derivados con el CB[7], se han denominado como TBO⁺@CB[7], TBO⁺-C6@CB[7] y TBO⁺-C14@CB[7], dependiendo del fotosensibilizador.

En la literatura solo se ha reportado la formación del complejo de inclusión del TBO⁺ con ciclodextrinas, en donde se observó que forma un complejo de inclusión con estequiometria de 1:1 con β -ciclodextrina. De igual manera se ha reportado un incremento en la fluorescencia de dos veces con la formación del complejo, pero con un desplazamiento batocrómico en el espectro de absorción con respecto al TBO⁺ libre.[130] Se pudo evidenciar, de acuerdo a lo presentado en la tabla 7, que la derivatización afecta ligeramente las constantes de asociación con el CB[7]. Las constantes de asociación del TBO⁺ con CB[7] es de $(5.5 \pm 0.6) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. [126] La constante de asociación del TBO⁺ con el CB[7] determinada por medio de la técnica de fluorescencia es mayor que la de los derivados, $(4.8 \pm 1.2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para TBO⁺-C6 y $(6.7 \pm 2.0) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para TBO⁺-C14, pero estas últimas son mucho mayores que la reportada para el complejo de inclusión con β -ciclodextrina $[(442 \pm 10) \text{ M}^{-1}]$. [130] Esto denota que los complejos formados tanto para el TBO⁺ como para sus derivados con los CB[n]s tienen constantes de asociación mucho mayores que los complejos con β -ciclodextrina lo que implica que en estas condiciones experimentales estos complejos son muchos más estables para aplicaciones en biomedicina. Estas constantes de asociación del TBO⁺ y los derivados hidrofóbicos serán discutidas en mayor detalle en la sección 3.10.

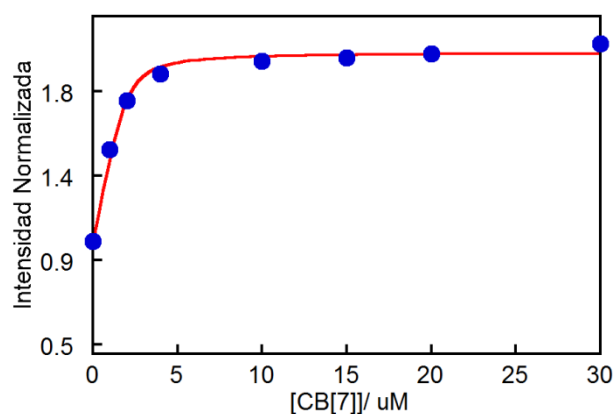


Figura 23. Isotherma de unión del TBO⁺ 2 μM en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a CB[7] (0-30 μM), excitando a 620 nm y recolectando los datos a 655 nm.

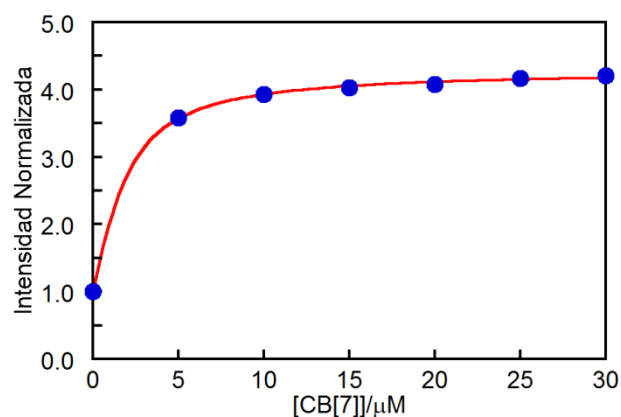


Figura 24. Isotherma de unión del TBO⁺-C6 2 μM en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a CB[7] (0-30 μM), excitando a 620 nm y recolectando los datos a 655 nm.

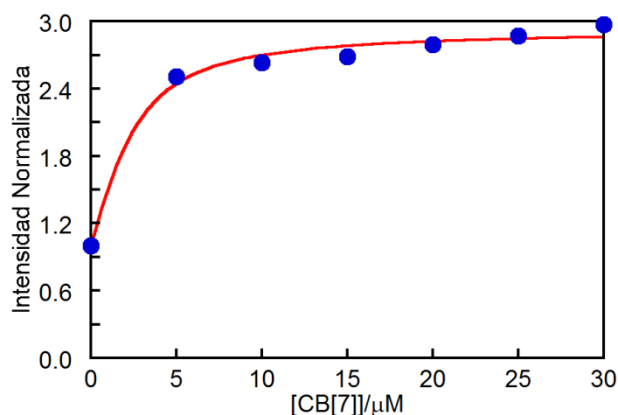


Figura 25. Isotherma de unión del TBO⁺-C14 2 μM en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a CB[7] (0-30 μM), excitando a 620 nm y recolectando los datos a 655 nm.

3.4.6. Estudios Teóricos y de Acoplamiento Molecular Inducido

Para apoyar los datos obtenidos experimentalmente recientemente se publicó un estudio experimental en donde se realizaron algunos estudios teóricos que se presentan en la figura 26. De acuerdo a los resultados de los cálculos teóricos se evidencia la presencia de dos conformaciones posibles para el complejo de inclusión del TBO⁺ con el CB[7], en donde la conformación denominada 1 es de menor energía que la conformación 2, en aproximadamente 0.1 eV.[126]

De igual manera, se realizaron estudios teóricos del TBO⁺-C6@CB[7] y TBO⁺-C14@CB[7] de acoplamiento molecular inducido (docking). El complejo de inclusión del TBO⁺-C6@CB[7] presenta dos posibles conformaciones que se presentan en la figura 27, en la figura 27A el núcleo de la estructura se encuentra dentro del macrociclo con una energía de unión de $\Delta G = -5.73$ kcal/mol (figura 27A) y la otra donde se encuentra la cadena hidrocarbonada del ácido caproico dentro del macrociclo que la hace ligeramente más exergónica que la otra conformación con una energía de unión de $\Delta G = -6.09$ kcal/mol (figura 27B). El complejo de inclusión del TBO⁺-C14@CB[7] también

presenta dos posibles conformaciones al igual que el $\text{TBO}^+@\text{CB}[7]$ y $\text{TBO}^+-\text{C6}@\text{CB}[7]$, al igual que el $\text{TBO}^+-\text{C6}@\text{CB}[7]$ presenta una conformación donde el núcleo de la estructura se encuentra dentro del macrociclo con una energía de unión de $\Delta G = -2.75$ kcal/mol (figura 28A) y la otra donde se encuentra la cadena hidrocarbonada del ácido mirístico dentro del macrociclo estabilizada por un puente de hidrógeno que la hace ligeramente más exergónica que la otra conformación con una energía de unión de $\Delta G = -3.29$ kcal/mol (figura 28B y 28C).

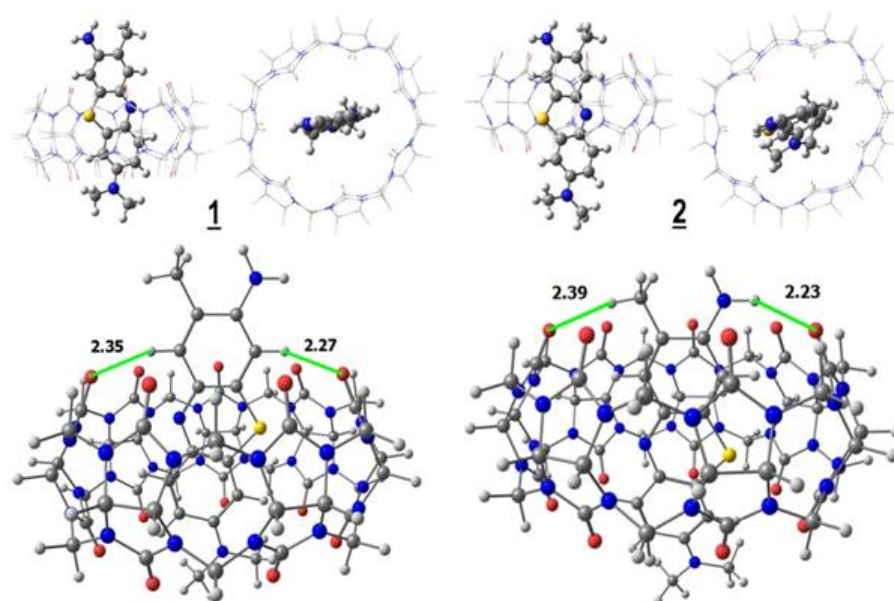


Figura 26. Estructura molecular optimizada del sistema $\text{TBO}^+-\text{CB}[7]$. Dos conformaciones fueron analizadas (1 y 2). Las líneas verdes representan las interacciones de puentes de hidrógeno. Las distancias están en angstroms (Å). Código de colores: Blanco (H); gris (C), azul (N), amarillo (S).

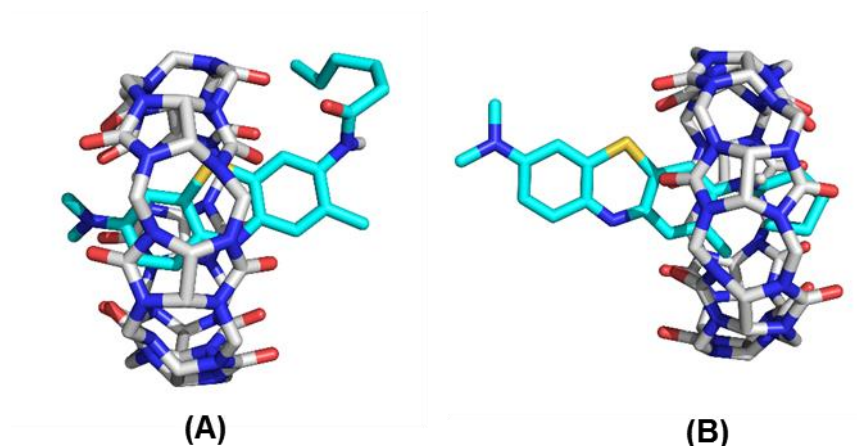


Figura 27. Estructura optimizada del complejo de inclusión $\text{TBO}^+\text{-C6@CB[7]}$. Dos conformaciones energéticamente posibles A y B fueron encontradas.

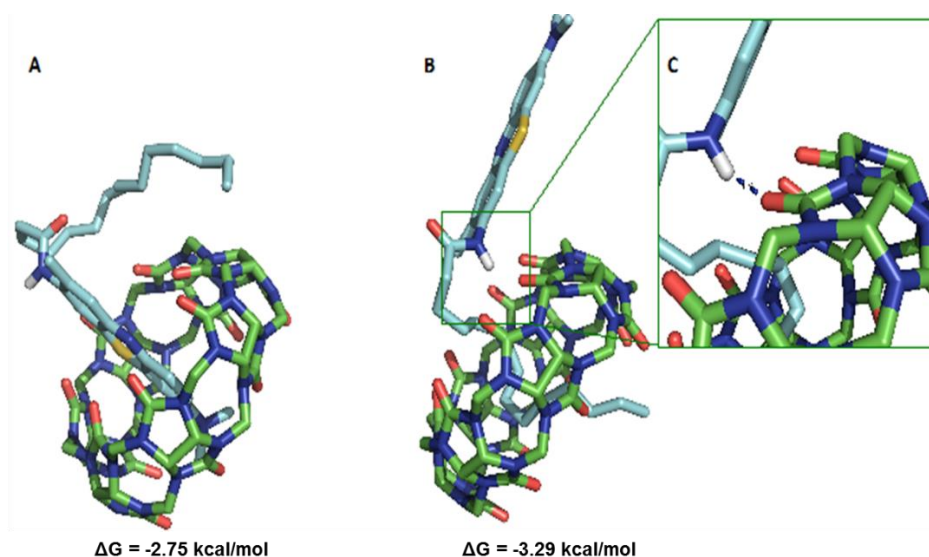


Figura 28. Estructura optimizada del complejo de inclusión $\text{TBO}^+\text{-C14@CB[7]}$. Dos conformaciones energéticamente posibles A y B fueron encontradas.

3.5. Aductos Fotosensibilizador-Proteína

La albúmina de suero humano (HSA) fue utilizada para estudiar los aductos fotosensibilizador-proteína que se forman, para poder comprender su interacción antes de la formación de los complejos biosupramoleculares. De

acuerdo con el protocolo utilizado para los complejos de inclusión, se construyó una curva de asociación como se muestra en las figuras 29-31 para el TBO^+ y sus dos derivados. Esto se realizó por medio de los cambios en la intensidad de fluorescencia al incrementar las concentraciones de la HSA y manteniendo constante la concentración del TBO^+ y los respectivos derivados. Así se construyó una curva de unión, se utilizó análisis numérico para determinar las constantes de asociación de ambos derivados con la HSA los cuales se presentan en la tabla 7.[76] Los resultados demostraron que la constante de asociación del TBO^+ sin derivatizar con la HSA denominado como $\text{TBO}^+:\text{HSA}$, $(9.8 \pm 2.0) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, es similar a la de ambos derivados. El $\text{TBO}^+\text{-C6}:\text{HSA}$ presentó una constante de $(3.5 \pm 1.1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ mientras que para el $\text{TBO}^+\text{-C14}:\text{HSA}$ fue de $(2.7 \pm 0.2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Las diferencias observadas en las constantes de asociación determinadas por fluorescencia para los aductos del TBO^+ , $\text{TBO}^+\text{-C6}$ y $\text{TBO}^+\text{-C14}$ con la HSA no son tan significativas. Estas constantes de asociación para la formación de los aductos con la proteína serán discutidos en la sección 3.10.

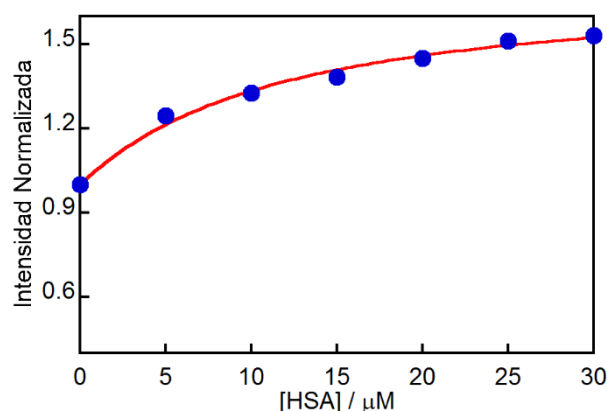


Figura 29. Isoterma de unión del TBO^+ 2 μM en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a HSA (0-30 μM), excitando a 550 nm y recolectando los datos a 660 nm.

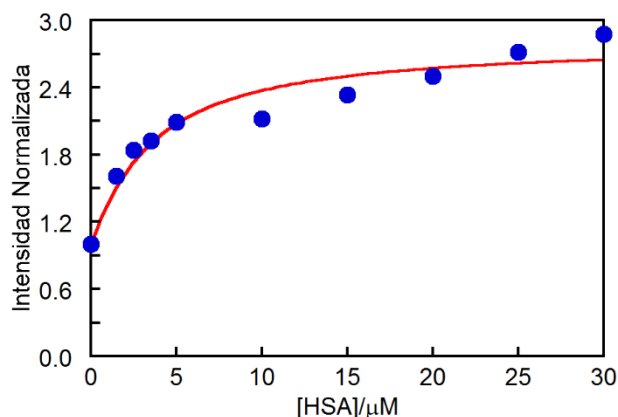


Figura 30. Isotherma de unión del TBO⁺-C6 2 μM en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a HSA (0-30 μM), excitando a 550 nm y recolectando los datos a 660 nm.

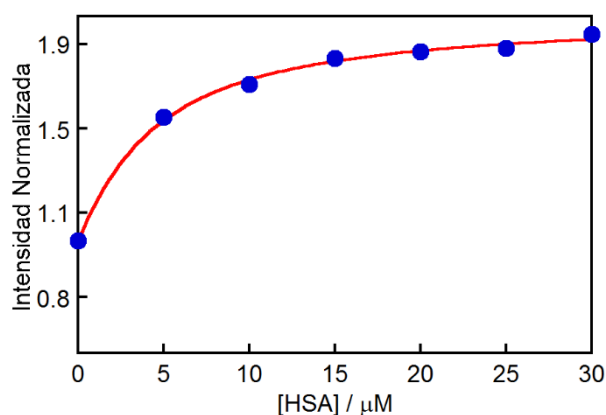


Figura 31. Isotherma de unión del TBO⁺-C14 2 μM en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato y su curva de unión a HSA (0-30 μM), excitando a 550 nm y recolectando los datos a 660 nm.

También se estudió el apagamiento de la fluorescencia intrínseca del único residuo de triptófano de la HSA para obtener la constante de Stern-Volmer (K_{sv}). Se obtuvieron los valores de K_{sv} para TBO⁺:HSA $(1.0 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, TBO⁺-C6:HSA $3.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y TBO⁺-C14:HSA $3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. En ausencia de un apagamiento dinámico la K_{sv} es equivalente a la constante de asociación

para la formación del aducto con la proteína.[131]

Estas constantes de asociación obtenidas para los aductos del TBO⁺, TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 con la HSA, tienen el mismo orden de magnitud que se ha reportado para los aductos de fotosensibilizadores con estructuras similares como el naranja de acridina (AO⁺) y el azul de metileno (MB⁺) con la HSA.[53, 76, 132]

En la literatura, Sharma et al. reportan que la constante de asociación para el aducto TBO⁺:HSA es $4.09 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ determinando por medio de la ecuación de Benesi-Hilderbrand graficando el doble recíproco para obtener la misma.[133] De igual manera, reportan la constante de Stern-Volmer con un valor de $1.67 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. [133] La razón de la discrepancia entre estos valores se debe probablemente a la utilización de gráficos de dobles recíprocos en la referencia indicada, los cuales son conocidos por presentar grandes errores en la estimación de constantes de asociación.[131, 134]

3.6. Determinación del Sitio de Unión del Fotosensibilizador a la HSA

Se ha reportado que el TBO⁺ se une al sitio I de la HSA, conocido como Sudlow I, lo cual fue determinado por desplazamiento con competidores que se unen a los sitios específicos de la HSA Sudlow I y II midiendo los cambios en la intensidad de la fluorescencia.[133] Por estudios de cristalografía de rayos X y estudios de desplazamiento competitivo se ha determinado que la fenilbutazona, warfarina y otros se unen al sitio Sudlow I mientras que ibuprofeno, ácido flufenámico, 4-iodobenzoato y otras se unen al sitio denominado Sudlow II.[48, 51-54, 91, 133, 135] Los fármacos usualmente se unen a un sitio o a pocos sitios de alta afinidad en la HSA con constantes de asociación en el rango de 10^4 - 10^6 M^{-1} . [136] Se han definido características estructurales para los ligandos que usualmente se unen al sitio I y al sitio II de la HSA. En el sitio I se unen típicamente ácidos dicarboxílicos y/o moléculas

heterocíclicas grandes con cargas negativas localizadas en el medio de la molécula. Mientras que en el sitio II, se asocian ácidos carboxílicos aromáticos con grupos ácidos con cargas negativas en la parte terminal de la molécula alejada del centro hidrofóbico.[48, 136, 137] Se han publicado diversos estudios que demuestran la versatilidad del sitio I de unión de la HSA, ya que este es muy flexible y permite que ligandos con diferencias estructurales se puedan unir con alta afinidad. Esto es indicativo de que el sitio I es adaptable para varios ligandos.[138]

También se ha reportado que varios fotosensibilizadores se unen a la HSA con alta afinidad, pero dentro del contexto de esta investigación es importante resaltar que fotosensibilizadores como el naranja de acridina (AO^+) y azul de metileno (MB^+) con estructura similar al TBO^+ se unen al sitio I y al sitio II respectivamente.[53, 76]

Se realizaron experimentos de desplazamiento competitivos utilizando los cambios en la intensidad de la fluorescencia para poder corroborar el sitio de unión de TBO^+ y sus derivados. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando el TBO^+ -C14 ya que es el derivado que ha demostrado mejores propiedades de unión a la HSA y los inhibidores utilizados fueron la warfarina y el 4-iodobenzoato. Los antecedentes bibliográficos indicaban que el TBO^+ se une al sitio Sudlow I,[133] el primer experimento que se realizó fue a una solución de HSA 5 μM adicionar concentraciones crecientes de warfarina desde 0 hasta 10 μM , excitando el Trp de la HSA a 280 nm y se observó la disminución de la intensidad de fluorescencia como se muestra en la figura 32 en los círculos rojos. Este resultado corrobora que la warfarina se une al sitio I como ha sido reportado. Luego se realizó el experimento utilizando HSA 5 μM con TBO^+ -C14 10 μM y adicionando cantidades crecientes de warfarina desde 0-10 μM excitando la muestra a 280 nm (ver figura 32) y se observó una disminución en la fluorescencia de la proteína al adicionar la warfarina representado por los cuadrados azules. La misma muestra también se excitó a 550 nm para observar exclusivamente el comportamiento del TBO^+ -C14, ya

que la warfarina y la HSA no absorben a esta longitud de onda, como se puede observar en el inserto de la figura 32 al adicionar warfarina hay cambios en la intensidad de fluorescencia del TBO⁺-C14 que puede explicarse por el cambio en su entorno al salir del sitio Sudlow I.[53]

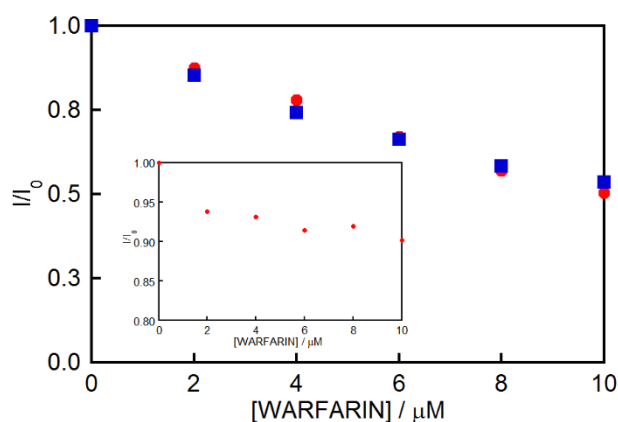


Figura 32. Estudios de desplazamiento de competidores por medio de fluorescencia de HSA 5 μM . Apagamiento de la fluorescencia intrínseca del Trp por la warfarina (0-10 μM) (círculos rojos) excitando a 280 nm. Desplazamiento del TBO⁺-C14 10 μM de HSA 5 μM por la warfarina (0-10 μM) (cuadrados azules) excitando a 280 nm. Inserto: Desplazamiento del TBO⁺-C14 10 μM de HSA 5 μM por la warfarina (0-10 μM) (círculos rojos) excitando a 550 nm. Experimentos realizados en solución amortiguadora de fosfato 10 mM pH 7.0.

Para comprobar los resultados obtenidos se modificó el experimento, utilizando HSA 2 μM con warfarina 2 μM , se adicionaron cantidades crecientes de TBO⁺-C14 desde 0-10 μM ya que la constante de unión de la warfarina $3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, [138] es mayor que la del derivado. La muestra fue excitada a 325 nm donde no absorbe ni la proteína ni el TBO⁺-C14, por lo cual se está excitando exclusivamente a la warfarina. Cómo se puede observar en la figura 33, hay una disminución en la intensidad de la fluorescencia de la warfarina al adicionar el TBO⁺-C14 indicando que el mismo se une al sitio Sudlow I desplazando a la warfarina.

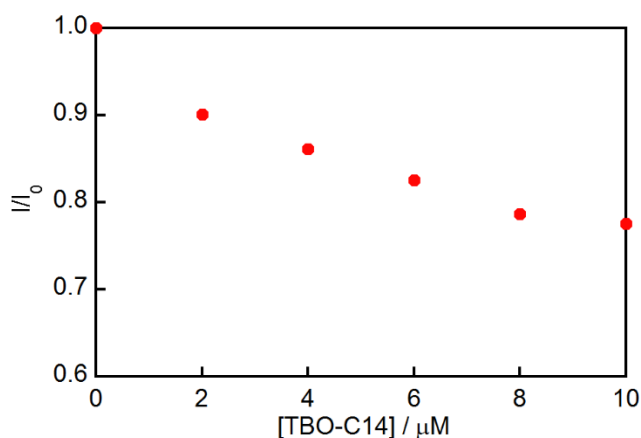


Figura 33. Estudios de desplazamiento de competidores por medio de fluorescencia de HSA 2 μM con warfarina 2 μM por TBO⁺-C14 (0-10 μM) excitando a 325 nm. Experimentos realizados en solución amortiguadora de fosfato 10 mM pH 7.0.

La posibilidad de que el TBO⁺-C14 se una a otros sitios es muy probable y dependiente de las concentraciones utilizadas, razón por la cual se repitió el experimento utilizando HSA 5 μM con 10 μM TBO⁺-C14, adicionando cantidades crecientes de 4-iodobenzoato desde 0-10 μM que se une al sitio Sudlow II con una constante de $1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. [91, 139] Se excitó a una longitud de onda de 280 nm correspondiente al Trp 214 que se encuentra en el sitio Sudlow I y en la figura 34 se observa una leve disminución de la intensidad de fluorescencia hasta 4 μM , seguido de un incremento en el apagamiento de la fluorescencia en concentraciones mayores que puede ser indicativo de un posible cambio conformacional al ocupar ambos sitios Sudlow, ya que el Trp del sitio Sudlow I se encuentra aproximadamente a 30 Å de distancia del sitio de unión del 4-iodobenzoato, Sudlow II, en la estructura de la proteína. [53, 140] La misma muestra fue excitada a 550 nm donde solo absorbe TBO⁺-C14, y se presenta en el inserto de la figura 34 donde podemos observar el mismo comportamiento que en el experimento excitando a 280 nm que prácticamente no hay un cambio en la intensidad de la fluorescencia y sobre 4 μM el mismo fenómeno de cambio en la intensidad de fluorescencia que puede ser atribuido a un posible cambio conformacional en el sitio I una vez el 4-iodobenzoato se

une al sitio Sudlow II.[53] Vistos todos estos resultados se puede afirmar que el derivado se une preferentemente al sitio I de la HSA.

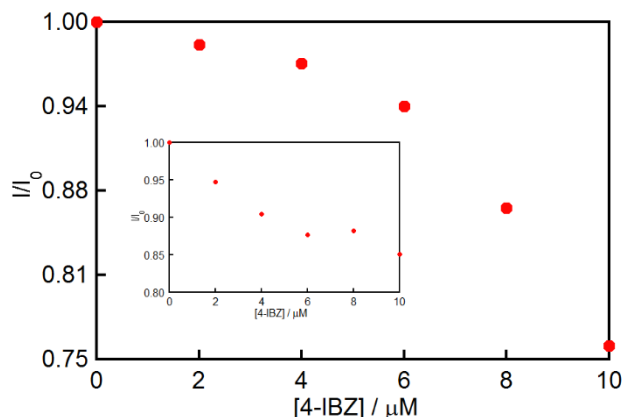


Figura 34. Estudios de desplazamiento de competidores por medio de fluorescencia del TBO⁺-C14 10 μM de HSA 5 μM por el 4-iodobenzoato (0-10 μM) excitando a 280 nm. Inserto: Desplazamiento del TBO⁺-C14 10 μM de HSA 5 μM por el 4-iodobenzoato (0-10 μM) excitando a 550 nm. Experimentos realizados en solución amortiguadora de fosfato 10 mM pH 7.0.

3.7. Complejos Biosupramoleculares

Para demostrar la formación de los complejos biosupramoleculares del TBO⁺ y los derivados hidrofóbicos de azul de toluidina con CB[7] y HSA denominados TBO⁺@CB[7]:HSA, TBO⁺-C6@CB[7]:HSA y TBO⁺-C14@CB[7]:HSA se utilizó el apagamiento de la fluorescencia intrínseca del único residuo de triptófano presente en la HSA como ha sido reportado previamente en la literatura (ver tabla 7).[76, 84, 85] Se compararon con los gráficos de Stern-Volmer obtenidos para el apagamiento del Trp de la HSA por TBO⁺ y sus dos derivados para los respectivos aductos de proteína-fotosensibilizador (ver figuras 35-37), ya que al conocer las constante de asociación de los derivados tanto con el CB[7] como con la HSA se pudo verificar que las constantes de asociación de los aductos proteína-fotosensibilizador del TBO⁺:HSA, TBO⁺-C6:HSA y TBO⁺-C14:HSA obtenidas

por Stern-Volmer son prácticamente las mismas que las de los complejos biosupramoleculares, cuyas constantes fueron $1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para $\text{TBO}^+ \cdot \text{CB}[7]:\text{HSA}$, $3.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para $\text{TBO}^+ \cdot \text{C6@CB}[7]:\text{HSA}$ y $3.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para $\text{TBO}^+ \cdot \text{C14@CB}[7]:\text{HSA}$. Esta similitud en los valores de las constantes puede deberse a varias alternativas posibles. Primero que los derivados se disocien del complejo con CB[7] para asociarse a la proteína; que el complejo de inclusión cuando se aproxima a la proteína libere al derivado hacia la proteína o que la estructura del complejo de inclusión permita que parte de la estructura de los derivados se encuentren fuera del CB[7] como se ha reportado anteriormente para fotosensibilizadores que forman complejos 1:1 con el CB[7]. [141, 142]

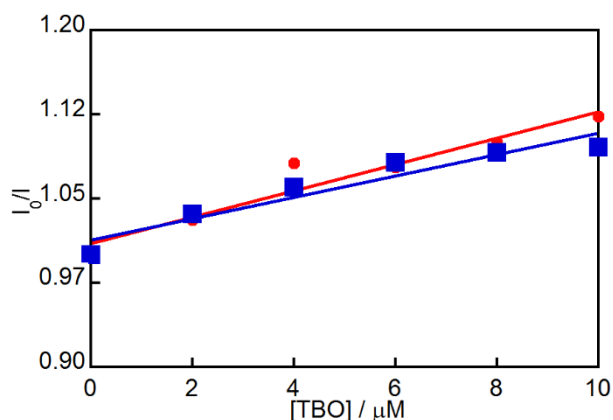


Figura 35. Gráfico de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia del Trp de la HSA (5 μM) por el TBO^+ (0-10 μM) en ausencia (círculos rojos) y presencia de CB[7] 50 μM (cuadrados azules) en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato, excitando a 280 nm y recolectando los datos a 350 nm.

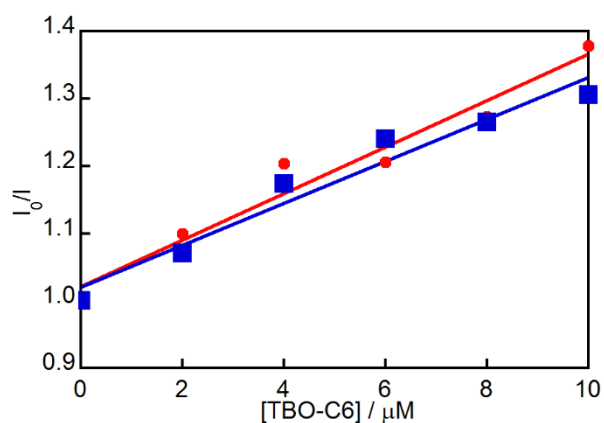


Figura 36. Gráfico de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia del Trp de la HSA (5 μM) por el TBO⁺-C6 (0-10 μM) en ausencia (círculos rojos) y presencia de CB[7] 50 μM (cuadrados azules) en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato, excitando a 280 nm y recolectando los datos a 350 nm.

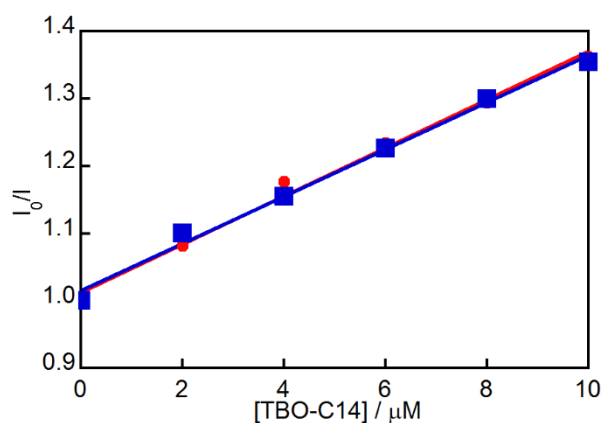


Figura 37. Gráfico de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia del Trp de la HSA (5 μM) por el TBO⁺-C14 (0-10 μM) en ausencia (círculos rojos) y presencia de CB[7] 50 μM (cuadrados azules) en solución amortiguadora (pH = 7) 10 mM de fosfato, excitando a 280 nm y recolectando los datos a 350 nm.

Tabla 7. Resumen de las constantes de asociación obtenidas por fluorescencia. Las soluciones fueron preparadas en solución amortiguadora (pH = 7) de fosfato 10 mM.

Derivado	Constante de asociación CB[7] (Isotherma)	Constante de asociación HSA (Isotherma)	Constante de asociación HSA (Apagamiento)
TBO ⁺	(5.5 ± 0.6) x 10 ⁶ M ⁻¹	(9.8 ± 2.0) x 10 ⁴ M ⁻¹	(1.0 ± 0.2) x 10 ⁴ M ⁻¹
TBO ⁺ -C6	(4.8 ± 1.2) x 10 ⁵ M ⁻¹	(3.5 ± 1.1) x 10 ⁵ M ⁻¹	3.4 x 10 ⁴ M ⁻¹
TBO ⁺ -C14	(6.7 ± 2.0) x 10 ⁵ M ⁻¹	(2.7 ± 0.2) x 10 ⁵ M ⁻¹	3.6 x 10 ⁴ M ⁻¹
TBO ⁺ @CB[7]: HSA			1.0 x 10 ⁴ M ⁻¹
TBO ⁺ - C6@CB[7]: HSA			3.1 x 10 ⁴ M ⁻¹
TBO ⁺ - C14@CB[7]: HSA			3.5 x 10 ⁴ M ⁻¹

3.8. Estudios de Acoplamiento Molecular Inducido

En la literatura se realizaron estudios de acoplamiento molecular inducido para TBO⁺:HSA y ellos observaron que el fotosensibilizador se une al sitio Sudlow I, lo cual fue corroborado experimentalmente por estudios de desplazamiento de competidores observando los cambios en la intensidad de fluorescencia.[133]

En los estudios actuales se vio reflejado que el derivado de TBO⁺-C14 se une al sitio Sudlow I de la HSA como se demostró experimentalmente y se puede observar en la figura 38A la cadena hidrocarbonada del ácido mirístico que se utilizó para derivatizar el TBO⁺ ayuda a incrementar la afinidad por la proteína (ver tabla 8). El estudio computacional proporcionó un $\Delta G = -5.45$ kcal/mol para el derivado de TBO⁺-C14 con la HSA y previamente se había reportado que el valor experimental para la unión de TBO⁺ fue de $\Delta G = -7.54$ kcal/mol y

el valor obtenido computacionalmente fue de $\Delta G = -5.35$ kcal/mol. Estos valores son similares a los obtenidos experimentalmente por medio de ITC para el TBO⁺ que fue de -7.7 ± 0.2 kcal/mol (ver tabla 8). También se presenta en la figura 38B que la interacción entre CB[7] y la HSA es energéticamente desfavorable.

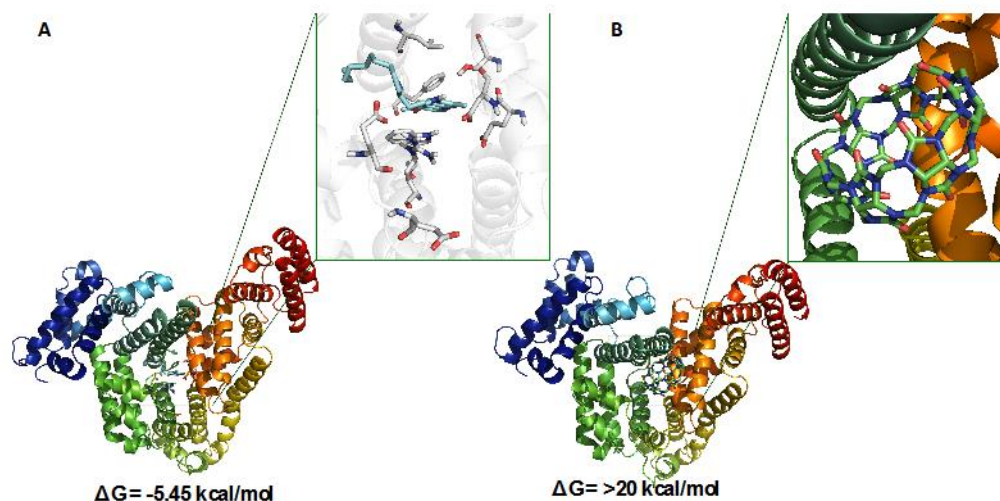


Figura 38. Estudio de acoplamiento molecular inducido del derivado TBO⁺-C14 con la HSA (A) y el CB[7] con la HSA (B).

Para estudiar la interacción que se da en el complejo biosupramolecular, el mismo fue evaluado por acoplamiento molecular inducido y se obtuvieron dos posibilidades que se presentan en la figura 39A y 39B, en la primera cuando el complejo de inclusión entre el TBO⁺-C14@CB[7] se aproxima a la HSA el fotosensibilizador se sale del macrociclo y se va hacia la proteína, y en la figura 39B se observa que la otra alternativa es que el complejo de inclusión donde la cadena hidrocarbonada es la que se encuentra dentro del macrociclo al aproximarse a la HSA lo que la proteína ve es el fotosensibilizador y esto tiene un ΔG más exergónico, lo que hace que este proceso sea más espontáneo. Estas dos posibilidades pueden dar una posible explicación del porque cuando se hace el experimento de apagamiento de la fluorescencia para construir el gráfico de Stern-Volmer se obtienen el mismo valor para el aducto

fotosensibilizador-proteína como para los complejos biosupramoleculares.

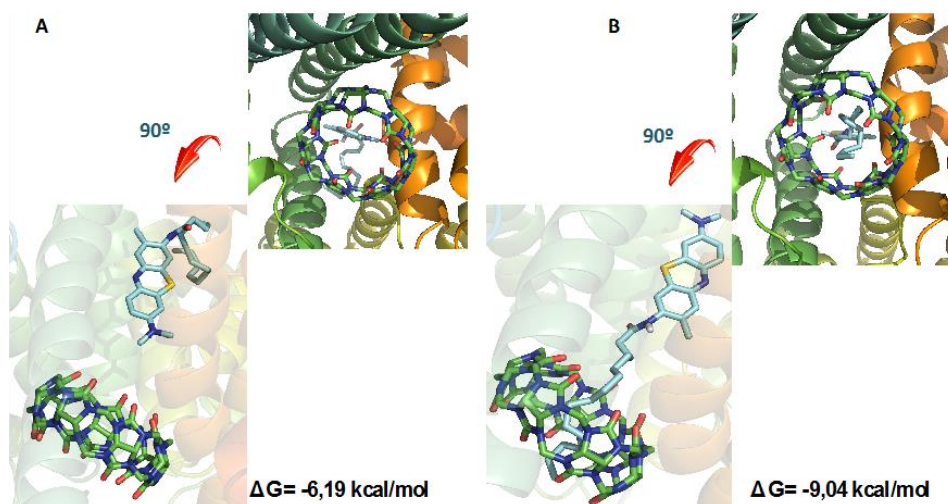


Figura 39. Estudio de acoplamiento molecular inducido del complejo biosupramolecular.

3.9. Estudios de Asociación por Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

Se realizaron experimentos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC por sus siglas en inglés) para determinar las constantes de asociación del TBO^+ , $\text{TBO}^+\text{-C6}$ y $\text{TBO}^+\text{-C14}$ con el $\text{CB}[7]$ y con la HSA las cuales se reportan en la tabla 8. Al igual que los parámetros termodinámicos obtenidos en estos experimentos, por medio de la ecuación de energía libre de Gibbs ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$).[143] Todos los sistemas presentados en la tabla 8 se analizaron utilizando una estequiometría de 1:1 para los complejos de inclusión, al igual que el aducto con la proteína. Cuando se evaluaron las constantes de asociación con el $\text{CB}[7]$ se puede observar que la constante del complejo de inclusión para el $\text{TBO}^+@ \text{CB}[7]$ fue de $(5.3 \pm 0.9) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (anexo 25), mientras que para los complejos de inclusión de los derivados fue de $(4 \pm 2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$

para el TBO⁺-C6 (ver anexo 27) y de $(1.4 \pm 0.1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ para el TBO⁺-C14 (ver anexo 29). La constante de asociación para el complejo de inclusión TBO⁺@CB[7] fue mayor que la del complejo del TBO⁺-C6@CB[7], pero inferior a la del TBO⁺-C14@CB[7] lo cual indica que la longitud de la cadena hidrocarbonada tiene un efecto de un orden de magnitud en la constante de asociación. El complejo del TBO⁺@CB[7] tiene mayor contribuciones entálpicas para su constante de asociación, $-2.2 \pm 0.2 \text{ kcal/mol}$, en comparación con los complejos de inclusión de ambos derivados TBO⁺-C6@CB[7], $\sim -0.3 \text{ kcal/mol}$, y una contribución de $-0.35 \pm 0.02 \text{ kcal/mol}$ para el TBO⁺-C14@CB[7]. Estos resultados son consistentes con los datos obtenidos en los estudios de química computacional en donde se ve claramente que el complejo del TBO⁺@CB[7] es estabilizado por interacciones de puente de hidrógeno como se ve en la figura 26, mientras que en la figura 27 y 28 vemos que para los estudios de simulación molecular de los complejos TBO⁺-C6@CB[7] y TBO⁺-C14@CB[7], respectivamente, ambos presenta dos conformaciones, en una de las cuales se observa que la cadena hidrocarbonada es la porción del derivado que se encuentra dentro del macrociclo y esta es la conformación energéticamente más favorable. El grupo amino libre del TBO⁺ presenta interacciones con los portales de los grupos carbonilos del CB[7], al realizar la derivatización para obtener el enlace amida correspondiente posiblemente se pierden interacciones con el CB[7], haciendo la interacción más desfavorable.

Tabla 8. Resumen de los parámetros termodinámicos obtenidos por ITC. Las soluciones fueron preparadas en solución amortiguadora (pH = 7) de fosfato 10 mM.

Sistema	Ka (M ⁻¹)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	-TΔS (kcal/mol)
TBO ⁺ @CB[7]	(5.3 ± 0.9) x 10 ⁵	-7.8 ± 0.1	-2.2 ± 0.2	-5.7 ± 0.3
TBO ⁺ :HSA	(4 ± 1) x 10 ⁵	-7.7 ± 0.2	-0.5 ± 0.1	-7.12 ± 0.06
TBO ⁺ - C6@CB[7]	(4 ± 2) x 10 ⁴	-6.4 ± 0.4	~ -0.3	-6.1 ± 0.6
TBO ⁺ -C6:HSA	(1.0 ± 0.4) x 10 ⁴	-5.5 ± 0.3	-2.3 ± 1.4	-3.2 ± 1.2
TBO ⁺ - C14@CB[7]	(1.4 ± 0.1) x 10 ⁶	-8.39 ± 0.04	-0.35 ± 0.02	-8.04 ± 0.05
TBO ⁺ - C14:HSA	3 x 10 ⁶	-8.76	-0.91	-7.86

En cuanto a las contribuciones entrópicas, podemos observar en la tabla 8 que la formación del complejo de inclusión del derivado TBO⁺-C14@CB[7] al igual que el complejo TBO⁺-C6@CB[7] están gobernados por procesos de reordenamiento para secuestrarla del medio acuoso hacia el interior de la cavidad hidrofóbica del macrociclo. La entropía en la formación del complejo de inclusión TBO⁺-C6@CB[7] no cambia significativamente en comparación con el TBO⁺@CB[7] por la longitud de la cadena, mientras que en el complejo de inclusión TBO⁺-C14@CB[7] cambia significativamente por la longitud de la cadena. Aunque el complejo de inclusión del TBO⁺@CB[7] presenta las mayores contribuciones entálpicas en comparación con los otros dos sistemas, las mayores contribuciones para su ΔG proviene de las contribuciones entrópicas para la formación del complejo de inclusión, lo cual indica que el proceso está fuertemente influenciado por secuestrar la molécula del TBO⁺ del

medio acuoso para la formación del complejo de inclusión. Es importante resaltar que la liberación de 7 moléculas de agua altamente ordenadas que se encuentran dentro de la cavidad del CB[7] al solvente contribuyen enormemente a las constantes de asociación de los complejos de inclusión de este macrociclo, ya que proporcionan la fuerza para la formación del complejo. La liberación de estas moléculas de agua de la cavidad al medio acuoso al formarse el complejo de inclusión representa una contribución notable al aumento de entropía del sistema.[111, 144-147]

Los valores de ΔG de los tres complejos de inclusión son negativos, lo cual indica que son procesos espontáneos, el mayor valor de ΔG reportado fue de -8.39 ± 0.04 kcal/mol para el complejo de inclusión del $\text{TBO}^+\text{-C14@CB[7]}$, seguido por -7.8 ± 0.1 kcal/mol para el $\text{TBO}^+\text{@CB[7]}$ y por último se obtuvo un valor de -6.4 ± 0.4 kcal/mol para $\text{TBO}^+\text{-C6@CB[7]}$.

Se determinó la constante de asociación con la HSA, y los valores obtenidos son reportados en la tabla 8, en donde se puede observar que la constante de asociación para la formación del aducto con la proteína para el $\text{TBO}^+\text{:HSA}$ fue de $(4 \pm 1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (ver anexo 26), mientras que para los aductos con la proteína de los derivados fue de $(1.0 \pm 0.4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ para el $\text{TBO}^+\text{-C6}$ (ver anexo 28) y $\text{TBO}^+\text{-C14}$ (ver anexo 30), respectivamente. La constante de asociación para el aducto con la proteína del $\text{TBO}^+\text{:HSA}$ fue mayor que la del aducto del $\text{TBO}^+\text{-C6:HSA}$, pero inferior a la del $\text{TBO}^+\text{-C14:HSA}$ lo cual indica que la longitud de la cadena hidrocarbonada tiene un efecto en su asociación con la proteína de un orden de magnitud en la constante de asociación. El aducto con la proteína denominado como $\text{TBO}^+\text{:HSA}$ tiene menores contribuciones entálpicas para su constante de asociación, -0.5 ± 0.1 kcal/mol, en comparación con las del aducto del $\text{TBO}^+\text{-C6:HSA}$, -2.3 ± 1.4 kcal/mol. De igual manera, las contribuciones entálpicas del aducto $\text{TBO}^+\text{-C14:HSA}$, -0.91 kcal/mol, son ligeramente superior a las del aducto del TBO^+ , pero sustancialmente inferior que las del aducto del $\text{TBO}^+\text{-C6}$. En cuanto a las contribuciones entrópicas, podemos observar en la tabla

8 que la formación del aducto $\text{TBO}^+:\text{HSA}$ al igual que el complejo $\text{TBO}^+-\text{C14}:\text{HSA}$ están gobernados por procesos de reordenamiento para secuestrar las moléculas del medio acuoso hacia los bolsillos hidrofóbicos de la proteína, para que la molécula pueda formar el aducto con la proteína. Aunque el aducto $\text{TBO}^+-\text{C6}:\text{HSA}$ presenta las mayores contribuciones entálpicas en comparación con los otros dos sistemas, las mayores contribuciones para su ΔG proviene de las contribuciones entrópicas para la formación del aducto con la proteína, lo cual indica que el proceso está fuertemente influenciado por secuestrar la molécula del $\text{TBO}^+-\text{C6}$ del medio acuoso para la formación del aducto. Estos resultados son consistentes con los datos obtenidos en los estudios de acoplamiento molecular inducido, en donde se ve claramente que el aducto del $\text{TBO}^+-\text{C14}:\text{HSA}$ en la figura 38 tiene un $\Delta G = -5.45 \text{ kcal/mol}$ y en los experimentos de ITC se determinó un $\Delta G = -8.76 \text{ kcal/mol}$. De igual manera, se pudo determinar que el aducto $\text{TBO}^+:\text{HSA}$ tiene un $\Delta G = -7.7 \pm 0.2 \text{ kcal/mol}$ para la formación del aducto y se ha reportado anteriormente un valor por estudios de acoplamiento molecular inducido de $\Delta G = -5.35 \text{ kcal/mol}$ y en esta publicación determinaron experimentalmente un $\Delta G = -7.54 \text{ kcal/mol}$ por medio del apagamiento de la fluorescencia intrínseca del triptófano 214 de la HSA y los valores obtenidos fueron ajustados a la ecuación de doble recíproco de Benesi-Hildebrand para obtener la constante de asociación del TBO^+ con la HSA para la formación del aducto, posterior a esto determinar el ΔG . [133]

3.10. Comparación de las constantes de asociación obtenidas por medio de las técnicas de fluorescencia y por ITC.

Tabla 9. Comparación de las constantes de asociación obtenidas para los fotosensibilizadores con el CB[7] y HSA por medio de técnicas de fluorescencia y por ITC. Las soluciones fueron preparadas en solución amortiguadora (pH = 7) de fosfato 10 mM.

Fotosensibilizador	Fluorescencia	ITC
TBO ⁺ @CB[7]	$(5.5 \pm 0.6) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	$(5.3 \pm 0.9) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$
TBO ⁺ -C6@CB[7]	$(4.8 \pm 1.2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	$(4 \pm 2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$
TBO ⁺ -C14@CB[7]	$(6.7 \pm 2.0) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
TBO ⁺ :HSA	$(9.8 \pm 2.0) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	$(4 \pm 1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$
TBO ⁺ -C6:HSA	$(3.5 \pm 1.1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	$(1.0 \pm 0.4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$
TBO ⁺ -C14:HSA	$(2.7 \pm 0.2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	$3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$

En la tabla 9 se comparan las constantes de asociación obtenidas por medio de fluorescencia a través de la construcción de isothermas de unión para el CB[7] y para la HSA con los valores obtenidos por medio de ITC para los respectivos complejos de inclusión con CB[7] y el aducto con la HSA para los diferentes fotosensibilizadores.

Se puede observar en la tabla 9 las constantes de asociación para los complejos de inclusión de los fotosensibilizadores con el CB[7] determinados por fluorescencia, en donde el complejo de inclusión TBO⁺@CB[7] presenta una constante de asociación un orden de magnitud mayor que las constantes de asociación de los complejos de inclusión de los derivados TBO⁺-C6@CB[7] y TBO⁺-C14@CB[7]. Cuando se determinaron estas constantes de asociación por ITC el complejo de inclusión del derivado TBO⁺-C14@CB[7] presentó una constante de asociación un orden de magnitud mayor que la del complejo de inclusión TBO⁺@CB[7], mientras que la del complejo de inclusión del derivado TBO⁺-C6@CB[7] fue un orden de magnitud menor que las del complejo de inclusión del TBO⁺. Las variaciones que se han obtenido en las constantes de asociación utilizando las metodologías de ITC y de fluorescencia, de acuerdo con la química supramolecular se pueden explicar debido a que las constantes

de asociación determinadas por medio de fluorescencia hacen referencia a las interacciones de asociación en el estado excitado, mientras que las determinadas por ITC representan las interacciones asociadas al estado basal. Por consiguiente, las interacciones de asociación medidas por medio de fluorescencia representarán las interacciones del estado excitado y los cambios asociados al microambiente de la molécula huésped. Las constantes de asociación determinada por medio de ITC representan las interacciones de asociación en el estado basal y los cambios globales asociados a esta propiedad. Estas constantes medidas por ambas técnicas pueden ser la misma si no existieran cambios en el estado de hidratación en la interfase entre el huésped y el anfitrión.[128] Para poder comprender en detalle las diferencias entre las constantes de asociación obtenidas a partir del estado excitado o del estado basal en la química supramolecular se debe considerar la velocidad de inclusión del huésped dentro de la cavidad del macrociclo, la velocidad de exclusión del huésped de la cavidad del macrociclo y la velocidad del decaimiento del estado excitado de la molécula huésped,[148] las cuales escapan de los objetivos planteados en esta tesis. Se ha reportado en esta tesis la posibilidad de la presencia de dos posibles conformaciones para los complejos de inclusión con CB[7], para el TBO⁺, TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14. Los estudios teóricos demostraron las dos conformaciones posibles para los complejos de inclusión, lo cual fue consistente con los resultados obtenidos en los tiempos de vida de fluorescencia. Los tiempos de vida de fluorescencia para los complejos de inclusión de estas dos conformaciones, son un indicio de que la estructura del complejo de inclusión tiene un efecto en la determinación de las constantes de asociación con CB[7] por la técnica de fluorescencia. Cuando se forma el complejo de inclusión con el núcleo de la molécula dentro de la cavidad hidrofóbica del CB[7] hay un incremento en la intensidad de fluorescencia, mientras que cuando se forma el complejo de inclusión con la cadena hidrocarbonada dentro de la cavidad hidrofóbica del macrociclo no hay cambios en la fluorescencia, por eso se está subestimando

los valores de asociación cuando son determinados por medio de fluorescencia y esto es particularmente notorio para el derivado TBO⁺-C14. Las constantes de asociación para la formación de los aductos con la proteína al ser determinados por isotermas de unión consideran todos los sitios de unión posible para los fotosensibilizadores y no solamente la asociación al sitio I, como lo considera el apagamiento de la fluorescencia intrínseca del único residuo de triptófano (Trp 214) de la HSA que se encuentra en el sitio Sudlow I. Al comparar las constantes de asociación obtenidas por fluorescencia se puede observar en la tabla 9 que las constantes son similares en el orden de magnitud dentro del error experimental, para TBO⁺:HSA, TBO⁺-C6:HSA y TBO⁺-C14:HSA. En las constantes de asociación determinadas por ITC el aducto TBO⁺-C14:HSA presentó una constante de asociación de un orden de magnitud mayor que el aducto TBO⁺:HSA, y para el aducto TBO⁺-C6:HSA se obtuvo una constante de asociación de un orden de magnitud menor que la constante de asociación del aducto TBO⁺:HSA. Igual que en el caso anterior se podría formar un aducto de inclusión con la cadena hidrocarbonada dentro de una cavidad hidrofóbica de la HSA, y no con el núcleo de la molécula del fotosensibilizador. La inclusión de la cadena hidrocarbonada puede hacer que se esté subestimando los valores de asociación cuando son determinados por medio de fluorescencia, lo cual también es más notorio en para el derivado TBO⁺-C14. En vista de estos resultados se puede inferir que la derivatización para incrementar la hidrofobicidad del TBO⁺ se ve afectada por la longitud de la cadena hidrocarbonada. Se ha reportado que al incrementar la longitud de la cadena hidrocarbonada para incrementar la hidrofobicidad de las moléculas usualmente se incrementa la constante de asociación con proteínas albúminas de manera lineal con el largo de la cadena.[149] En el caso de esta tesis ese efecto no fue observado, ya que el TBO⁺-C6 presentó una constante de asociación con la HSA un orden de magnitud inferior al TBO⁺. Esto podría ser debido a agregación de las cadenas alifáticas cortas como la del derivado TBO⁺-C6, como ha sido reportado anteriormente.[150]

3.11. Estudios de toxicidad en oscuro en células HeLa cultivadas *in vitro*.

Se realizaron estudios de fototoxicidad en células HeLa cultivadas *in vitro*, las cuales corresponden a células epiteliales de cáncer cérvico-uterino. Estas son células que crecen de manera adherente lo cual permite utilizarlas como modelo para tumores sólidos en los cuales se han reportado receptores específicos que ayudan en la incorporación de fármacos a los tumores.[45] Primeramente se realizó un estudio de toxicidad en oscuro a 24 horas de incubación a diferentes concentraciones para encontrar la concentración óptima para los estudios de irradiación. En la tabla 10 se presentan los resultados obtenidos para el TBO⁺, TBO⁺-C6 y el TBO⁺-C14. Se decidió utilizar una concentración de 0.4 μ M para realizar los estudios de fototoxicidad ya que a esta concentración no se presenta toxicidad en oscuro a 24 horas de incubación.

Tabla 10. Resultados de toxicidad en oscuro a 24 horas de incubación de diferentes concentraciones de fotosensibilizadores en células HeLa cultivadas *in vitro*.

TBO ⁺ [μ M]	Viabilidad	TBO ⁺ -C6 [μ M]	Viabilidad	TBO ⁺ -C14 [μ M]	Viabilidad
40	34.92%	40	43.72%	40	50.29%
4	72.30%	4	73.69%	4	83.26%
0.4	105.01%	0.4	98.49%	0.4	98.66%
0.04	104.71%	0.04	102.01%	0.04	106.50%
0.004	101.71%	0.004	105.36%	0.004	99.16%
0.0004	99.67%	0.0004	103.31%	0.0004	97.16%

3.12. Estudios de Microscopía de Fluorescencia en células HeLa cultivadas *in vitro*

3.12.1 Tinción con DAPI de células HeLa

Para realizar una comparación de los resultados obtenidos en los estudios exploratorios de fototoxicidad entre 0.4 μ M y 4 μ M de concentración de los

fotosensibilizadores por los resultados de toxicidad en oscuro, se utilizó el TBO⁺ y los diferentes sistemas de transporte para realizar un estudio de co-localización de tinción celular utilizando DAPI para teñir el núcleo de las células HeLa cultivadas *in vitro* y por medio de microscopía de fluorescencia realizar un estudio de incorporación como se observa en las figura 40 y 41. En estas figuras el canal azul representa el núcleo de las células teñido con DAPI y el canal rojo el fotosensibilizador incorporado por los diferentes sistemas de transporte, y al sobreponer la imagen de los dos canales utilizando el software imageJ del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (National Institute of Health, NIH por sus siglas en inglés) se obtiene la imagen representativa de las figuras reportadas. Al utilizar una concentración de 4 μM del PS, independientemente del sistema de transporte utilizado no se observa una localización específica del fotosensibilizador, a esta concentración el PS se localiza en distintitos organelos. Las imágenes de microscopía de fluorescencia de la figura 40 muestran que parte del PS se localiza en las membranas y se observa que en parte se localiza en el núcleo, lo cual no es deseable para aplicaciones en PDT ya que puede generar mutagénesis. Sin embargo, al utilizar una concentración de 0.4 μM del fotosensibilizador como se observa en la figura 41, independientemente del sistema de transporte utilizado, el PS se localiza de manera más selectiva en algunos organelos. Debido a estos resultados para garantizar un efecto fototóxico localizado y un transporte eficiente del fotosensibilizador se decidió utilizar 0.4 μM como concentración de trabajo para todos los ensayos celulares.

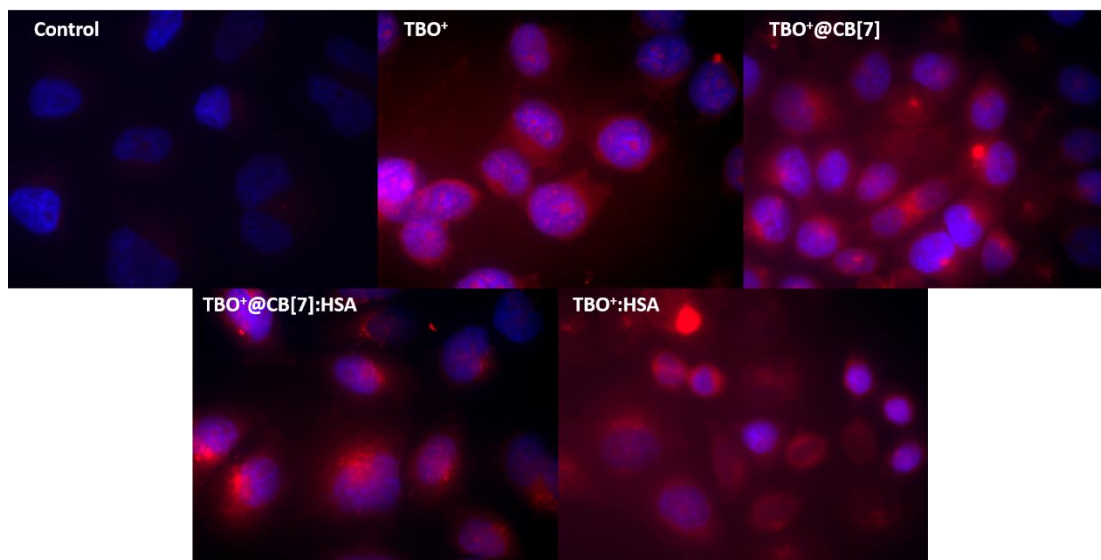


Figura 40. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con DAPI (canal azul) y la incorporación de TBO⁺ 4 μ M solo y con los diferentes sistemas de transporte (canal rojo), en presencia de CB[7] 50 μ M (TBO⁺@CB[7]), CB[7] 50 μ M y HSA 15 μ M (TBO⁺@CB[7]:HSA) y HSA 15 μ M (TBO⁺:HSA).

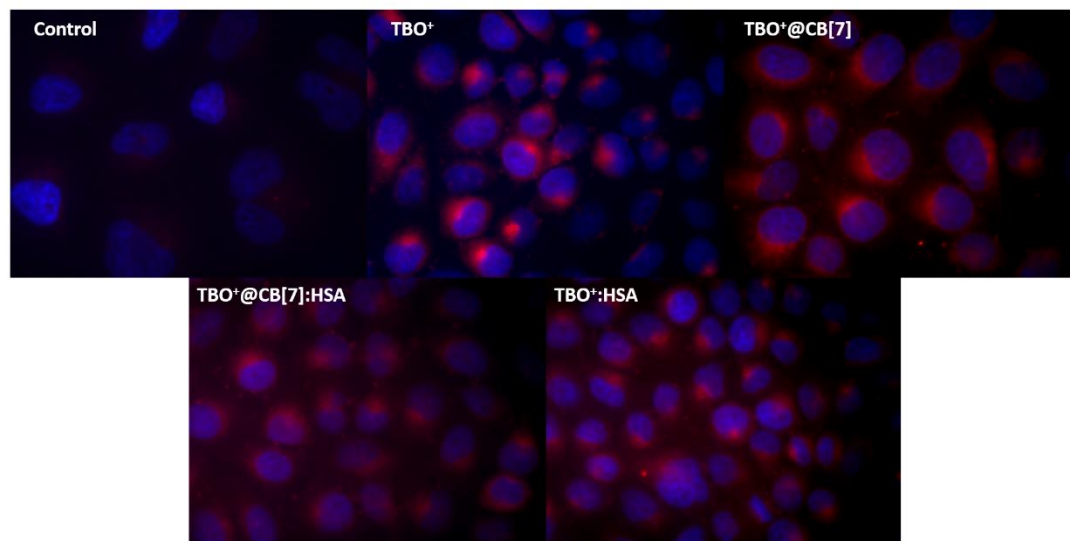


Figura 41. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con DAPI (canal azul) y la incorporación de TBO⁺ 0.4 μ M solo y con los diferentes sistemas de transporte (canal rojo), en presencia de CB[7] 50 μ M (TBO⁺@CB[7]), CB[7] 50 μ M y HSA 15 μ M (TBO⁺@CB[7]:HSA) y HSA 15 μ M (TBO⁺:HSA).

El siguiente paso fue realizar los experimentos de tinción con DAPI para los derivados TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 solos y con la utilización de los diferentes sistemas de transporte para evaluar si había un efecto en la incorporación de los mismos producto de la derivatización. Como se puede observar en las figuras 42 y 43, para el TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 respectivamente, se observó el mismo comportamiento en la incorporación de los derivados y sus diferentes sistemas de transporte con respecto al TBO⁺ y sus diferentes sistemas de transporte en donde se observa que el fotosensibilizador se encuentra preferentemente localizado en algunos organelos en la célula, los cuales serán identificados en la siguiente sección.

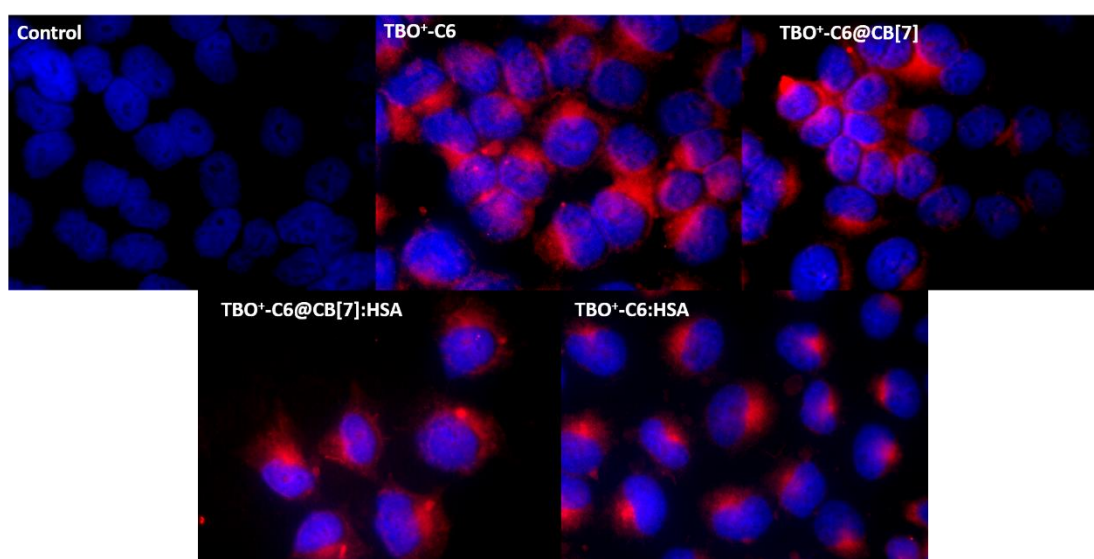


Figura 42. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con DAPI (canal azul) y la incorporación de TBO⁺-C6 0.4 μM solo y con los diferentes sistemas de transporte (canal rojo), en presencia de CB[7] 50 μM (TBO⁺-C6 @CB[7]), CB[7] 50 μM y HSA 15 μM (TBO⁺-C6@CB[7]:HSA) y HSA 15 μM (TBO⁺-C6:HSA).

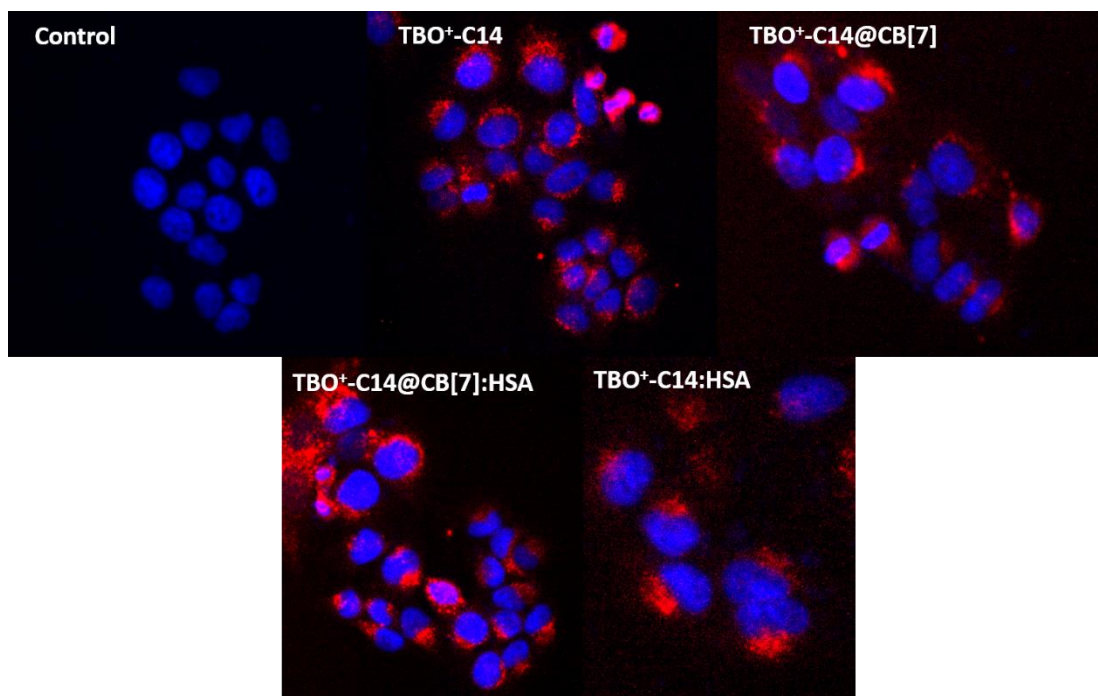


Figura 43. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con DAPI (canal azul) y la incorporación de TBO⁺-C14 0.4 μ M solo y con los diferentes sistemas de transporte (canal rojo), en presencia de CB[7] 50 μ M (TBO⁺-C6 @CB[7]), CB[7] 50 μ M y HSA 15 μ M (TBO⁺-C14@CB[7]:HSA) y HSA 15 μ M (TBO⁺-C14:HSA).

3.12.2 Estudios de co-localización celular en células HeLa

Una vez determinada la presencia de los fotosensibilizadores solos y utilizando los diferentes sistemas de transporte, el siguiente paso fue realizar estudios de co-localización celular para obtener más información sobre la localización subcelular de los fotosensibilizadores solos y transportados por los diferentes sistemas. La localización celular de los fotosensibilizadores se ha reportado en diferentes organelos, y que es dependiente del tipo de línea celular utilizada. Se ha reportado previamente la localización subcelular del TBO⁺ en diferentes líneas celulares en donde se observó en diferentes organelos, tales como en el lisosoma en células HeLa,[125] preferentemente en las mitocondrias en células de cáncer epidermoide A-253,[151] y en el Retículo

Endoplasmático y en el Aparato de Golgi para células Jurkat.[27] En el diseño experimental en esta tesis se utilizaron los sistemas de tinción de SYTO 9 para teñir el núcleo (canal verde), WGA-Alexa 350 para teñir las membranas plasmáticas y parcialmente el Aparato de Golgi (canal azul) y Mitopainter Blue para teñir las mitocondrias (canal azul).

Se comparó la tinción de DAPI y SYTO 9 para identificar que parte del núcleo se puede observar cuando se utiliza SYTO 9, ya que con la tinción utilizando DAPI como se puede observar en la figura 44 se tiñe todo el núcleo mientras que con el SYTO 9 se puede verse tinción de ácido nucleicos y en menor cantidad en el citoplasma y mitocondria de acuerdo con el manufactor.

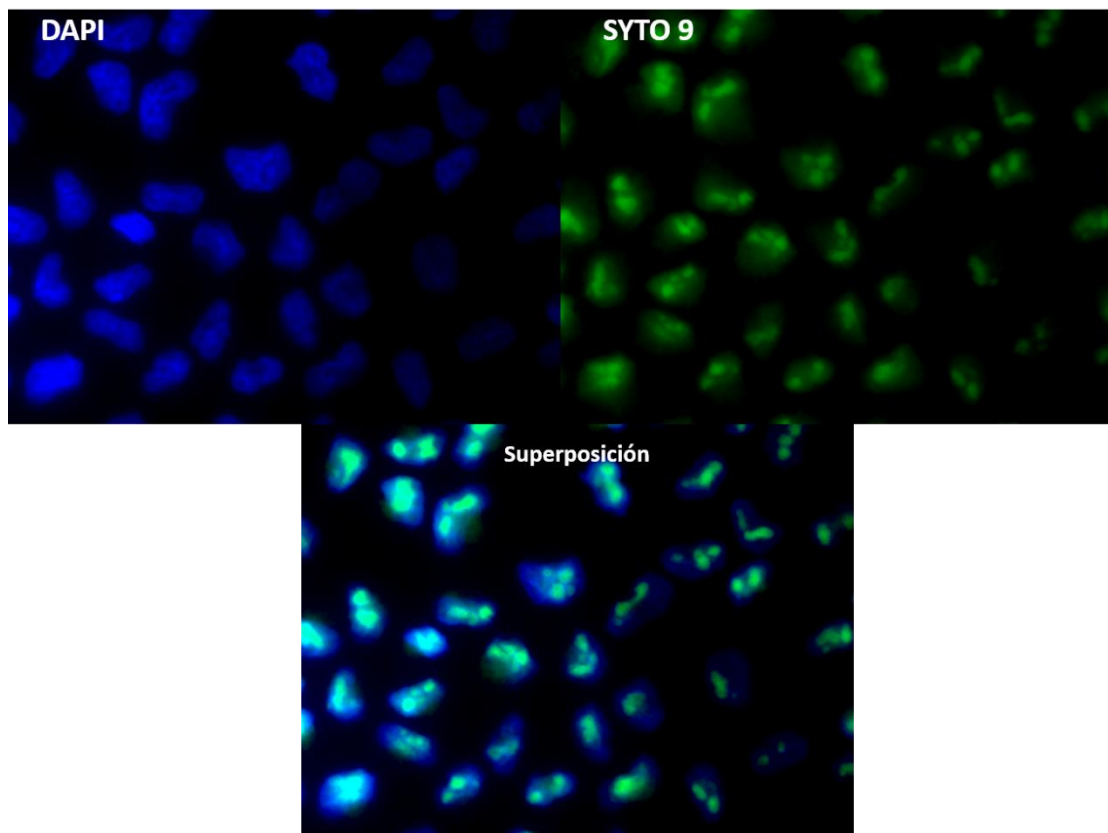


Figura 44. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con DAPI (canal azul) y con SYTO 9 (canal verde). La superposición muestra los organelos teñidos.

Una vez realizado este experimento de control se procedió a realizar los experimentos de co-localización en donde se utilizaron una combinación de tinciones para determinar localización subcelular de los fotosensibilizadores (canal rojo). En un set de experimentos se utilizaron SYTO 9 y WGA-Alexa 350 más los sistemas de estudio para observar co-localización de núcleo y membrana plasmáticas; en el otro set de experimentos se utilizaron la combinación de SYTO 9 y Mitopainter Blue más los sistemas de estudios para observar co-localización de núcleo y mitocondrias. Como se puede observar en las figuras 45-47 (anexos 31-36). Cuando se realizaron los experimentos de co-localización tanto para el TBO⁺ como los derivados TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 solos y transportados por los diferentes sistemas estudiados las imágenes de microscopía de fluorescencia demuestran cuando se hace la superposición de los diferentes canales que se localizan preferentemente en las mitocondrias, como ha sido reportado anteriormente para compuestos de esta familia.[151] De igual manera, se puede observar en las imágenes de microscopia de fluorescencia utilizando WGA-Alexa 350 que los mismo también se pueden localizar, en menor proporción, en otros organelos dentro de la célula como lo son el Aparato de Golgi o el Retículo Endoplasmático como ha sido reportado previamente para el TBO⁺. [27] Los sistemas comparando tanto el TBO⁺ como los derivados TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 cuando son transportados por medio del complejo biosupramolecular correspondiente se presentan en las figuras 45-46 para el TBO⁺ y 47 para el TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14. El resto de los sistemas de transporte sus imágenes de microscopia se presentan en los anexos 31-32, 33-34 y 35-36 para el TBO⁺, TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14, respectivamente.

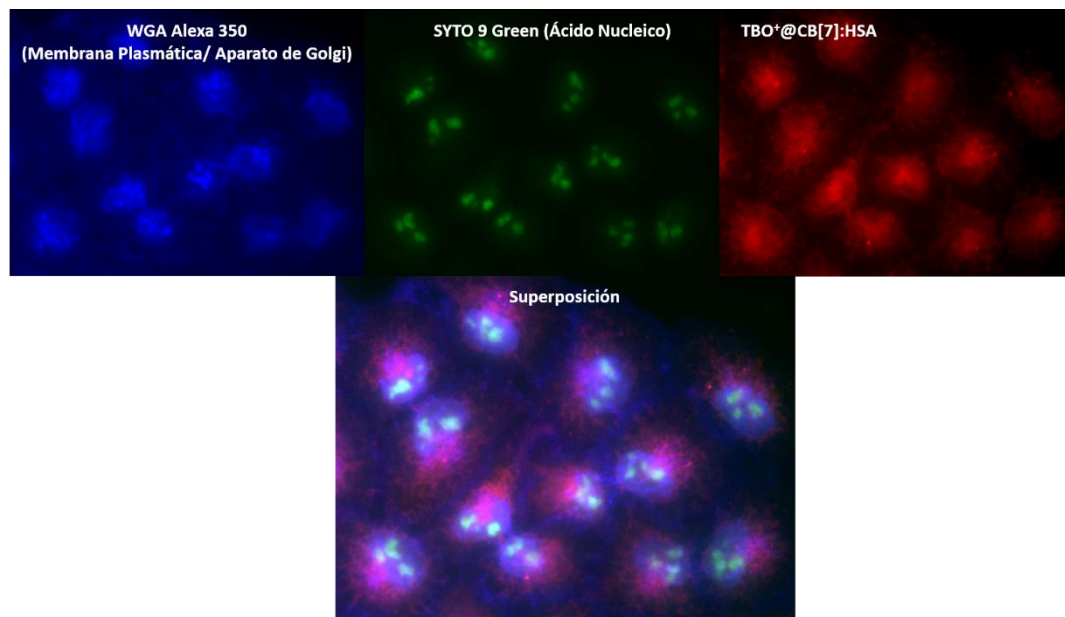


Figura 45. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con WGA-Alexa 350 (canal azul), SYTO 9 (canal verde) y la incorporación de TBO⁺ 0.4 μ M (canal rojo) por medio del sistema de transporte de CB[7] 50 μ M y HSA 15 μ M (TBO⁺@CB[7]:HSA). La superposición de los canales muestra en morado la localización subcelular del TBO⁺.

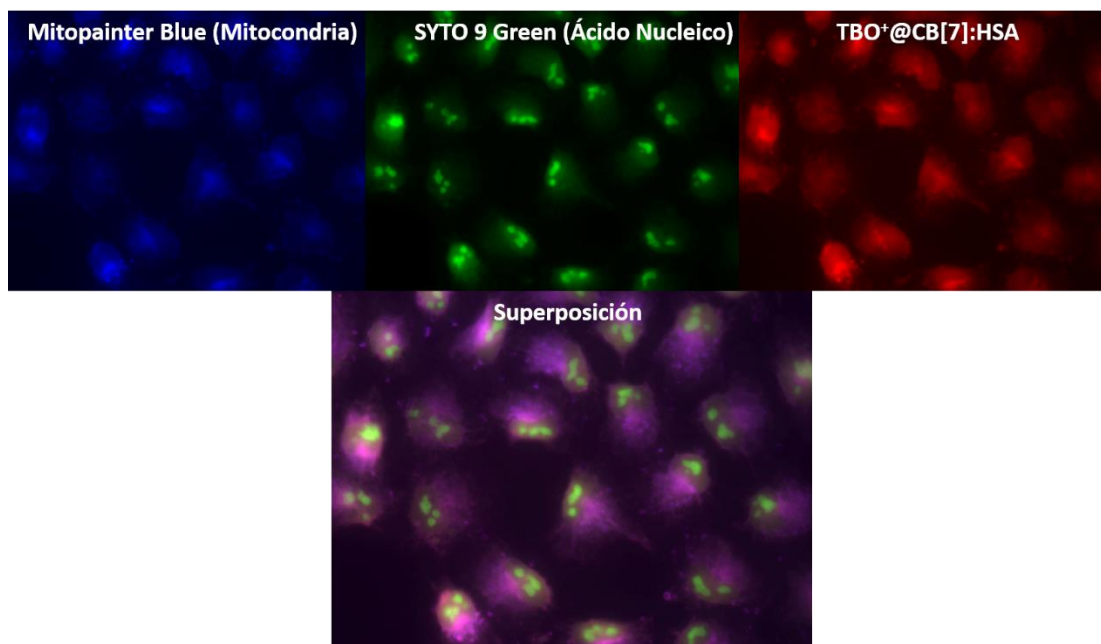


Figura 46. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con Mitopainter Blue (canal azul), SYTO 9 (canal verde) y la incorporación de TBO⁺ 0.4 μ M (canal rojo) por medio del sistema de transporte de CB[7] 50 μ M y HSA 15 μ M (TBO⁺@CB[7]:HSA). La superposición de los canales muestra en morado la localización subcelular del TBO⁺.

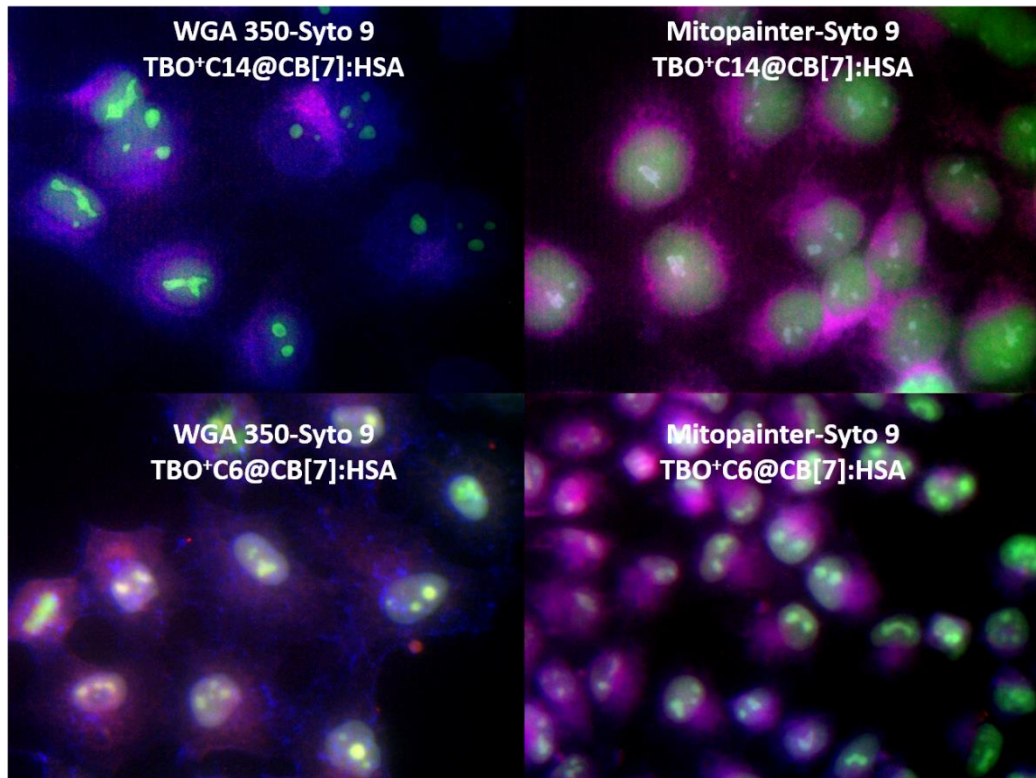


Figura 47. (Izquierda) Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con WGA Alexa 350 (canal azul), SYTO 9 (canal verde) y la incorporación de TBO⁺-C14 0.4 μ M (canal rojo, arriba) y TBO⁺-C6 0.4 μ M (canal rojo, abajo), por medio del sistema de transporte de CB[7] 50 μ M y HSA 15 μ M (TBO⁺-C14@CB[7]:HSA, arriba) y (TBO⁺-C6@CB[7]:HSA, abajo). (Derecha) Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con Mitopainter Blue (canal azul), SYTO 9 (canal verde) y la incorporación de TBO⁺-C14 0.4 μ M (canal rojo, arriba) y TBO⁺-C6 0.4 μ M (canal rojo, abajo), por medio del sistema de transporte de CB[7] 50 μ M y HSA 15 μ M (TBO⁺-C14@CB[7]:HSA, arriba) y (TBO⁺-C6@CB[7]:HSA, abajo). La superposición de los canales muestra en morado la localización subcelular del TBO⁺-C14 (arriba) y TBO⁺-C6 (abajo).

3.13. Incorporación de los fotosensibilizadores por los diferentes sistemas de transporte

Se construyeron curvas de calibración para poder cuantificar la cantidad de fotosensibilizador que era incorporado solo y utilizando los diferentes sistemas de transportes. Estas curvas de calibrado fueron construidas por medio de los espectros de emisión de fluorescencia de soluciones del TBO^+ y del $\text{TBO}^+\text{-C14}$ de concentraciones conocida para cuantificarlos respectivamente, para cuantificar los picomoles de fotosensibilizador por millón de células que eran incorporados por cada uno de los sistemas, en 90 minutos de incorporación de acuerdo con nuestro protocolo experimental. Como se mostró en la sección 3.4, haciendo referencia a los estudios de las propiedades fotofísicas, el $\text{TBO}^+\text{-C6}$ presentó baja fluorescencia y tiempos de vida de fluorescencia muy cortos, por lo cual no se pudo construir una curva de calibrado para cuantificar la incorporación de este.

En la figura 48 se presenta los datos obtenidos de los experimentos de incorporación de los fotosensibilizadores solos y cuando se utilizan los diferentes sistemas de transporte para el TBO^+ y el $\text{TBO}^+\text{-C14}$. Se observa que en ambos casos los fotosensibilizadores se incorporan cantidades similares cuando se incorporan solos o con sus respectivos complejos de inclusión con el CB[7]. Se puede observar que el TBO^+ solo se incorporó 51.46 ± 1.26 picomoles / 10^6 células mientras que con el sistema $\text{TBO}^+\text{@CB[7]}$ incorporaban 59.84 ± 2.63 picomoles / 10^6 células del fotosensibilizador. El $\text{TBO}^+\text{-C14}$ y el $\text{TBO}^+\text{-C14@CB[7]}$ se incorporó 73.33 ± 3.36 picomoles / 10^6 células y cuando se utiliza el complejo de inclusión se incorporaron 65.76 ± 0.84 picomoles / 10^6 células del derivado. Es interesante destacar que, para ambos compuestos, el complejo biosupramolecular presentó mayor incorporación, pero que la mayor incorporación se obtuvo con el aducto con la proteína. Cuando se utilizó como sistema de transporte el complejo biosupramolecular $\text{TBO}^+\text{@CB[7]:HSA}$ se incorpora 66.22 ± 10.89 picomoles /

10^6 células del TBO⁺ mientras que con el sistema de transporte del complejo biosupramolecular TBO⁺-C14@CB[7]:HSA se puede observar en la figura 48 que se incorporaron 117.50 ± 39.96 picomoles / 10^6 células del derivado TBO⁺-C14. En este último sistema de transporte al derivatizar para incrementar la hidrofobicidad del fotosensibilizador se incorpora aproximadamente dos veces más fotosensibilizador que el complejo biosupramolecular del fotosensibilizador sin derivatizar. Cuando se utilizan los sistemas de transporte constituidos por los aductos denotados como TBO⁺:HSA y TBO⁺-C14:HSA se incorporaron 137.92 ± 7.56 picomoles / 10^6 células y 351.44 ± 71.86 picomoles / 10^6 células del fotosensibilizador respectivamente. Al comparar el sistema de transporte de los aductos con HSA para los dos fotosensibilizadores se observa en la figura 48 que con la derivatización del fotosensibilizador se logra incorporar aproximadamente 2.5 veces más fotosensibilizador que el respectivo sistema sin derivatizar. Al realizar la comparación entre todos los sistemas de transportes utilizados para los dos fotosensibilizadores se observa diferencias significativas en la cantidad de picomoles de PS incorporado por millón de células para el aducto del TBO⁺-C14:HSA versus todos los sistemas siendo el sistema que más fotosensibilizador incorpora. Por lo anteriormente expuesto, la derivatización del TBO⁺ para incrementar su hidrofobicidad ha favorecido sus interacciones con la HSA que se ven reflejados en una mayor incorporación del derivado con respecto al TBO⁺.

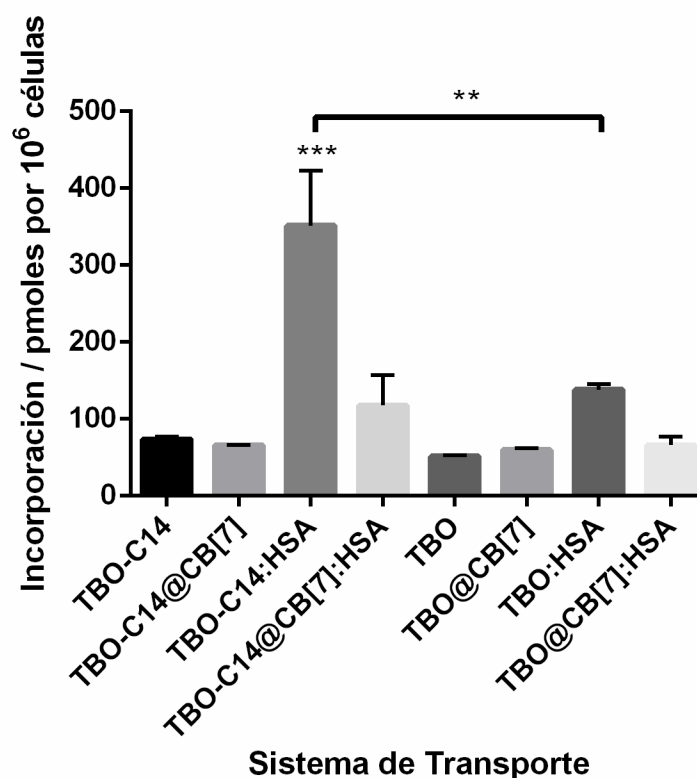


Figura 48. Estudios de incorporación del TBO⁺ y del derivado TBO⁺-C14 solos y con los diferentes sistemas de transporte a 90 minutos de incorporación. (Izquierda) TBO⁺-C14 0.4 μ M solo y con los diferentes sistemas de transporte, en presencia de CB[7] 50 μ M (TBO⁺-C14@CB[7]), CB[7] 50 μ M y HSA 15 μ M (TBO⁺-C14@CB[7]:HSA) y HSA 15 μ M (TBO⁺-C14:HSA). (Derecha) TBO⁺ 0.4 μ M solo y con los diferentes sistemas de transporte, en presencia de CB[7] 50 μ M (TBO⁺@CB[7]), CB[7] 50 μ M y HSA 15 μ M (TBO⁺@CB[7]:HSA) y HSA 15 μ M (TBO⁺:HSA).

3.14. Estudio del efecto fototóxico de los fotosensibilizadores en los diferentes sistemas de transporte en células HeLa cultivadas *in vitro*

Como se demostró que los fotosensibilizadores solos o con los diferentes sistemas de transporte se incorporan a las células tumorales HeLa cultivadas *in vitro* se decidió explorar la fototoxicidad cuando se utiliza un tiempo de incorporación de cinco minutos e irradiar por noventa minutos para explorar si a tiempos cortos de incorporación su efecto fototóxico era considerable y cual

sistema de transporte era más eficiente a estos tiempos. En la figura 49 se reporta el efecto fototóxico de los diferentes sistemas de transporte a cinco minutos de incorporación. Al comparar los diferentes sistemas irradiados se puede observar que las mayores diferencias significativas se observan en las células que fueron sometidas a los sistemas de transporte del complejo de inclusión $\text{TBO}^+@\text{CB}[7]$ y el del sistema del aducto $\text{TBO}^+:\text{HSA}$, en estas células la viabilidad celular posterior a la irradiación fue de $90.98\% \pm 5.23\%$ y $80.96\% \pm 4.76\%$ respectivamente, en comparación con las células donde solamente fue incorporado el TBO^+ en donde la viabilidad celular de las mismas fue de $103.44\% \pm 8.98\%$. En este experimento el mayor efecto fototóxico es el del aducto $\text{TBO}^+:\text{HSA}$, ya que como se pudo observar en el experimento de incorporación incorpora más fotosensibilizador con respecto al fotosensibilizador solo o cuando se utiliza el sistema de transporte del complejo de inclusión. En cuanto al complejo de inclusión $\text{TBO}^+@\text{CB}[7]$ considerando la constante de asociación reportada anteriormente de $(5.5 \pm 0.6) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ determinada por fluorescencia[126] y $(5.3 \pm 0.9) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ determinada por ITC, a estas condiciones experimentales el fotosensibilizador en este tiempo de incorporación aún se debería encontrar formando un complejo de inclusión con el $\text{CB}[7]$, por lo cual su efecto fototóxico debe ser superior al TBO^+ solo de acuerdo con sus valores de rendimiento cuántico de oxígeno singlete.[126]

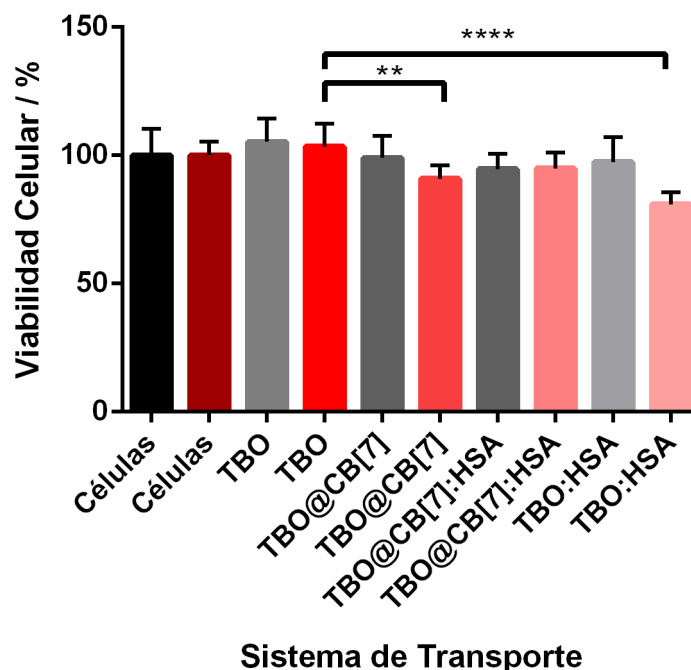


Figura 49. Estudios de fototoxicidad del TBO⁺ solo y con los diferentes sistemas de transporte. Los sistemas fueron incorporados durante 5 minutos e irradiados durante 90 minutos. Barras oscuras controles en oscuro y barras en rojo muestras irradiadas. TBO⁺ 0.4 μ M solo y con los diferentes sistemas de transporte, en presencia de CB[7] 50 μ M (TBO⁺@CB[7]), CB[7] 50 μ M y HSA 15 μ M (TBO⁺@CB[7]:HSA) y HSA 15 μ M (TBO⁺:HSA).

El siguiente experimento que se realizó fue el estudio de la fototoxicidad del fotosensibilizador TBO⁺ solo y con la utilización de los diferentes sistemas de transporte para el fotosensibilizador, en donde se utilizó un tiempo de incorporación de noventa minutos y con un tiempo de irradiación de noventa minutos cuyos resultados se presentan en la figura 50. En esta figura se puede observar que la viabilidad celular de las células HeLa cultivadas *in vitro*, luego de ser irradiadas, posterior a la incorporación del fotosensibilizador por medio de los diferentes sistemas de transporte fue de 32.06% $\pm$ 17.36% para las células tratadas con el complejo biosupramolecular TBO⁺@CB[7]:HSA, 35.52% $\pm$ 15.46% para el aducto TBO⁺:HSA, 71.83% $\pm$ 3.05% para las células tratadas con el complejo de inclusión TBO⁺@CB[7] y 82.88% $\pm$ 8.38% para las células

tratadas con TBO⁺. En este experimento se puede observar que las diferencias significativas se presentan entre las células a las cuales se les incorporó el fotosensibilizador TBO⁺ por medio de los sistemas de transporte del complejo biosupramolecular y el aducto con la proteína y cuando se incorporó el TBO⁺ solo. En las células donde el fotosensibilizador fue incorporado por los sistemas de transporte del complejo biosupramolecular y el aducto con la proteína ambos presentan un efecto fototóxico similar. En este experimento se puede observar que el efecto en la viabilidad de las células HeLa cultivadas in vitro después de ser sometidas a irradiación durante noventa minutos es similar a pesar que el sistema de transporte constituido por el aducto con la proteína TBO⁺:HSA incorpore 137.92 ± 7.56 picomoles / 10^6 células del fotosensibilizador TBO⁺ con respecto a los 66.22 ± 10.89 picomoles / 10^6 células del fotosensibilizador TBO⁺ que son incorporados por el complejo biosupramolecular TBO⁺@CB[7]:HSA, es decir que el aducto con la proteína incorpora dos veces más fotosensibilizador que el sistema de transporte del complejo biosupramolecular. El hecho de que ambos sistemas presenten el mismo efecto fototóxico puede deberse a que ha sido reportado que las proteínas pueden desactivar el estado excitado del fotosensibilizador y de igual manera pueden desactivar al oxígeno singlete que se genere cercano a ellas.[58] El que el complejo biosupramolecular se comporte como el mejor sistema de transporte ya que incorpora menor cantidad de fotosensibilizador que el aducto con proteína, pero tiene el mismo efecto fototóxico se podría deber a un efecto protector del CB[7] en las propiedades fotoquímicas.

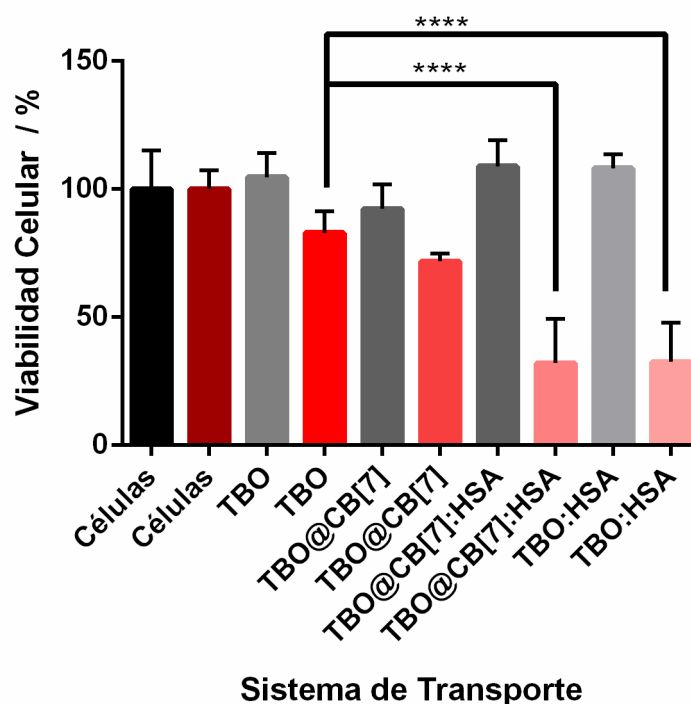


Figura 50. Estudios de fototoxicidad del TBO⁺ solo y con los diferentes sistemas de transporte. Los sistemas fueron incorporados durante 90 minutos e irradiados durante 90 minutos. Barras oscuras controles en oscuro y barras en rojo muestras irradiadas. TBO⁺ 0.4 μ M solo y con los diferentes sistemas de transporte, en presencia de CB[7] 50 μ M (TBO⁺@CB[7]), CB[7] 50 μ M y HSA 15 μ M (TBO⁺@CB[7]:HSA) y HSA 15 μ M (TBO⁺:HSA).

Es importante resaltar que en el laboratorio se han realizado estudios de fototoxicidad en células HeLa cultivadas *in vitro* en los cuales se ha utilizado el TBO⁺ a una concentración de 5 μ M y se observó el mismo efecto que se está reportando para el fotosensibilizador solo a una concentración de 0.4 μ M, lo que indica que al incrementar la concentración del mismo producto de la incorporación inespecífica a los organelos y que gran parte del fotosensibilizador se queda en la membrana plasmática este genera algún tipo de efecto filtro que minimiza el efecto fototóxico del TBO⁺. [152]

Darzyniewicz y Carter en 1988 publicaron un estudio en donde ellos observaron que a una concentración de $0.67 \mu\text{M}$ de TBO^+ , este ejercía un efecto citotóxico sobre células de cáncer epidermoide A-253 cultivadas *in vitro*. A esta concentración el TBO^+ presentaba un efecto menor al 12% en su toxicidad en oscuro. En sus condiciones experimentales los cultivos de células A-253 fueron irradiadas con luz visible de lámparas fluorescentes con una intensidad de $0.32 \text{ mW} / \text{cm}^2$ por un tiempo de 5 a 120 minutos. Ellos observaron una disminución en la viabilidad celular, medida por medio de la clonogenicidad, de un 90% en las células A-253 con tan solo $1 \text{ J} / \text{cm}^2$ de luz. A concentraciones equimolares ellos reportaron que el TBO^+ presentaba un efecto mayor que la pironina Y, rodamina 123 y la merocianina 540 para reducir la viabilidad celular.[151]

Tremblay y colaboradores reportaron que el TBO^+ en concentraciones de $0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0.49 \mu\text{M}$) y $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1.63 \mu\text{M}$) cuando era incorporado durante una hora en líneas celulares de leucemia humana T (células Jurkart) e irradiadas con una intensidad de $11 \text{ J} / \text{cm}^2$ de luz blanca entre 400 a 800 nm con un máximo en 480 nm de acuerdo con lo reportado. Ellos observaron una disminución del 97% de la densidad óptica en las células tratadas con ambas concentraciones de TBO^+ e irradiadas versus sus respectivos controles en oscuro a 24 horas de realizado el experimento en el ensayo de MTT. Los controles en oscuros de las células a las cuales se les adicionó $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1.63 \mu\text{M}$) TBO^+ presentaron una disminución de la densidad óptica del 32% a un tiempo de 24 horas después de iniciado el experimento de PDT en el ensayo de MTT, motivo por el cual ellos continuaron sus otros experimentos con concentraciones de $0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0.49 \mu\text{M}$) de TBO^+ para los experimentos de irradiación y sus respectivos controles en oscuro. [27]

De igual manera Blázquez-Castro y colaboradores reportaron un estudio donde compararon la utilización de concentraciones equimolares de 10^{-7} a 10^{-5} M de azul de metileno (MB^+) y el TBO^+ para aplicaciones en PDT donde

realizaron estudios en cultivo celulares de células de Pam 212 (espontáneamente inmortalizados queratinocitos de ratón) y HeLa en donde incorporaron los fotosensibilizadores a las concentraciones de trabajo durante 1 hora con tiempos de irradiación de 5 minutos, 10 minutos y 15 minutos con luz roja proporcionada por un arreglo de 384 luces LED, a una distancia de 1.5 cm de las placas de 96 pocillos, con un máximo de emisión a 636 nm y con una intensidad de 6 mW / cm² . Ellos observaron que no había una diferencia significativa en ambas líneas celulares tratadas con concentraciones de 10⁻⁷ a 10⁻⁶ M en los experimentos de irradiación en comparación con sus respectivos controles en oscuro con los dos fotosensibilizadores a 24 horas después del experimento de PDT en el ensayo de MTT. Las diferencias significativas fueron observadas para ambos fotosensibilizadores en concentraciones de 10⁻⁵ M y este efecto era dependiente de la dosis de luz utilizada. Este efecto era más notorio en las células tratadas con TBO⁺, ya que cada incremento en el tiempo de irradiación resultaba en mayor pérdida de la viabilidad celular. La muerte celular fue reportada como un 19% después de 5 minutos de irradiación, 26% después de 10 minutos y 72% después de 15 minutos de irradiación con luz roja en las células Pam 212 tratadas con TBO⁺. En cuanto a las células HeLa cuando fueron sometidos a los experimentos de PDT con TBO⁺ a la concentración de 10⁻⁵ M e irradiado con luz roja se observaba la inducción de muerte celular 24 horas después de realizado el experimento en el ensayo de MTT. La muerte celular reportada fue de 9% luego de 5 minutos de irradiación, pero con diferencias significativas luego de 10 y 15 minutos de irradiación en los cuales observaron porcentajes de muerte celular de 58% y 70% respectivamente para estos tiempos de irradiación.[125]

Es importante destacar que los resultados obtenidos, al igual que los antecedentes en la literatura, demuestran claramente que el efecto fototóxico es dependiente de la concentración del fotosensibilizador y de la dosis de luz utilizada en los experimentos. En el laboratorio utilizando como referencia los mismos protocolos de trabajo en los experimentos de fototoxicidad en células

HeLa cultivadas *in vitro* al comparar la intensidad de luz absorbida por el TBO⁺ a las concentraciones de 0.4 μM y 5 μM , para el primero la intensidad de luz absorbida fue de 0.492 J / cm^2 y para el último 5.022 J / cm^2 , se puede observar que el primero la viabilidad reportada en la figura 50 fue de 82.88% $\pm$ 8.38% para las células tratadas con TBO⁺, mientras que cuando se utilizó la concentración de 5 μM en los experimentos la viabilidad celular reportada fue de 67.69% $\pm$ 2.95%.[152] A esta última concentración las células del control en oscuro, a 24 horas de realizado el experimento ya demostraron una disminución en la viabilidad celular de aproximadamente un 8% en el ensayo de MTT,[152] mientras que a una concentración de 0.4 μM este efecto en la disminución de la viabilidad celular en el control en oscuro no fue observado. En los estudios realizados por Blázquez-Castro y colaboradores cuando reportaron sus resultados de los experimentos de fototoxicidad en células HeLa cultivadas *in vitro* utilizando una concentración de TBO⁺ de 10^{-5} M ellos observaron que el efecto fototóxico era dependiente del tiempo de irradiación en donde la muerte celular reportada fue de 9% luego de 5 minutos de irradiación con una intensidad de luz absorbida de 1.083 J / cm^2 . Al incrementar los tiempos de irradiación observaron diferencias significativas luego de 10 minutos y una intensidad de luz absorbida de 2.167 J / cm^2 reportaron una muerte celular de 58%, y finalmente luego de 15 minutos de irradiación y una intensidad de luz absorbida de 3.250 J / cm^2 la muerte celular reportada fue de un 70%.[125]

Otras diferencias en los resultados reportados en la literatura tienen relación al tipo de cultivo celular utilizado. Cuando se realizaron estudios de fototoxicidad en células de cáncer epidermoide A-253 cultivadas *in vitro* con una concentración de TBO⁺ 0.67 μM , en su diseño experimental la intensidad de luz absorbida por el TBO⁺ fue de 0.0598 J / cm^2 , para este tipo de células fue suficiente para generar un efecto fototóxico del 90% de la disminución de la viabilidad celular, pero con una reducción de la viabilidad celular de 12% del correspondiente control en oscuro a esa concentración.[151] De igual manera,

cuando Tremblay y colaboradores reportaron el efecto fototóxico del TBO⁺ a una concentración de 0.15 µg mL⁻¹ (0.49 µM) en cultivos celulares de leucemia humana de células T (células Jurkat) la intensidad de luz absorbida fue de 0.485 J / cm² con una disminución del 97% de la densidad óptica en las células tratadas, pero de igual manera a concentraciones superiores de 0.5 µg mL⁻¹ (1.63 µM) TBO⁺ observaron el mismo efecto fototóxico en donde la intensidad de luz absorbida por el TBO⁺ fue de 1.533 J / cm², pero con una notable disminución de la densidad óptica del 32% del respectivo control en oscuro.[27] El efecto fototóxico del TBO⁺ a una concentración de 10⁻⁵ en células Pam 212, era dependiente del tiempo de irradiación en donde la intensidad de luz absorbida por el TBO⁺ de 1.083 J / cm² después de 5 minutos de irradiación con luz roja reportaron una muerte celular del 19%, cuando la intensidad de luz absorbida era de 2.167 J / cm² después de 10 minutos la muerte celular reportada fue de 26% y después de 15 minutos de irradiación en donde la intensidad de luz absorbida fue de 3.250 J / cm² la muerte celular reportada fue de 72%.[125]

Para evaluar si la derivatización del TBO⁺ para incrementar su hidrofobicidad, además de incrementar la incorporación del fotosensibilizador, esta presentaba alguna diferencia en el efecto fototóxico en células HeLa cultivadas *in vitro*, se realizaron los experimentos de fototoxicidad correspondientes. En estos experimentos de fototoxicidad se utilizó las mismas condiciones experimentales de noventa minutos de incorporación y noventa minutos de irradiación para luego evaluar el efecto fototóxico inducido por el TBO⁺-C14 y TBO⁺-C6 solos y al ser incorporados por los diferentes sistemas de transporte. En la figura 51 se puede observar el estudio de fototoxicidad de derivado TBO⁺-C14, al comparar la viabilidad celular de las células HeLa después de ser sometidas a los experimentos de irradiación no se observaron diferencias significativas entre los sistemas irradiados, pero con los respectivos controles en oscuro se pueden ver diferencias significativas entre todos los sistemas de transporte utilizados. El que presenta la mayor diferencia significativa fueron

las células en las cuales se incorporó el fotosensibilizador utilizando sistema de transporte del aducto con la proteína, en donde las células del control en oscuro presentaron una viabilidad celular de $106.93\% \pm 9.63\%$ y la viabilidad celular de las células irradiadas fue de $80.75\% \pm 7.40\%$. Los siguientes sistemas que presentaron mayor diferencias significativas en la viabilidad entre las células de control en oscuro y las células irradiadas fueron aquellas donde se incorporó el derivado TBO⁺-C14 solo y cuando se utilizó como sistema de transporte el complejo de inclusión TBO⁺-C14@CB[7]. En el primer sistema la viabilidad celular de las células del control en oscuro fue de $95.88\% \pm 5.95\%$ en comparación con la viabilidad celular de las células irradiadas que fue de $76.25\% \pm 2.70\%$. En cuanto a las células en las cuales se utilizó como sistema de transporte para incorporar el fotosensibilizador el complejo de inclusión constituido por TBO⁺-C14@CB[7], en este las células del control en oscuro presentaron una viabilidad celular de $98.93\% \pm 2.60\%$ mientras que las células irradiadas presentaron una viabilidad celular de $76.34\% \pm 3.19\%$. Las células en las cuales se utilizó como sistema de transporte para incorporar el fotosensibilizador el complejo biosupramolecular TBO⁺-C14@CB[7]:HSA fue el que presentó la menor diferencia, ya que las células del control en oscuro presentaron una viabilidad celular de 99.98 ± 7.07 mientras que las células irradiadas presentaron una viabilidad celular de $86.49\% \pm 3.98\%$.

En la figura 52 se puede observar los resultados obtenidos para los estudios de fototoxicidad del derivado TBO⁺-C6 solo y cuando fue incorporado por los diferentes sistemas de transporte, en donde no se observaron diferencias significativas entre los sistemas irradiados o al compararlos con los respectivos controles en oscuro. En vista de los resultados obtenidos en las propiedades fotofísicas y que su capacidad de generación de oxígeno singlete se ve reducida en un 97% con la derivatización, cuando la muestra fue evaluada en acetonitrilo como solvente, se puede deducir que el derivado ha disminuido sustancialmente su rendimiento cuántico de oxígeno singlete y por consiguiente su efecto fototóxico.

Wang et al. en el 2016 publicaron un estudio de aplicaciones para PDT y para imágenes en el cáncer en donde reportaron el uso de un derivado de TBO⁺-Biotina, en su diseño experimental la concentración mínima que utilizaron de su derivado fue de 4 μ M para los experimentos de fototoxicidad en donde demostraron la incorporación del derivado solo y encapsulado en CB[8] luego de una hora de incubación de los mismos por medio de microscopía confocal con la ayuda de la tinción con Hoerscht 33342 para teñir el núcleo. En ambos sistemas utilizados la viabilidad celular de las células SCC-7 (células escamosas de carcinoma) después de irradiar con lámparas LED a una longitud de onda de 630 nm con una intensidad de 30 mW / cm² por 1 minuto fue de aproximadamente un 60%. En nuestros sistemas aunque el efecto fototóxico no es el más notable, hemos logrado incorporar eficientemente y generar un efecto citotóxico considerable utilizando bajas concentraciones en las células HeLa cultivadas *in vitro* con nuestros sistemas de transporte.[153]

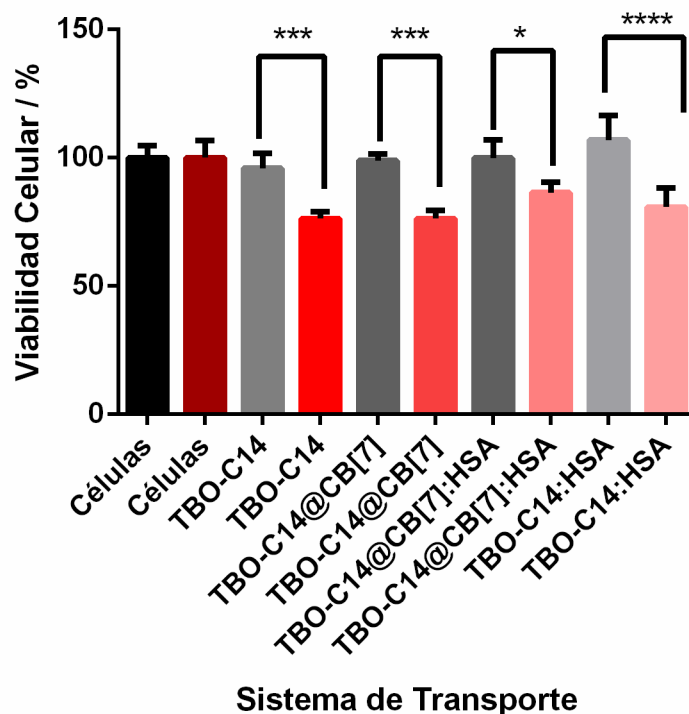


Figura 51. Estudios de fototoxicidad del TBO⁺-C14 solo y con los diferentes sistemas de transporte. Los sistemas fueron incorporados durante 90 minutos e irradiadas durante 90 minutos. Barras oscuras controles en oscuro y barras en rojo muestras irradiadas. TBO⁺-C14 0.4 μ M solo y con los diferentes sistemas de transporte, en presencia de CB[7] 50 μ M (TBO⁺-C14@CB[7]), CB[7] 50 μ M y HSA15 μ M (TBO⁺-C14@CB[7]:HSA) y HSA 15 μ M (TBO⁺-C14:HSA).

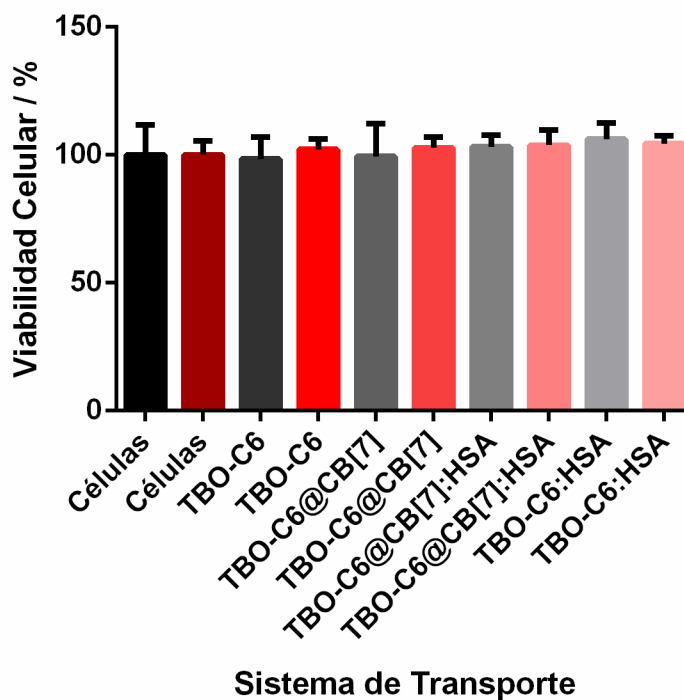


Figura 52. Estudios de fototoxicidad del TBO⁺-C6 solo y con los diferentes sistemas de transporte. Los sistemas fueron incorporados durante 90 minutos e irradiados durante 90 minutos. Barras oscuras controles en oscuro y barras en rojo muestras irradiadas. TBO⁺-C6 0.4 μ M solo y con los diferentes sistemas de transporte, en presencia de CB[7] 50 μ M (TBO⁺-C6@CB[7]), CB[7] 50 μ M y HSA 15 μ M (TBO⁺-C6@CB[7]:HSA) y HSA 15 μ M (TBO⁺-C6:HSA).

3.15. Incorporación de los fotosensibilizadores versus efecto fototóxico de los fotosensibilizadores en los diferentes sistemas de transporte en células HeLa cultivadas *in vitro*

Al comparar la incorporación del fotosensibilizador por los diferentes sistemas de transporte para el TBO⁺ y el derivado TBO⁺-C14, en la figura 48 se reportó que para ambos sistemas se incorporaba mayor cantidad de fotosensibilizador en el aducto con la proteína, seguido por el complejo biosupramolecular, y en ambos casos también la incorporación por el fotosensibilizador solo o encapsulado en CB[7] era similar con respecto al correspondiente

fotosensibilizador solo.

En el experimento de fototoxicidad reportado en la figura 50, se puede observar que las diferencias significativas se dan entre los sistemas de transporte del aducto $\text{TBO}^+:\text{HSA}$ y el complejo biosupramolecular $\text{TBO}^+@\text{CB}[7]:\text{HSA}$ en comparación con la incorporación del fotosensibilizador TBO^+ solo en las células irradiadas. A pesar de que el aducto con la proteína incorporaba aproximadamente 3 veces más fotosensibilizador y el complejo biosupramolecular incorporaba 1.3 veces más fotosensibilizador que el TBO^+ solo, interesantemente los dos sistemas de transporte presentaban el mismo efecto fototóxico.

Se ha reportado que las células epiteliales como las células HeLa presentan receptores específicos en las membranas externas para albuminas que ayudan a la internacionalización cuando se utiliza este sistema de transporte.[154, 155] Estos receptores sería la causa primordial de la mayor incorporación de fotosensibilizador observado en estos experimentos y reportado en la figura 48. En cuanto al complejo biosupramolecular, la interacción entre el complejo de inclusión $\text{TBO}^+@\text{CB}[7]$ con la HSA para formar el complejo biosupramolecular incorpora dos veces menos fotosensibilizador al ser comparado con el aducto $\text{TBO}^+:\text{HSA}$, esto es debido a la falta de especificidad en la incorporación del fotosensibilizador.

La cantidad de fotosensibilizador incorporado y la localización son factores importantes en el efecto fototóxico en los experimentos de PDT. En esta tesis se reportó que independientemente del sistema de transporte utilizado los fotosensibilizadores se localizaban preferentemente en las mitocondrias, por lo cual el organelo donde se localiza el fotosensibilizador no es el factor responsable del mismo efecto fototóxico.

Se ha discutido en la literatura que el fotosensibilizador TBO^+ no ingresa a las células en su forma catiónica, sino en su forma reducida leuco- TBO^+ .[156] Esta reducción es atribuida a la presencia de enzimas con actividad reductasa en la parte externa de la membrana plasmática. Se ha propuesto que la

interacción del TBO⁺ con la enzima NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) genera la forma leuco-TBO⁺ y esta es internalizada por difusión, ya que carece de carga positiva.[157] Una vez incorporada en la célula esta forma leuco-TBO⁺ se oxida para generar el fotosensibilizador TBO⁺. Este reciclaje genera especies reactivas de oxígeno a expensas del potencial reductor de las células. El TBO⁺ participa eficientemente de este ciclo entre su forma oxidada y reducida, lo cual le permite generar mayor estrés oxidativo.[157]

El aducto TBO⁺:HSA tiene una constante de asociación de $(4 \pm 1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (ver tabla 8), a las condiciones experimentales de esta tesis la HSA se encuentra en gran exceso para formar aductos con estequiometría 1:1, por lo cual este sistema protege al TBO⁺ de la actividad reductasa evitando el reciclaje entre la forma reducida y oxidada. Este sistema de transporte utiliza la ayuda de los receptores específicos en las membranas externas para la internalización del fotosensibilizador,[154, 155] lo cual permite que sea el mejor sistema de transporte para la incorporación del TBO⁺. García y colaboradores en un estudio de PDT con ftalocianinas de zinc transportadas por la proteína albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés), en células tumorales HeLa cultivadas *in vitro*, observaron que el aducto era estable y el fotosensibilizador se mantenía dentro de la BSA, ya que las propiedades de fluorescencia eran la misma en solución y después de ser incorporado en las células HeLa, lo cual era consistente con que las ftalocianinas de zinc se encontrarán todavía durante su desarrollo experimental formando un aducto con la BSA.[121] De acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis, esto podría explicar porque, aunque el aducto con la proteína incorpore más fotosensibilizador su efecto fototóxico sea similar al del complejo biosupramolecular. El fotosensibilizador puede estar todavía formando un aducto con la HSA en estas condiciones experimentales, y se ha reportado que la generación de especies reactivas de oxígeno y el estado excitado de fotosensibilizadores puede ser desactivado

por la HSA.

El complejo biosupramolecular $\text{TBO}^+@\text{CB}[7]:\text{HSA}$, a pesar de incorporar menor cantidad de fotosensibilizador que el aducto con la proteína $\text{TBO}^+:\text{HSA}$, presenta un efecto fototóxico similar. Este resultado lo convierte en el mejor sistema de transporte en esta tesis, ya que lo deseable en la PDT es mayor fototoxicidad que mayor incorporación en las células tumorales. La combinación del complejo de inclusión del $\text{TBO}^+@\text{CB}[7]$ con la interacción con la HSA, para la formación del complejo biosupramolecular garantiza que el TBO^+ no sea reducido por las enzimas con actividad reductasa, como se ha reportado anteriormente para complejos de inclusión de derivados de TBO^+ . [153] Al incorporar el sistema biosupramolecular el TBO^+ encapsulado en $\text{CB}[7]$, este genera 1.5 veces más oxígeno singlete que el TBO^+ , sin encapsular y a esto podría atribuirse que el efecto fototóxico sea similar al del aducto $\text{TBO}^+:\text{HSA}$, a pesar de que este aducto incorpore 2 veces más fotosensibilizador. Los resultados en esta tesis demuestran que las propiedades fotofísicas y fotoquímicas son influenciadas por la encapsulación con $\text{CB}[7]$. La protección del $\text{CB}[7]$ contra la actividad reductasa, para evitar el ciclo entre la forma reducida y oxidada del TBO^+ , el incremento del tiempo de vida del triplete, el incremento del rendimiento cuántico de oxígeno, la protección contra la fotodegradación del TBO^+ , [126] así como interacciones favorables con la HSA que permiten la incorporación del TBO^+ en este complejo biosupramolecular, claramente demuestran que este es el mejor modelo de sistema de transporte, ya que el efecto fototóxico es similar al aducto a pesar de incorporar menos cantidad de fotosensibilizador.

Capítulo IV.

Conclusiones

- La derivatización del TBO⁺ para incrementar su hidrofobicidad tiene un efecto en las propiedades fotofísicas y fotoquímicas. El rendimiento cuántico de oxígeno singlete en acetonitrilo disminuye, pero en solución amortiguadora es similar. Cambios similares se observan en la fluorescencia de los derivados en ambos solventes. Esto debe ser considerado al momento de preparar derivados hidrofóbicos para incrementar las interacciones con sistemas de transporte macrocíclicos y proteicos.
- La encapsulación en CB[7] incrementa la intensidad de fluorescencia y el rendimiento cuántico de oxígeno singlete, propiedades muy deseables para permitir una mayor detección *in vivo* en el tejido tumoral y un mayor efecto fototóxico en la PDT.
- La derivatización con un ácido graso de catorce átomos de carbonos incrementó la asociación con el CB[7] y la HSA, comparado con el TBO⁺.
- El derivado TBO⁺-C14 fue mejor que el derivado TBO⁺-C6, tanto en sus constantes de asociación con el CB[7] como con la HSA.
- Los sistemas de transporte aumentan considerablemente la incorporación del TBO⁺ y el derivado TBO⁺-C14 en las células tumorales HeLa cultivadas *in vitro*.
- El TBO⁺ y los derivados se localizan preferentemente en las mitocondrias. Se necesitan experimentos adicionales para poder determinar el mecanismo de muerte celular inducido por estos fotosensibilizadores.
- El TBO⁺-C6 no presenta efecto fototóxico, en las condiciones experimentales de esta tesis, mientras que el TBO⁺-C14 presenta una fototoxicidad similar al TBO⁺.
- El TBO⁺ transportado por los sistemas de transporte del aducto TBO⁺:HSA y el complejo biosupramolecular TBO⁺@CB[7]:HSA fue el

fotosensibilizador más eficiente para provocar fototoxicidad en células HeLa cultivadas *in vitro*.

- La HSA como sistema de transporte aumenta la incorporación, pero el uso del CB[7] como sistema de transporte incrementa la fototoxicidad. Podemos concluir que la combinación de ambos sistemas en un complejo biosupramolecular es el mejor sistema de transporte en este estudio.
- La razón de la mayor eficiencia del sistema de transporte del complejo biosupramolecular podría deberse a la existencia de un equilibrio entre las tres especies que lo constituyen. Como son complejos dinámicos se obtendría una mezcla de los sistemas PS:HSA, PS@CB[7] y PS@CB[7]:HSA. En estos equilibrios con la encapsulación del fotosensibilizador en el CB[7] se está incrementando la fototoxicidad, debido a un incremento en la generación de oxígeno singlete. Por otro lado, al estar el TBO⁺ encapsulado en el macrociclo también este tiene un efecto protector sobre la desactivación de los estados excitados por parte de la HSA, contribuyendo a aumentar la fototoxicidad.
- Estos estudios fueron realizados *in vitro*, por lo cual se hace necesario realizar un estudio *in vivo* para estudiar cómo se comportan los sistemas de transporte estudiados.

5. Bibliografía

1. F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, and A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, (2018). 68: p.394-424.
2. J. Bergh, Quo Vadis With Targeted Drugs in the 21st Century? *Journal of Clinical Oncology*, (2009). 27(1): p. 2-5.
3. C. Holohan, S. Van Schaeybroeck, D.B. Longley, and P.G. Johnston, Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, (2013). 13(10): p. 714-726.
4. D. Longley, and P. Johnston, Molecular mechanisms of drug resistance. *The Journal of pathology*, (2005). 205(2): p. 275-292.
5. J. Robinson-Duggon, F. Pérez-Mora, L. Dibona-Villanueva, and D. Fuentealba, Potential Applications of Cucurbit[n]urils Inclusion Complexes in Photodynamic Therapy. *Israel Journal of Chemistry*, (2018). 58(3-4): p. 199-214.
6. P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S.M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B.C. Wilson, and J. Golab, Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, (2011). 61(4): p. 250-281.
7. E. Buytaert, M. Dewaele, and P. Agostinis, Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, (2007). 1776(1): p. 86-107.
8. M.J. Davies, The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, (2005). 1703(2): p. 93-109.
9. A.U. Khan, and M. Kasha, Red Chemiluminescence of Molecular Oxygen in Aqueous Solution. *The Journal of Chemical Physics*, (1963). 39(8): p. 2105-2106.
10. G. H. M. Spectra, and M. Structure, Spectra of Diatomic Molecules. *Van Noshtrand Company New York*, (1950).

11. M.C. DeRosa, and R.J. Crutchley, Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, (2002). 233: p. 351-371.
12. S. Arnold, M. Kubo, and Ogryzlo, E., *Relaxation and reactivity of singlet oxygen*. ACS Publications (1968). cap. 70.
13. P.B. Merkel, R. Nilsson, and D.R. Kearns, Deuterium effects on singlet oxygen lifetimes in solutions. New test of singlet oxygen reactions. *Journal of the American Chemical Society*, (1972). 94(3): p. 1030-1031.
14. R.R. Allison, and C.H. Sibata, Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, (2010). 7(2): p. 61-75.
15. A.E. O'Connor, W.M. Gallagher, and A.T. Byrne, Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, (2009). 85(5): p. 1053-1074.
16. A. Juzeniene, Q. Peng, and J. Moana, Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, (2007). 6(12): p. 1234-1245.
17. M. Dichiaro, O. Prezzavento, A. Marrazzo, V. Pittala, L. Salerno, A. Rescifina, and E. Amata, Recent advances in drug discovery of phototherapeutic non-porphyrinic anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, (2017). 142: p. 459-485.
18. A.P. Castano, T.N. Demidova, and M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, (2004). 1(4): p. 279-293.
19. T.A. Debele, S. Peng, and H.-C. Tsai, Drug carrier for photodynamic cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, (2015). 16(9): p. 22094-22136.
20. X. Li, S. Lee, and J. Yoon, Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*, (2018). 47(4): p. 1174-1188.
21. M. Wilson, T. Burns, J. Pratten, and G. Pearson, Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *Journal of Applied Bacteriology*,

- (1995). 78(5): p. 569-574.
22. M. Wilson, and N. Mia, Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *Journal of oral pathology & medicine*, (1993). 22(8): p. 354-357.
 23. M. Wilson, and C. Yianni, Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by low-power laser light. *Journal of medical microbiology*, (1995). 42(1): p. 62-66.
 24. P. Herlin, J. Marnay, J. Jacob, J. Ollivier, and A. Mandard, A study of the mechanism of the toluidine blue dye test. *Endoscopy*, (1983). 15(01): p. 4-7.
 25. Y.D. Eliezri, The toluidine blue test: an aid in the diagnosis and treatment of early squamous cell carcinomas of mucous membranes. *Journal of the American Academy of Dermatology*, (1988). 18(6): p. 1339-1349.
 26. J.B. Epstein, C. Oakley, A. Millner, S. Emerton, E. van der Meij, and N. Le, The utility of toluidine blue application as a diagnostic aid in patients previously treated for upper oropharyngeal carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, (1997). 83(5): p. 537-547.
 27. J.F. Tremblay, S. Dussault, G. Viau, F. Gad, M. Boushira, and R. Bissonnette, Photodynamic therapy with toluidine blue in Jurkat cells: cytotoxicity, subcellular localization and apoptosis induction. *Photochemical & Photobiological Sciences*, (2002). 1(11): p. 852-856.
 28. M.R. Hamblin, and P. Mróz, *Advances in Photodynamic Therapy. Basic, Translational, and Clinical*, ed. M.L. Yarmush and C.J. James. (2008): Artech House.
 29. M.L. Agarwal, M.E. Clay, E.J. Harvey, H.H. Evans, A.R. Antunez, and N.L. Oleinick, Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Research*, (1991). 51(21): p. 5993-5996.
 30. D. Kessel, Death pathways associated with photodynamic therapy. *Medical Laser Application*, (2006). 21(4): p. 219-224.
 31. B.Q. Spring, I. Rizvi, N. Xu, and T. Hasan, The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance. *Photochemical & Photobiological Sciences*, (2015). 14(8): p. 1476-1491.

32. S.O. Gollnick, L. Vaughan, and B.W. Henderson, Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer research*, (2002). 62(6): p. 1604-1608.
33. M. Shams, B. Owczarczak, P. Manderscheid-Kern, D.A. Bellnier, and S.O. Gollnick, Development of photodynamic therapy regimens that control primary tumor growth and inhibit secondary disease. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, (2015). 64(3): p. 287-297.
34. A.P. Castano, P. Mroz, and M.R. Hamblin, Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*, (2006). 6(7): p. 535-545.
35. B. Chen, B.W. Pogue, P.J. Hoopes, and T. Hasan, Combining vascular and cellular targeting regimens enhances the efficacy of photodynamic therapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, (2005). 61(4): p. 1216-1226.
36. V. Fingar, P. Kik, P. Haydon, P. Cerrito, M. Tseng, E. Abang, and T. Wieman, Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD). *British Journal of Cancer*, (1999). 79(11-12): p. 1702-1708.
37. K. Kurohane, A. Tominaga, K. Sato, J.R. North, Y. Namba, and N. Oku, Photodynamic therapy targeted to tumor-induced angiogenic vessels. *Cancer Letters*, (2001). 167(1): p. 49-56.
38. J.W. Snyder, W.R. Greco, D.A. Bellnier, L. Vaughan, and B.W. Henderson, Photodynamic Therapy. *Cancer research*, (2003). 63(23): p. 8126-8131.
39. B. Chen, B.W. Pogue, J.M. Luna, R.L. Hardman, P.J. Hoopes, and T. Hasan, Tumor vascular permeabilization by vascular-targeting photosensitization: effects, mechanism, and therapeutic implications. *Clinical Cancer Research*, (2006). 12(3): p. 917-923.
40. M. Gil, M. Bieniasz, M. Seshadri, D. Fisher, M. Ciesielski, Y. Chen, R. Pandey, and D. Kozbor, Photodynamic therapy augments the efficacy of oncolytic vaccinia virus against primary and metastatic tumours in mice. *British Journal of Cancer*, (2011). 105(10): p. 1512-1521.
41. K. Sano, T. Nakajima, P.L. Choyke, and H. Kobayashi, Markedly enhanced permeability and retention effects induced by photo-immunotherapy of tumors. *ACS Nano*, (2012). 7(1): p. 717-724.

42. O.-J. Norum, P.K. Selbo, A. Weyergang, K.-E. Giercksky, and K. Berg, Photochemical internalization (PCI) in cancer therapy: from bench towards bedside medicine. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, (2009). 96(2): p. 83-92.
43. F. Kratz, P. Senter, and H. Steinhagen, *Drug Delivery in Oncology. From Basic Research to Cancer Therapy*. (2012): Wiley-VCH.
44. F. Kratz, Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, (2008). 132(3): p. 171-183.
45. F. Kratz, A clinical update of using albumin as a drug vehicle - A commentary. *Journal of Controlled Release*, (2014). 190: p. 331-336.
46. J. Ghuman, P.A. Zunszain, I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, M. Otagiri, and S. Curry, Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of Molecular Biology*, (2005). 353(1): p. 38-52.
47. S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, and N. Franks, Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nature Structure & Biology*, (1998). 5(9): p. 827-35.
48. G. Sudlow, D.J. Birkett, and D.N. Wade, The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular Pharmacology*, (1975). 11(6): p. 824-32.
49. O.K. Abou-Zied, and N. Al-Lawatia, Exploring the drug-binding site Sudlow I of human serum albumin: the role of water and Trp214 in molecular recognition and ligand binding. *ChemPhysChem*, (2011). 12(2): p. 270-274.
50. U. Kragh-Hansen, Molecular and practical aspects of the enzymatic properties of human serum albumin and of albumin-ligand complexes. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, (2013). 1830(12): p. 5535-5544.
51. Z.-M.Wang, J.X. Ho, J.R. Ruble, J. Rose, F. Rueker, M. Ellenburg, R. Murphy, J. Click, E. Soistman, L. Wilkerson, and D.C. Carter, Structural studies of several clinically important oncology drugs in complex with human serum albumin. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, (2013). 1830(12): p. 5356-5374.

52. E. Alarcon, A.M. Edwards, A. Aspee, C.D. Borsarelli, and E.A. Lissi, Photophysics and photochemistry of rose bengal bound to human serum albumin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, (2009). 8(7): p. 933-43.
53. E. Alarcon, A.M. Edwards, A. Aspee, F.E. Moran, C.D. Borsarelli, E.A. Lissi, D. Gonzalez-Nilo, H. Poblete, and J.C. Scaiano, Photophysics and photochemistry of dyes bound to human serum albumin are determined by the dye localization. *Photochemical & Photobiological Sciences*, (2010). 9(1): p. 93-102.
54. E. Alarcon, A.M. Edwards, A.M. Garcia, M. Munoz, A. Aspee, C.D. Borsarelli, and E.A. Lissi, Photophysics and photochemistry of zinc phthalocyanine/bovine serum albumin adducts. *Photochemical & Photobiological Science*, (2009). 8(2): p. 255-63.
55. M. Dockal, M. Chang, D.C. Carter, and F. Ruker, Five recombinant fragments of human serum albumin - Tools for the characterization of the warfarin binding site. *Protein Science*, (2000). 9(8): p. 1455-1465.
56. D.E. Epps, T.J. Raub, V. Caiolfa, A. Chiari, and M. Zamai, Determination of the affinity of drugs toward serum albumin by measurement of the quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence of the protein. *J Pharm Pharmacol*, (1999). 51(1): p. 41-8.
57. Y.J. Hu, W. Li, Y. Liu, J.X. Dong, and S.S. Qu, Fluorometric investigation of the interaction between methylene blue and human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2005). 39(3-4): p. 740-745.
58. I. Vayá, V. Lhiaubet-Vallet, M.C. Jiménez, and M.A. Miranda, Photoactive Assemblies of Organic Compounds and Biomolecules: Drug-Protein Supramolecular Systems. *Chemical Society Reviews*, (2014). 43: p. 4102-4122.
59. S. Monti, and I. Manet, Supramolecular Photochemistry of Drugs in Biomolecular Environments. *Chemical Society Reviews*, (2014). 43: p. 4051-4067.
60. J. Murray, K. Kim, T. Ogoshi, W. Yao, and B.C. Gibb, The aqueous supramolecular chemistry of cucurbit[n]urils, pillar[n]arenes and deep-cavity cavitands. *Chemical Society Reviews*, (2017). 46(9): p. 2479-2496.

61. K.I. Assaf, and W.M. Nau, Cucurbiturils: from synthesis to high-affinity binding and catalysis. *Chemical Society Reviews*, (2015). 44(2): p. 394-418.
62. P. Montes-Navajas, A. Corma, and H. Garcia, Complexation and Fluorescence of Tricyclic Basic Dyes Encapsulated in Cucurbiturils. *ChemPhysChem*, (2008). 9: p. 713-720.
63. L. Isaacs, Cucurbit[n]urils: from mechanism to structure and function. *Chemical Communications*, (2009)(6): p. 619-629.
64. C. Marquez, and W.M. Nau, Two mechanisms of slow host-guest complexation between cucurbit[6]uril and cyclohexylmethylamine: pH-responsive supramolecular kinetics. *Angewandte Chemie-International Edition*, (2001). 40(17): p. 3155-3160.
65. J. Mohanty, A.C. Bhasikuttan, W.M. Nau, and H. Pal, Host-Guest Complexation of Neutral Red with Macrocyclic Host Molecules: Contrasting pKa Shifts and Binding Affinities for Cucurbit[7]uril and β -Cyclodextrin. *The Journal of Physical Chemistry B*, (2006). 110(10): p. 5132-5138.
66. R. Wang, L. Yuan, and D.H. Macartney, A green to blue fluorescence switch of protonated 2-aminoanthracene upon inclusion in cucurbit[7]uril. *Chemical Communications*, (2005). (47): p. 5867-5869.
67. J. Mohanty, and W.M. Nau, Ultrastable Rhodamine with Cucurbituril. *Angewandte Chemie International Edition*, (2005). 44(24): p. 3750-3754.
68. K. Kim, N. Selvapalam, Y.H. Ko, K.M. Park, D. Kim, and J. Kim, Functionalized cucurbiturils and their applications. *Chemical Society Reviews*, (2007). 36(2): p. 267-279.
69. Y. Ling, W. Wang, and A.E. Kaifer, A new cucurbit[8]uril-based fluorescent receptor for indole derivatives. *Chemical Communications*, (2007). (6): p. 610-612.
70. J. Mohanty, S. Dutta Choudhury, H.P. Upadhyaya, A.C. Bhasikuttan, and H. Pal, Control of the Supramolecular Excimer Formation of Thioflavin T within a Cucurbit[8]uril Host: A Fluorescence On/Off Mechanism. *Chemistry - A European Journal*, (2009). 15(21): p. 5215-5219.

71. R. Wang, L. Yuan, H. Ihmels, and D.H. Macartney, Cucurbit[8]uril/Cucurbit[7]uril Controlled Off/On Fluorescence of the Acridizinium and 9-Aminoacridizinium Cations in Aqueous Solution. *Chemistry - A European Journal*, (2007). 13(22): p. 6468-6473.
72. A.I. Day, R.J. Blanch, A.P. Arnold, S. Lorenzo, G.R. Lewis, and I. Dance, A Cucurbituril-Based Gyroscane: A New Supramolecular Form. *Angewandte Chemie International Edition*, (2002). 41(2): p. 275-277.
73. S. Walker, R. Oun, F.J. McInees, and N.J. Wheate, The Potential of Cucurbit[n]urils in Drug Delivery. *Israel Journal of Chemistry*, (2011). 51: p. 616-624.
74. D.H. Macartney, Encapsulation of Drug Molecules by Cucurbiturils: Effects on their Chemical Properties in Aqueous Solution. *Israel Journal of Chemistry*, (2011). 51: p. 600-615.
75. M. González-Béjar, P. Montes-Navajas, H. García, and J.C. Scaiano, Methylene Blue Encapsulation in Cucurbit[7]uril: Laser Flash Photolysis and Near-IR Luminescence Studies of the Interaction with Oxygen. *Langmuir*, (2009). 25: p. 10490-10494.
76. K. Scholtbach, I. Venegas, C. Bohne, and D. Fuentealba, Time-resolved fluorescence anisotropy as a tool to study guest-cucurbit[n]uril-protein ternary supramolecular interactions. *Photochemical & Photobiological Sciences*, (2015). 14(4): p. 842-852.
77. P. Montes-Navajas, M. Gonzalez-Bejar, J.C. Scaiano, and H. Garcia, Cucurbituril Complexes Cross The Cell Membrane. *Photochemical & Photobiological Sciences*, (2009). 8: p. 1743-1747.
78. V.D. Uzunova, C. Cullinane, K. Brix, W.M. Nau, and A.I. Day, Toxicity of Cucurbit[7]uril and Cucurbit[8]uril: An Exploratory In Vitro and In Vivo Study. *Organic & Biomolecular Chemistry*, (2010). 8: p. 2037-2042.
79. G. Hettiarachchi, D. Nguyen, J. Wu, D. Lucas, D. Ma, L. Isaacs, and V. Briken, Toxicology and Drug Delivery by Cucurbit[n]uril Type Molecular Containers. *PLoS ONE*, (2010). 5(5): p. 10514.
80. X. Yang, Z. Wang, Y. Niu, X. Chen, S.M.Y. Lee, and R. Wang, Influence of supramolecular encapsulation of camptothecin by cucurbit[7]uril: reduced toxicity and preserved anti-cancer activity. *MedChemComm*, (2016). (7): p. 1392-1397.

81. S. Li, H. Yin, G. Martinz, I.W. Wyman, D. Bardelang, D.H. Macartney, and R. Wang, Supramolecular encapsulation of benzocaine and its metabolite para-aminobenzoic acid by cucurbit[7]uril. *New Journal of Chemistry*, (2016). 40(4): p. 3484-3490.
82. H. Chen, J.Y.W. Chan, S. Li, J.J. Liu, I.W. Wyman, S.M.Y. Lee, D.H. Macartney, and R. Wang, In vivo reversal of general anesthesia by cucurbit[7]uril with zebrafish models. *RSC Advances*, (2015). 5(78): p. 63745-63752.
83. S. Li, H. Chen, X. Yang, D. Bardelang, I.W. Wyman, J. Wan, S.M.Y. Lee, and R. Wang, Supramolecular Inhibition of Neurodegeneration by a Synthetic Receptor. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, (2015). 6(12): p. 1174-1178.
84. A.C. Bhasikuttan, J. Mohanty, W.M. Nau, and H. Pal, Efficient Fluorescence Enhancement and Cooperative Binding of an Organic Dye in a Supra-biomolecular Host–Protein Assembly. *Angewandte Chemie*, (2007). 119(22): p. 4198-4200.
85. W. Lei, G. Jiang, Q. Zhou, B. Zhang, and X. Wang, Greatly enhanced binding of a cationic porphyrin towards bovine serum albumin by cucurbit[8]uril. *Physical Chemistry Chemical Physics*, (2010). 12(40): p. 13255-13260.
86. L. Cao, G. Hettiarachchi, V. Briken, and L. Isaacs, Cucurbit[7]uril Containers for Targeted Delivery of Oxaliplatin to Cancer Cells. *Angewandte Chemie International Edition*, (2013). 52(46): p. 12033-12037.
87. Y. Chen, Z. Huang, J.-F. Xu, Z. Sun, and X. Zhang, Cytotoxicity Regulated by Host–Guest Interactions: A Supramolecular Strategy to Realize Controlled Disguise and Exposure. *ACS Applied Materials & Interfaces*, (2016). 8(35): p. 22780-22784.
88. Y. Chen, Z. Huang, H. Zhao, J.-F. Xu, Z. Sun, and X. Zhang, Supramolecular Chemotherapy: Cooperative Enhancement of Antitumor Activity by Combining Controlled Release of Oxaliplatin and Consuming of Spermine by Cucurbit[7]uril. *ACS Applied Materials & Interfaces*, (2017). 9(10): p. 8602-8608.
89. S. Yi, and A.E. Kaifer, Determination of the Purity of Cucurbit[n]uril (n = 7, 8) Host Samples. *The Journal of Organic Chemistry*, (2011). 76(24): p. 10275-10278.

90. H. Tang, D. Fuentealba, Y.H. Ko, N. Selvapalam, K. Kim, and C. Bohne, Guest binding dynamics with cucurbit[7]uril in the presence of cations. *Journal of the American Chemical Society*, (2011). 133(50): p. 20623-20633.
91. T.C.S. Pace, M. Nishijima, T. Wada, Y. Inoue, and C. Bohne, Photophysical Studies on the Supramolecular Photochirogenesis for the Photocyclodimerization of 2-Anthracenecarboxylate within Human Serum Albumin. *Journal of Physical Chemistry B*, (2009). 113(30): p. 10445-10453.
92. D., Fuentealba, H. Kato, M. Nishijima, G. Fukuhara, T. Mori, Y. Inoue, and C. Bohne, Explaining the highly enantiomeric photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate bound to human serum albumin using time-resolved anisotropy studies. *Journal of the American Chemical Society*, (2013). 135(1): p. 203-9.
93. N.A. Kuznetsova, N.S. Gretsova, O.A. Yuzhakova, V.M. Negrimovskii, O.L. Kaliya, and E.A. Luk'yanets, New reagents for determination of the quantum efficiency of singlet oxygen generation in aqueous media. *Russian Journal of General Chemistry*, (2001). 71(1): p. 36-41.
94. R.W. Redmond, and J.N. Gamlin, A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and photobiology*, (1999). 70(4): p. 391-475.
95. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, and D.J. Fox, *Gaussian 09, revision E.01*. 2009: Wallingford CT.
96. A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics*, (1993). 98(7): p. 5648-5652.

97. C. Lee, W. Yang, and R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B*, (1988). 37(2): p. 785-789.
98. G.A. Petersson, and M.A. Al-Laham, A complete basis set model chemistry. II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms. *The Journal of Chemical Physics*, (1991). 94(9): p. 6081-6090.
99. G.A. Petersson, A. Bennett, T.G. Tensfeldt, M.A. Al-Laham, W.A. Shirley, and J. Mantzaris, A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row elements. *The Journal of Chemical Physics*, (1988). 89(4): p. 2193-2218.
100. R.E. Stratmann, G.E. Scuseria, and M.J. Frisch, An efficient implementation of time-dependent density-functional theory for the calculation of excitation energies of large molecules. *The Journal of Chemical Physics*, (1998). 109(19): p. 8218-8224.
101. F. Furche, and R. Ahlrichs, Adiabatic time-dependent density functional methods for excited state properties. *The Journal of Chemical Physics*, (2002). 117(16): p. 7433-7447.
102. G. Stefan, Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. *Journal of Computational Chemistry*, (2006). 27(15): p. 1787-1799.
103. J.P. Perdew, K. Burke, and M. Ernzerhof, Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Physical Review Letters*, (1996). 77(18): p. 3865-3868.
104. J.P. Perdew, K. Burke, and M. Ernzerhof, Generalized Gradient Approximation Made Simple [Phys. Rev. Lett. 77, 3865 (1996)]. *Physical Review Letters*, (1997). 78(7): p. 1396-1396.
105. J.-D. Chai, and M. Head-Gordon, Systematic optimization of long-range corrected hybrid density functionals. *The Journal of Chemical Physics*, (2008). 128(8): p. 084106.
106. Y. Zhao, and D.G. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts*, (2008). 120(1): p. 215-

241.

107. T. Yanai, D.P. Tew, and N.C. Handy, A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chemical Physics Letters*, (2004). 393(1): p. 51-57.
108. C. Maurizio, R. Nadia, S. Giovanni, and B. Vincenzo, Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *Journal of Computational Chemistry*, (2003). 24(6): p. 669-681.
109. F. Neese, The ORCA program system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, (2012). 2(1): p. 73-78.
110. F. Weigend, and R. Ahlrichs, Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, (2005). 7(18): p. 3297-3305.
111. F. Biedermann, V.D. Uzunova, O.A. Scherman, W.M. Nau, and A. De Simone, Release of High-Energy Water as an Essential Driving Force for the High-Affinity Binding of Cucurbit[n]urils. *Journal of the American Chemical Society*, (2012). 134(37): p. 15318-15323.
112. M. Sundararajan, V. Sinha, T. Bandyopadhyay, and S.K. Ghosh, Can Functionalized Cucurbituril Bind Actinyl Cations Efficiently? A Density Functional Theory Based Investigation. *The Journal of Physical Chemistry A*, (2012). 116(17): p. 4388-4395.
113. S.R. Peerannawar, and S.P. Gejji, Structure and spectral characteristics of diquat-cucurbituril complexes from density functional theory. *Journal of Molecular Modeling*, (2013). 19(11): p. 5113-5127.
114. L. Lu, S. Zhu, H. Zhang, F. Li, and S. Zhang, Theoretical study of complexation of resveratrol with cyclodextrins and cucurbiturils: structure and antioxidative activity. *RSC Advances*, (2015). 5(19): p. 14114-14122.
115. S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, and H. Krieg, A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *The Journal of Chemical Physics*, (2010). 132(15): p. 154104.
116. H. Kruse, and S. Grimme, A geometrical correction for the inter-and intra-molecular basis set superposition error in Hartree-Fock and density

- functional theory calculations for large systems. *The Journal of Chemical Physics*, (2012). 136(15): p. 04B613.
117. A. Klamt, The COSMO and COSMO-RS solvation models. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, (2011). 1(5): p. 699-709.
 118. T. Lu, and F. Chen, Multiwfn: a multifunctional wavefunction analyzer. *Journal of Computational Chemistry*, (2012). 33(5): p. 580-592.
 119. G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, and A.J. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, (1998). 19(14): p. 1639-1662.
 120. M.A. Munoz, A. Pacheco, M.I. Becker, E. Silva, R. Ebensperger, A.M. Garcia, A.E. De Ioannes, and A.M. Edwards, Different cell death mechanisms are induced by a hydrophobic flavin in human tumor cells after visible light irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, (2011). 103(1): p. 57-67.
 121. M.Garcia, A., H. de Alwis Weerasekera, S.P. Pitre, B. McNeill, E. Lissi, A.M. Edwards, and E.I. Alarcon, Photodynamic performance of zinc phthalocyanine in HeLa cells: A comparison between DPCC liposomes and BSA as delivery systems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, (2016). 163: p. 385-390.
 122. K.G. Das, P.T. Funke, and A.K. Bose, Mass Spectral Studies. III. Fragmentation of Aromatic Amides. *Journal of the American Chemical Society*, (1964). 86(18): p. 3729-3732.
 123. T.D. Claridge, *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*. Vol. 27. (2016): Elsevier.
 124. S.B. Jonnalagadda, and B.K. Pare, Oxidation of Toluidine Blue by Chlorite in Acid and Mechanisms of the Uncatalyzed and Ru(III)-Catalyzed Reactions: A Kinetic Approach. *The Journal of Physical Chemistry A*, (2010). 114(46): p. 12162-12167.
 125. A. Blázquez-Castro, J.C. Stockert, F. Sanz-Rodríguez, A. Zamarrón, and A. Juarranz, Differential photodynamic response of cultured cells to methylene blue and toluidine blue: role of dark redox processes. *Photochemical & Photobiological Sciences*, (2009). 8(3): p. 371-376.

126. J. Robinson-Duggon, F. Pérez-Mora, L. Valverde-Vásquez, D. Cortés-Arriagada, J.R. De la Fuente, G. Günther, and D. Fuentealba, Supramolecular Reversible On–Off Switch for Singlet Oxygen Using Cucurbit[n]uril Inclusion Complexes. *The Journal of Physical Chemistry C*, (2017). 121(39): p. 21782-21789.
127. W.M. Nau, A. Hennig, and A.L. Koner, Squeezing Fluorescent Dyes into Nanoscale Containers—The Supramolecular Approach to Radiative Decay Engineering. (2007). 4: p. 185-211.
128. S.A. Ahmed, S. Seth, R.K. Gautam, and D. Seth, Inclusion of a coumarin derivative inside the macrocyclic hosts: A spectroscopic, thermodynamic and theoretical investigation. *Journal of Molecular Liquids*, (2018). 264: p. 550-562.
129. J. Caceres, J. Robinson-Duggon, A. Tapia, C. Paiva, M. Gomez, C. Bohne, and D. Fuentealba, Photochemical behavior of biosupramolecular assemblies of photosensitizers, cucurbit[n]urils and albumins. *Physical Chemistry Chemical Physics*, (2017). 19(3): p. 2574-2582.
130. M. Ilanchelian, C. Retna Raj, and R. Ramaraj, Spectral studies on the cyclodextrin inclusion complexes of toluidine blue O and Meldola's blue in aqueous solution. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, (2000). 36(1): p. 9-20.
131. E. Alarcon, A. Aspee, E.B. Abuin, and E.A. Lissi, Evaluation of solute binding to proteins and intra-protein distances from steady state fluorescence measurements. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, (2012). 106: p. 1-17.
132. Y.-J. Hu, W. Li, Y. Liu, J.-X. Dong, and S.-S. Qu, Fluorometric investigation of the interaction between methylene blue and human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2005). 39(3): p. 740-745.
133. A.S. Sharma, S. Anandakumar, and M. Ilanchelian, A combined spectroscopic and molecular docking study on site selective binding interaction of Toluidine blue O with Human and Bovine serum albumins. *Journal of Luminescence*, (2014). 151: p. 206-218.
134. D. Brynn Hibbert, and P. Thordarson, The death of the Job plot, transparency, open science and online tools, uncertainty estimation methods and other developments in supramolecular chemistry data analysis. *Chemical Communications (Camb)*, (2016). 52(87): p. 12792-

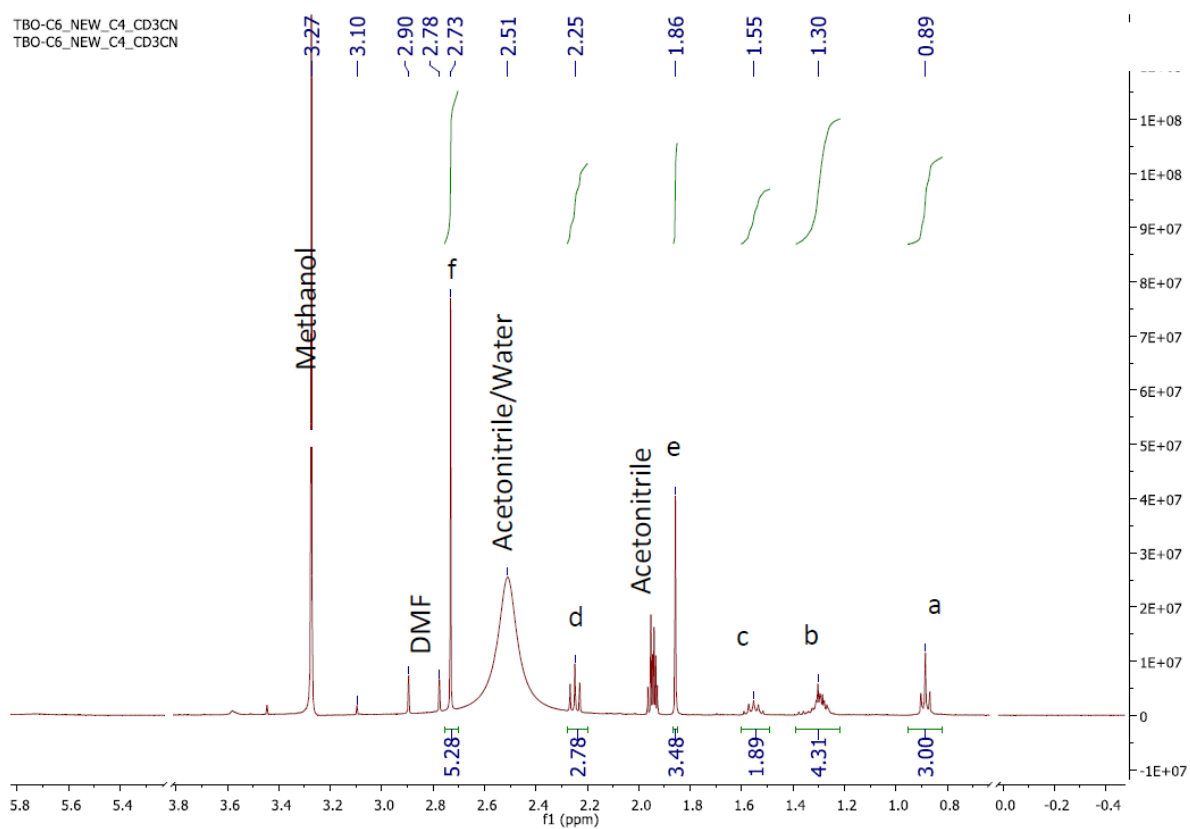
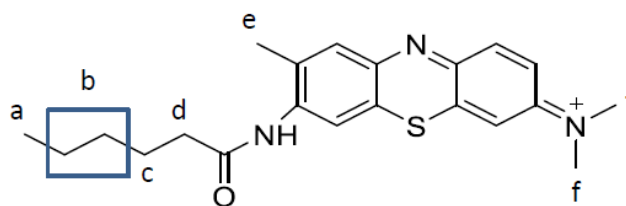
12805.

135. G. Zhang, N. Zhao, and L. Wang, Fluorescence spectrometric studies on the binding of puerarin to human serum albumin using warfarin, ibuprofen and digitoxin as site markers with the aid of chemometrics. *Journal of Luminescence*, (2011). 131(12): p. 2716-2724.
136. U. Kragh-Hansen, V.T.G. Chuang, and M. Otagiri, Practical Aspects of the Ligand-Binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, (2002). 25(6): p. 695-704.
137. G. Sudlow, D.J. Birkett, and D.N. Wade, Further Characterization of Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. *Molecular Pharmacology*, (1976). 12(6): p. 1052-1061.
138. T. Peters Jr, , *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications*. (1995): Academic press.
139. M. Tabachnick, and L. Korcek, Binding of 125I-labeled p-iodobenzoate to human serum albumin: interaction with the primary thyroxine binding site. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (1979). 198(2): p. 403-405.
140. R. Artali, G. Bombieri, L. Calabi, and A. Del Pra, A molecular dynamics study of human serum albumin binding sites. *Il Farmaco*, (2005). 60(6): p. 485-495.
141. J. Liu, N. Jiang, J. Ma, and X. Du, Insight into unusual downfield NMR shifts in the inclusion complex of acridine orange with cucurbit [7] uril. *European Journal of Organic Chemistry*, (2009). 2009(29): p. 4931-4938.
142. M.F. Czar, and R.A. Jockusch, Understanding photophysical effects of cucurbituril encapsulation: a model study with acridine orange in the gas phase. *ChemPhysChem*, (2013). 14(6): p. 1138-1148.
143. P.D. Ross, and S. Subramanian, Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, (1981). 20(11): p. 3096-3102.
144. F. Biedermann, W.M. Nau, and H.J. Schneider, The Hydrophobic Effect Revisited—Studies with Supramolecular Complexes Imply High-Energy Water as a Noncovalent Driving Force. *Angewandte Chemie International Edition*, (2014). 53(42): p. 11158-11171.

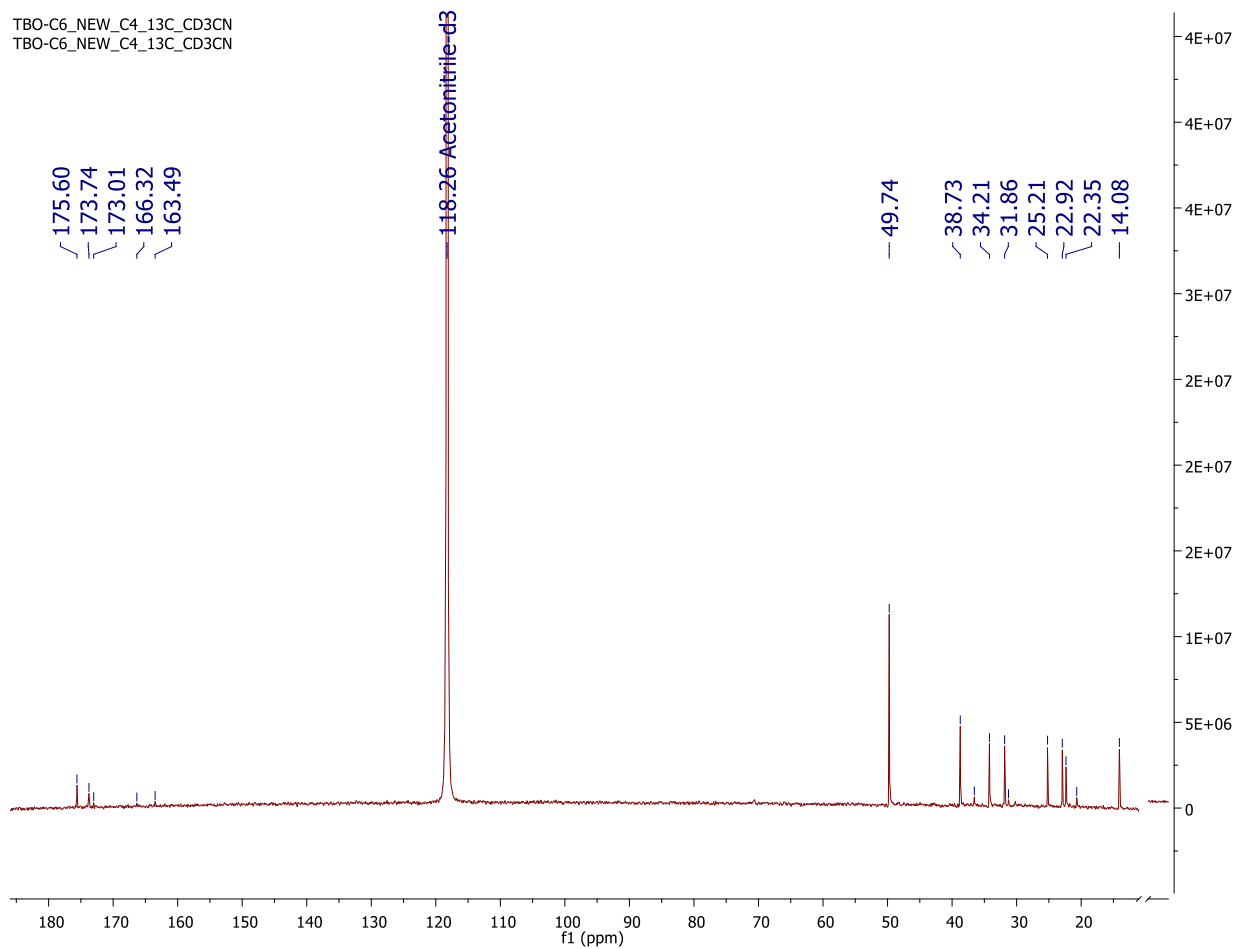
145. F. Biedermann, and O.A. Scherman, Cucurbit [8] uril mediated donor–acceptor ternary complexes: a model system for studying charge-transfer interactions. *The Journal of Physical Chemistry B*, (2012). 116(9): p. 2842-2849.
146. F. Biedermann, V.D. Uzunova, O.A. Scherman, W.M. Nau, and A. De Simone, Release of high-energy water as an essential driving force for the high-affinity binding of cucurbit[n]urils. *Journal of the American Chemical Society*, (2012). 134(37): p. 15318-15323.
147. F. Biedermann, M. Vendruscolo, O.A. Scherman, A. De Simone, and W.M. Nau, Cucurbit [8] uril and blue-box: high-energy water release overwhelms electrostatic interactions. *Journal of the American Chemical Society*, (2013). 135(39): p. 14879-14888.
148. I. Jelesarov, and H.R. Bosshard, Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition*, (1999). 12(1): p. 3-18.
149. H. Chen, G. Wang, L. Sun, H. Zhang, M. Sun, J. Sun, L. Shang, and C. Luo, Regulating the alky chain length of fatty acid-didanosine prodrugs and evaluating its role in albumin binding. *Drug Delivery and Translational Research*, (2018). 8(1): p. 21-31.
150. C. Tsonopoulos, Thermodynamic analysis of the mutual solubilities of normal alkanes and water. *Fluid Phase Equilibria*, (1999). 156(1-2): p. 21-33.
151. Z. Darzynkiewicz, and S.P. Carter, Photosensitizing effects of the tricyclic heteroaromatic cationic dyes pyronin Y and toluidine blue O (tolonium chloride). *Cancer Research*, (1988). 48(5): p. 1295-1299.
152. L.P. Vásquez, *Estudios de la asociación competitiva de un fotosensibilizador a cucurbit[n]urilos como modelo de "Switch On-Off" para terapia fotodinámica*, *Química Física*. 2018, Pontificia Universidad Católica de Chile: Santiago, Chile. p. 60.
153. X.-Q. Wang, Q. Lei, J.-Y. Zhu, W.-J. Wang, Q. Cheng, F. Gao, Y.-X. Sun, and X.-Z. Zhang, Cucurbit[8]uril Regulated Activatable Supramolecular Photosensitizer for Targeted Cancer Imaging and Photodynamic Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, (2016). 8(35): p. 22892-22899.

154. N. Ghinea, M. Eskenasy, M. Simionescu, and N. Simionescu, Endothelial albumin binding proteins are membrane-associated components exposed on the cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, (1989). 264(9): p. 4755-4758.
155. S.S. Siddiqui, Z.K. Siddiqui, and A.B. Malik, Albumin endocytosis in endothelial cells induces TGF- β receptor II signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, (2004). 286(5): p. L1016-L1026.
156. S.H. Audi, L.E. Olson, R.D. Bongard, D.L. Roerig, M.L. Schulte, and C.A. Dawson, Toluidine blue O and methylene blue as endothelial redox probes in the intact lung. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, (2000). 278(1): p. H137-H150.
157. G.T. Wondrak, NQO1-activated phenothiazinium redox cyclers for the targeted bioreductive induction of cancer cell apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, (2007). 43(2): p. 178-190.

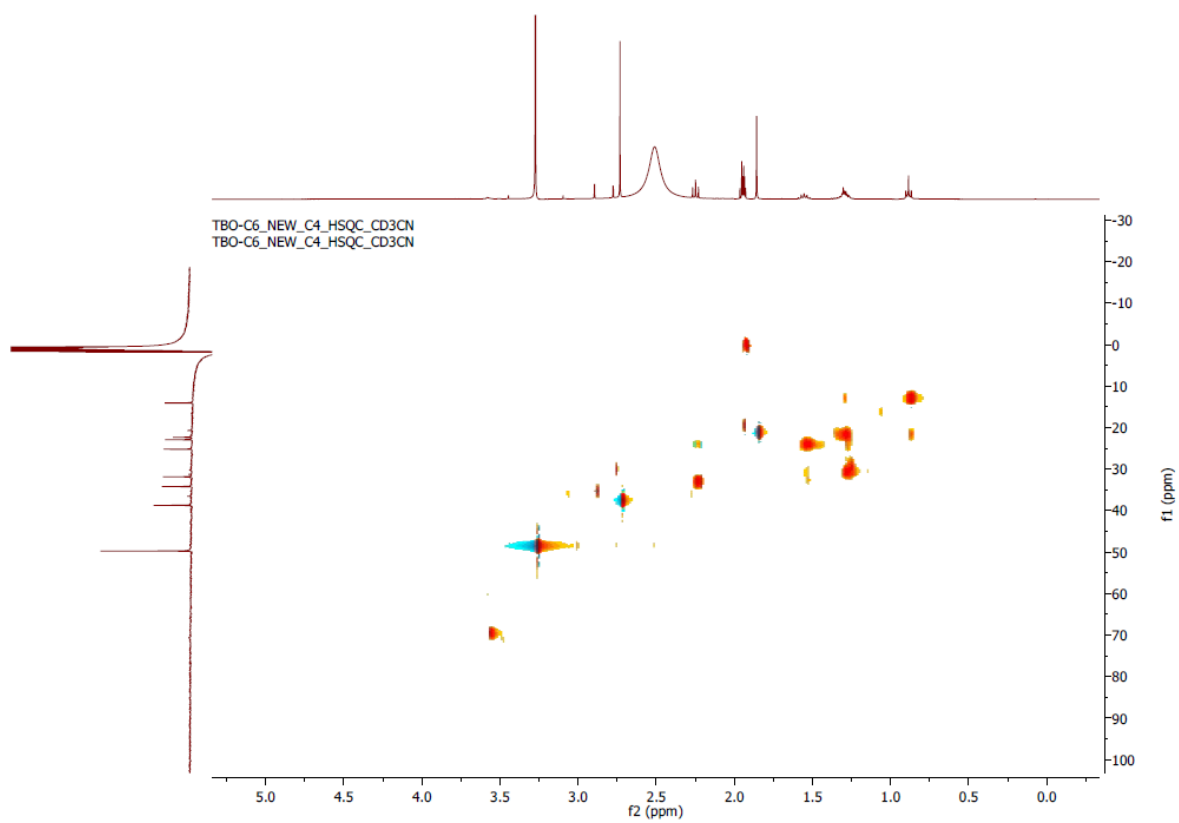
Anexos



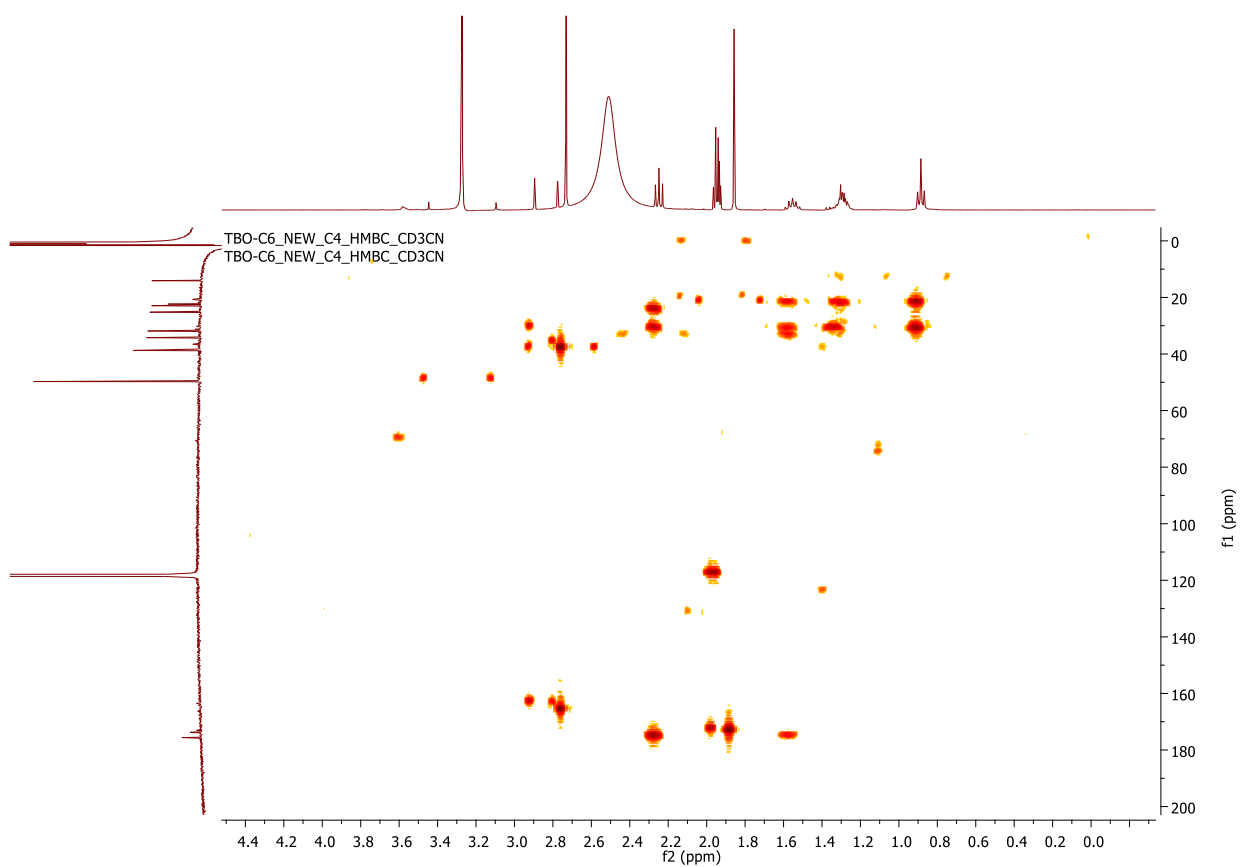
Anexo 1. Ampliación de la Región Alifática del Espectro de RMN ^1H del derivado de TBO $^+$ -C6 en CD_3CN .



Anexo 2. Espectro de RMN ^{13}C del derivado de TBO $^{+}$ -C6 en CD_3CN .



Anexo 3. Espectro de RMN de HSQC del TBO⁺-C6 en CD₃CN.



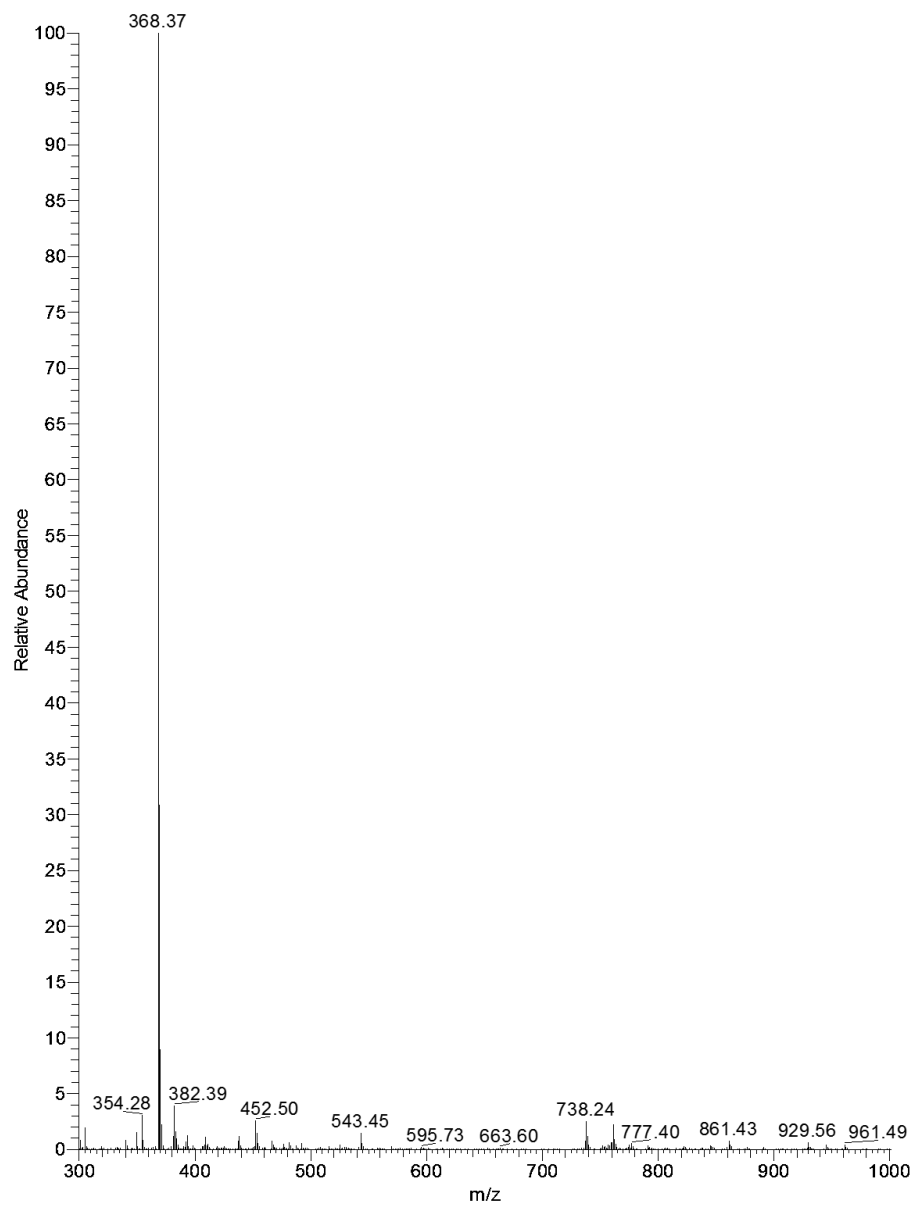
Anexo 4. Espectro de RMN de HMBC del TBO⁺-C6 en CD₃CN.

Tabla S1. Correlaciones Observadas en los Desplazamientos Químicos en el Espectro de 2D de HSQC del derivado TBO⁺-C6 en CD₃CN.

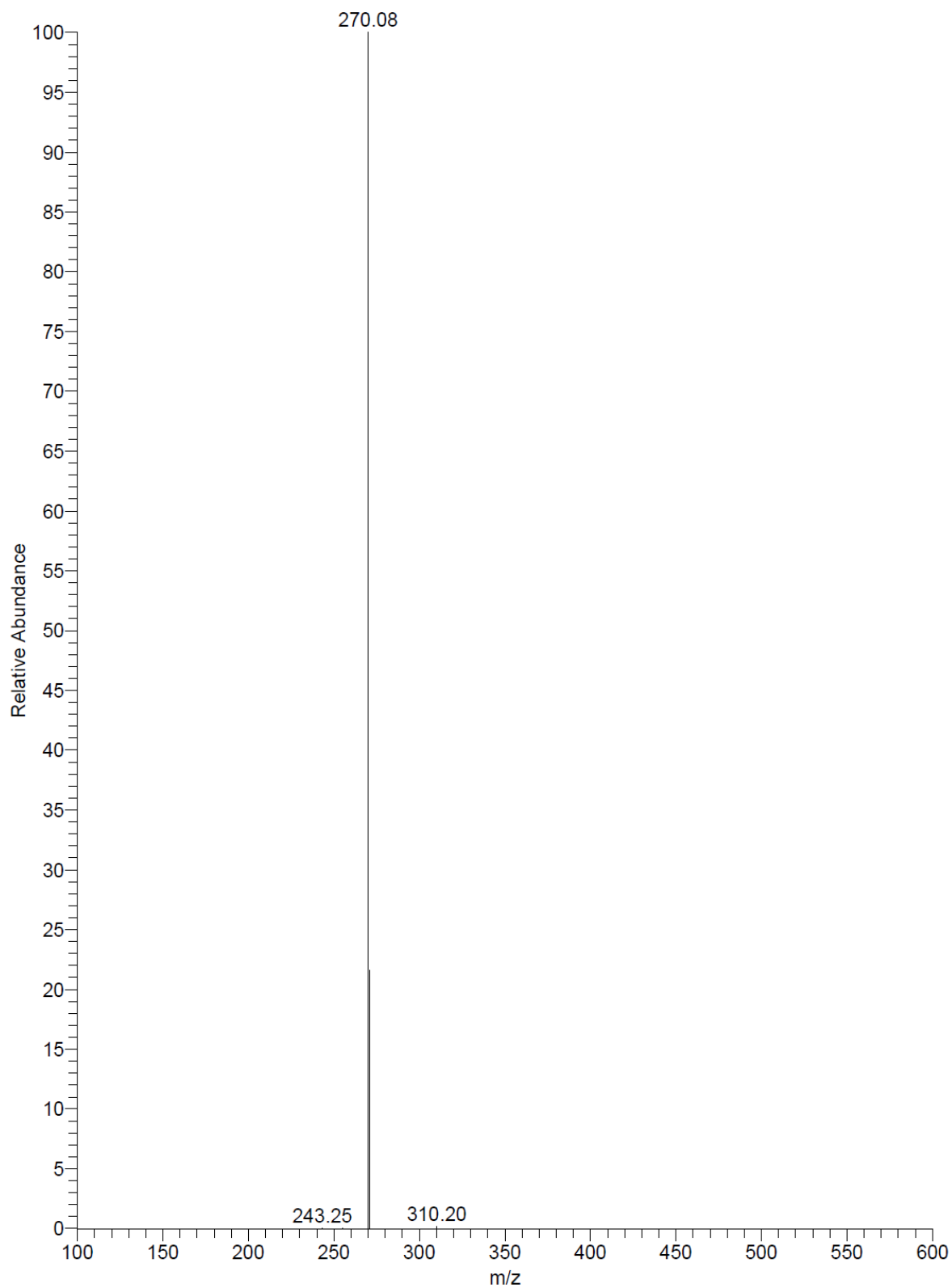
¹³ C (δ ppm)	Protón Correlacionado (δ ppm)	Señal cruzada en el HSQC 2D
14.08	0.89	+
22.92, 31.86	1.30	+
25.21	1.55	+
22.35	1.86	+
34.21	2.25	+
38.73	2.73	+

Tabla S2. Correlaciones Observadas en los Desplazamientos Químicos en el Espectro de 2D HMBC del derivado TBO⁺-C6 en CD₃CN.

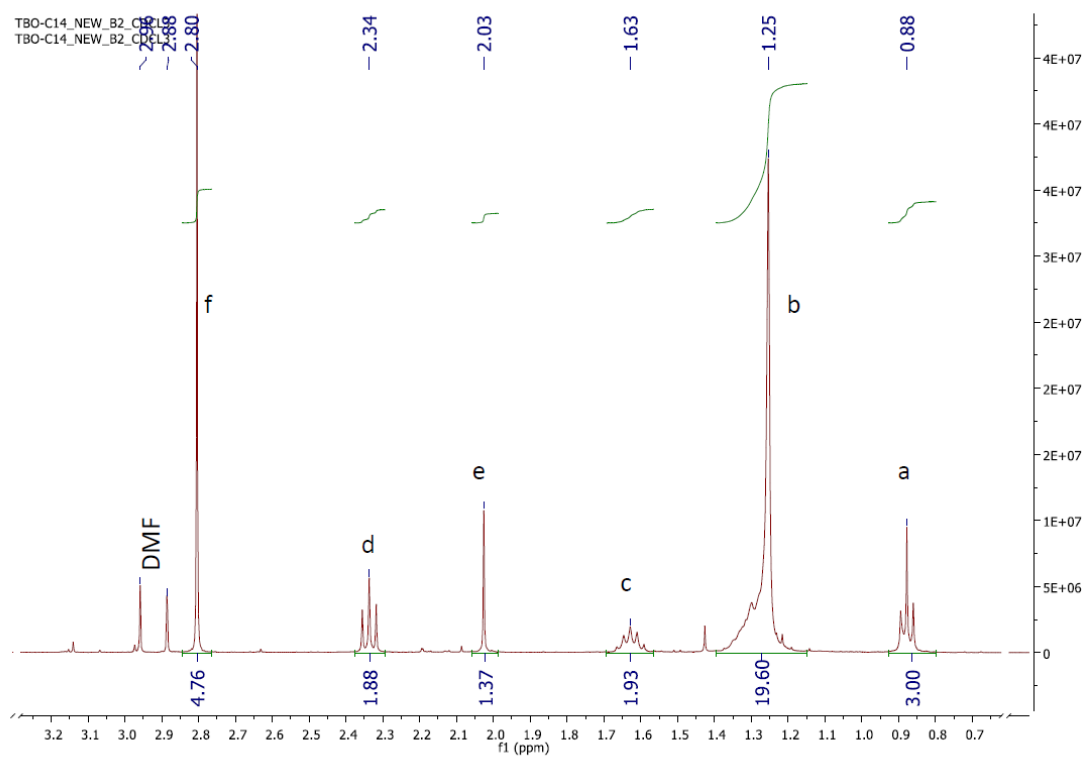
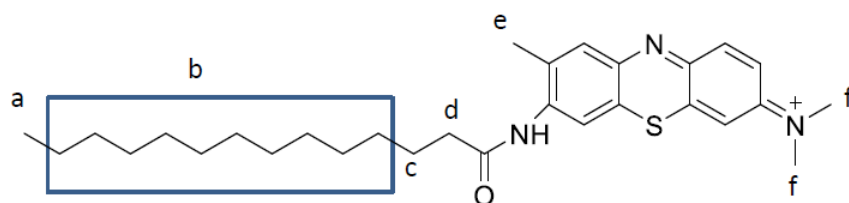
Protón (número)	¹ H (δ ppm, multiplicidad)	Desplazamiento Correlacionado ¹³ C (δ ppm)
a	0.89, t	22.92, 31.86
b	1.30, m	22.92, 31.86
c	1.55, m	22.92, 31.86, 34.21
d	2.25, t	25.21, 31.86, 175.68
e	1.86, s	
f	2.73, s	



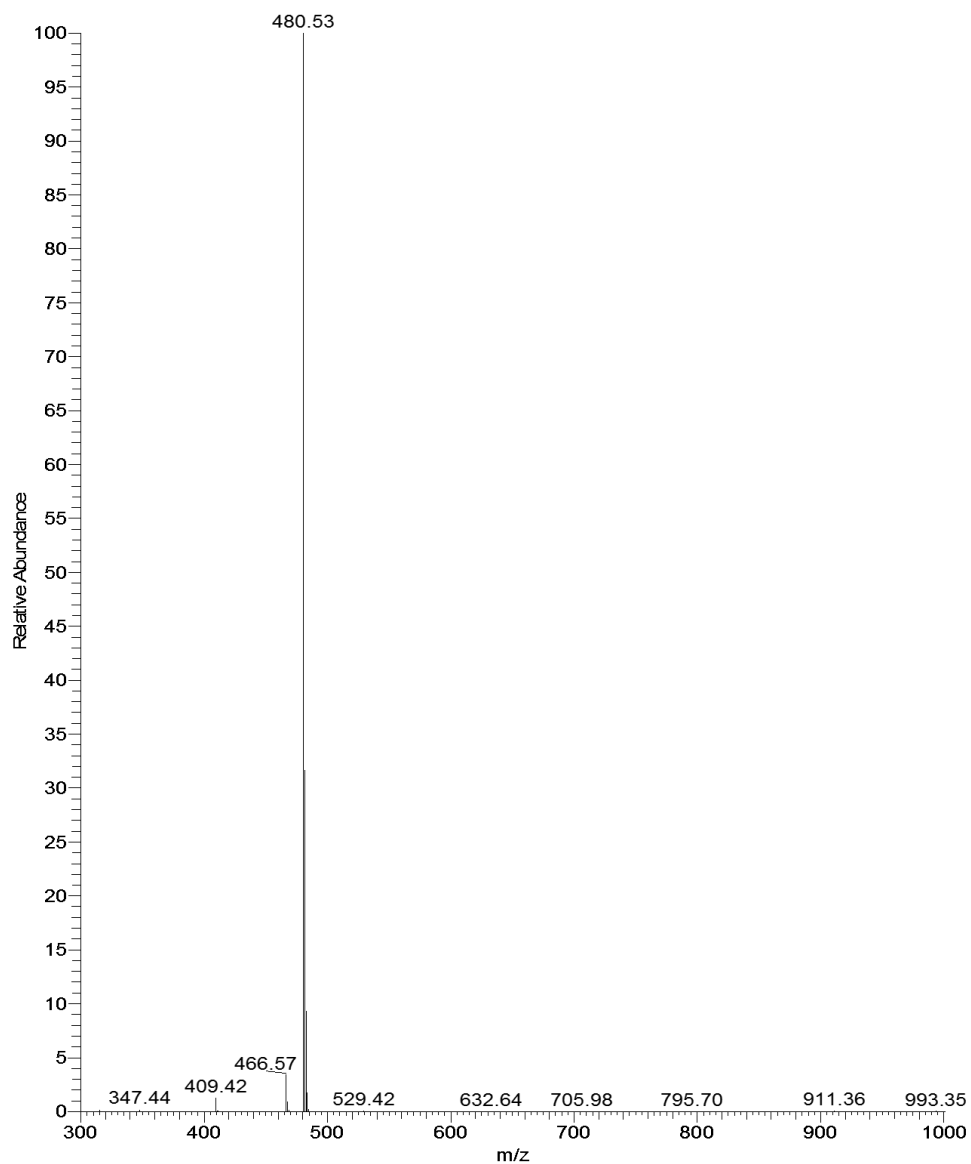
Anexo 5. Espectrometría de Masas del derivado TBO⁺-C6.



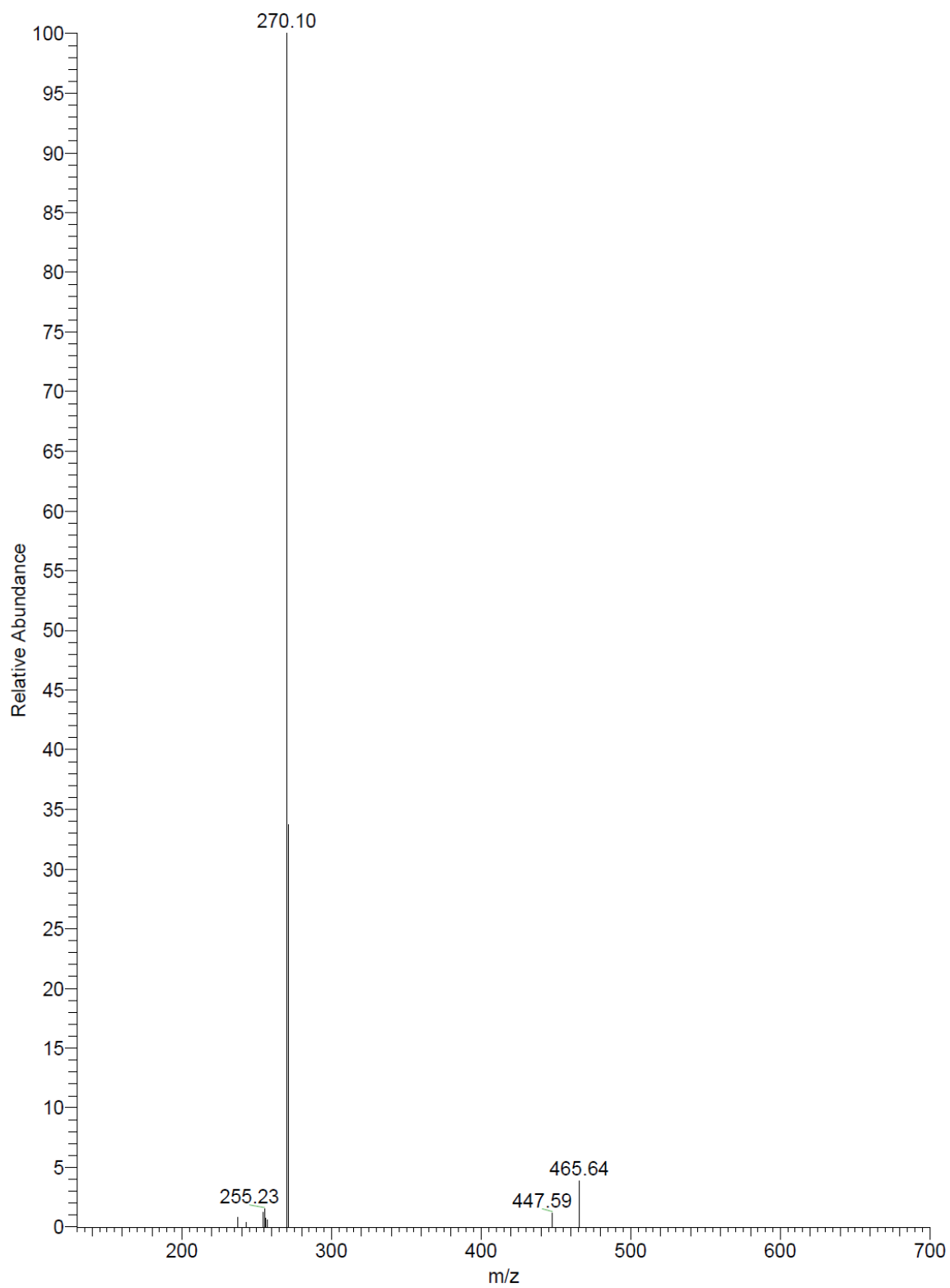
Anexo 6. Espectrometría de Masas de la fragmentación del derivado TBO⁺-C6.



Anexo 7. Ampliación de la Región Alifática del Espectro de RMN ^1H del derivado TBO $^+$ -C14 en CDCl_3 .



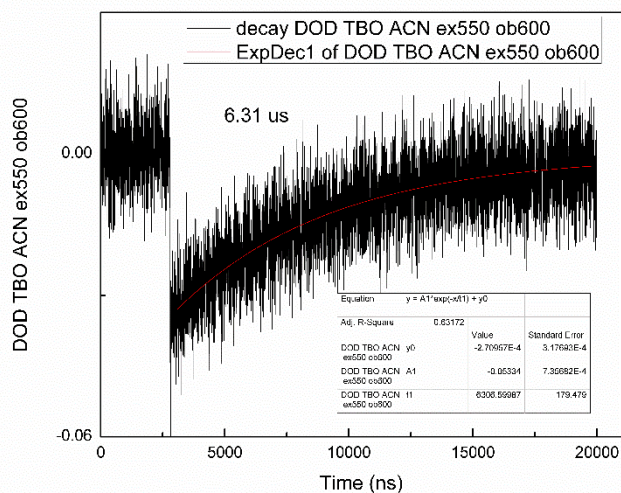
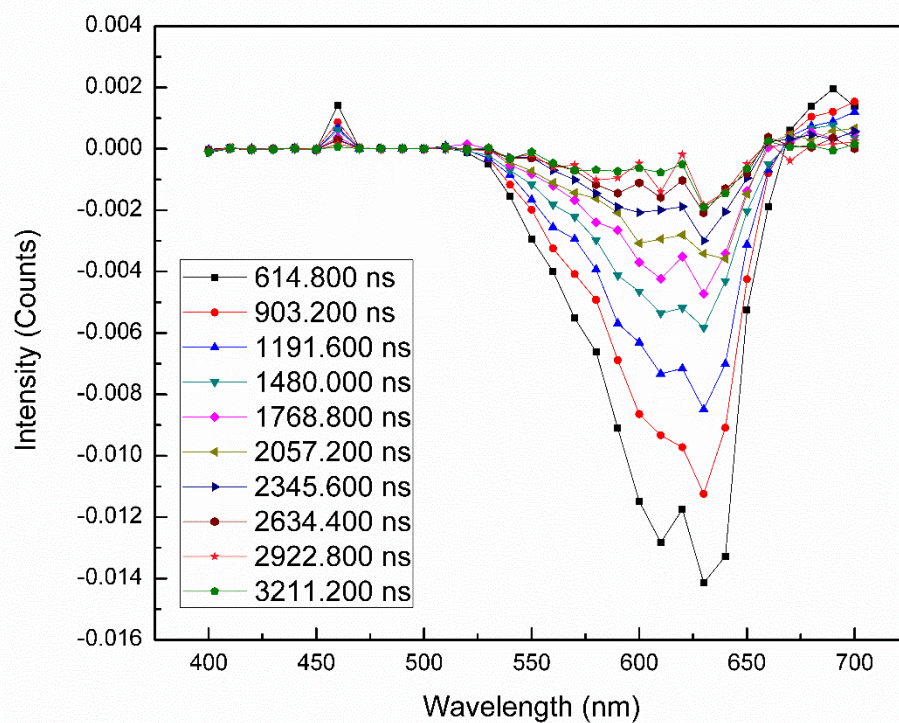
Anexo 8. Espectrometría de Masas del derivado TBO⁺-C14.



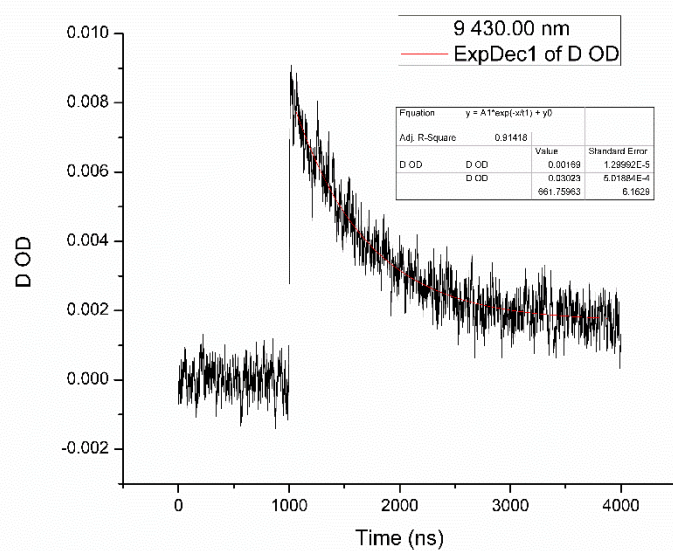
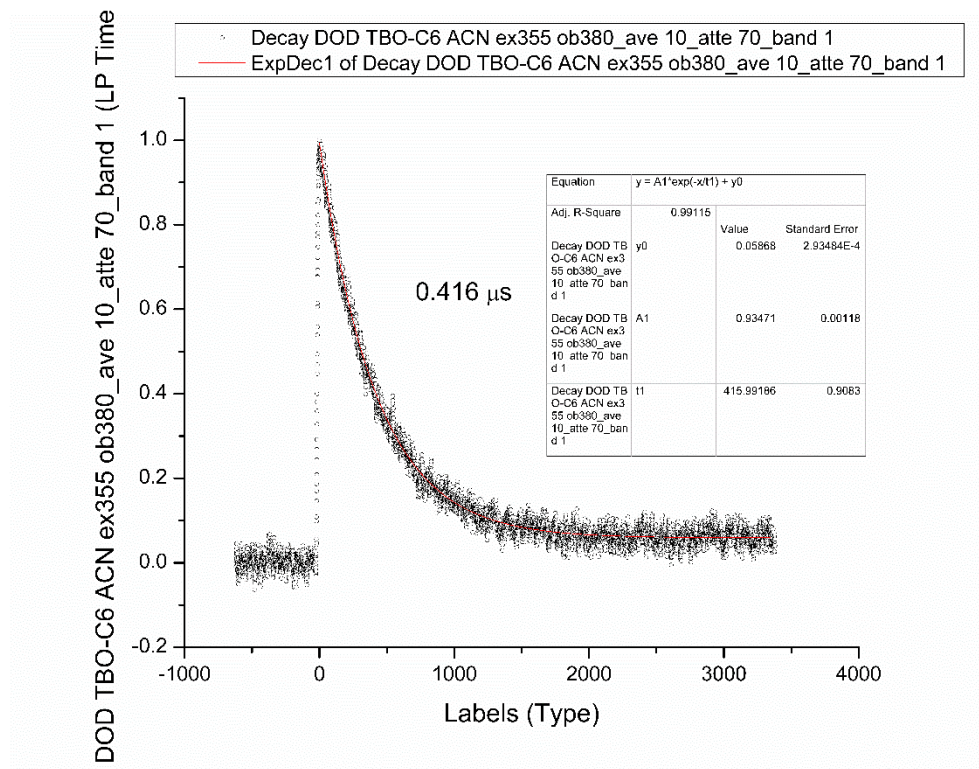
Anexo 9. Espectrometría de Masas de la fragmentación del derivado TBO⁺-C14.

Tabla S3. Tiempos de vida de fluorescencia del TBO⁺, TBO⁺-C6 y TBO⁺-C14 en CH₃CN en presencia de oxígeno.

Fotosensibilizador	$\tau_1(\text{ns}) / A_1$	$\tau_2(\text{ns}) / A_2$	χ^2
TBO ⁺	0.48 (40%)	0.69 (60%)	1.097
TBO ⁺ -C6	0.34 (99.1%)	1.46 (0.9%)	1.198
TBO ⁺ -C14	1.23 (98.5%)	2.98 (1.5%)	0.961



Anexo 10. Espectro de absorción transiente del TBO⁺ en acetonitrilo luego del pulso del láser (arriba). La recuperación de la señal a 600 nm (abajo).



Anexo 11. El decaimiento a 380 nm del transiente del TBO⁺-C6 en acetonitrilo (arriba). El decaimiento a 430 nm del transiente del TBO⁺-C14 en acetonitrilo (abajo).

Cálculo espectros de absorción electrónica.

Tabla S4. Calibración de la funcional para absorción teórica, longitud de onda (λ) and energía (E), and fuerza del oscilador (f) de TBO. Los resultados obtenidos utilizando como modelo de solvente C-PCM (acetonitrilo) y el set de bases 6-311++G (d,p).

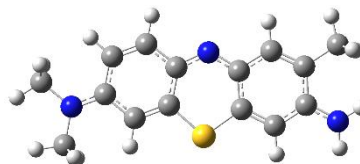
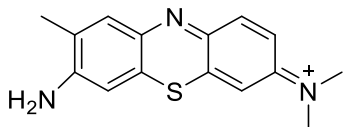
FUNCTIONAL	Exp. λ (nm) (E/eV)	Theor. λ (nm) (E/eV) f	Theor. Deviation (eV)	Functional type
B3LYP	630 (1.96)	524 (2.37) $f=0.78$	0.41	híbrida
PBE1PBE	630 (1.96)	514 (2.41) $f=0.86$	0.45	híbrida
BMK	630 (1.96)	497 (2.49) $f=1.02$	0.53	híbrida
M06	630 (1.96)	520 (2.38) $f=0.84$	0.43	híbrida
B97D	630 (1.96)	567 (2.18) $f=0.42$	0.22	pura
CAM-B3LYP	630 (1.96)	502 (2.47) $f=1.05$	0.51	range-separated hybrid
wB97	630 (1.96)	567 (2.18) $f=0.42$	0.22	range-separated hybrid
wB97xD	630 (1.96)	502 (2.47) $f=1.05$	0.51	range-separated hybrid
HSEH1PBE	630 (1.96)	517(2.40) $f=0.82$	0.44	híbrida

La funcional que mejor representa el valor experimental, es la B97D y wB97.

Se están realizando cálculos con moléculas puntuales y cargas específicas, para ver si mejoran los espectros de absorción

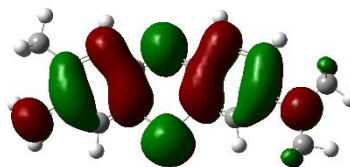
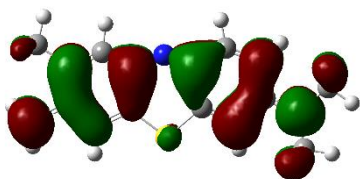
ANÁLISIS PROPIEDADES ELECTRONICAS AZUL DE TOLUIDINA Y DERIVADOS DE AZUL DE TOLUIDINA CON ÁCIDOS GRASOS

TBO

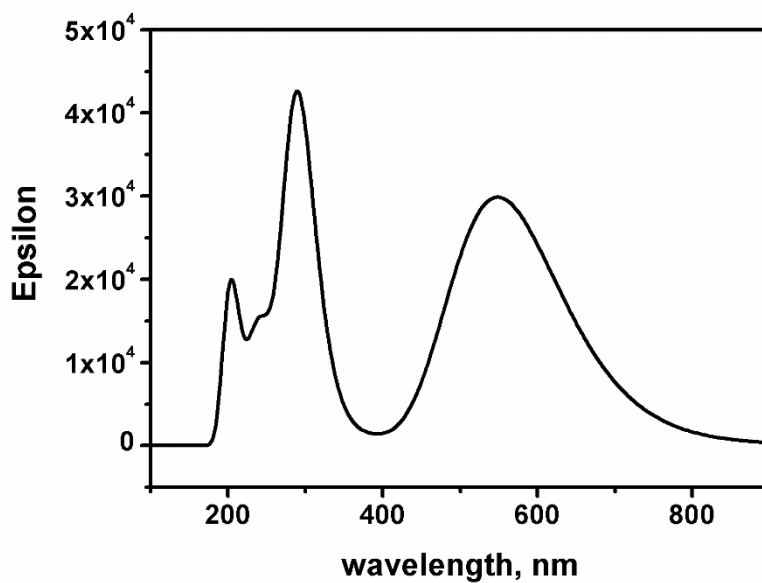


Optimización geométrica B3LYP/6-31++ G(d, p) en ACN, solvente modelado con C-PCM.

Orbitales Moleculares

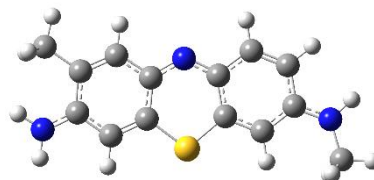
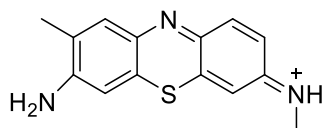


HOMO → LUMO



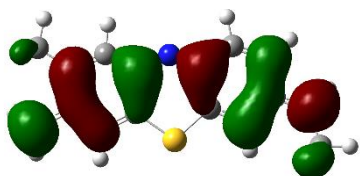
Anexo 12. Espectro de absorción electrónica TBO en ACN. B97D/6-311++G (d, p), solvente modelado por C-PCM.

TBO- sin Metilo

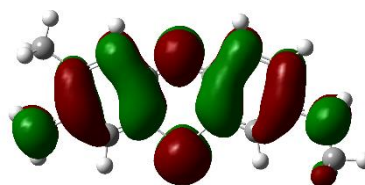


Optimización geométrica B3LYP/6-311++
G(d, p) en ACN, solvente modelado con C-
PCM.

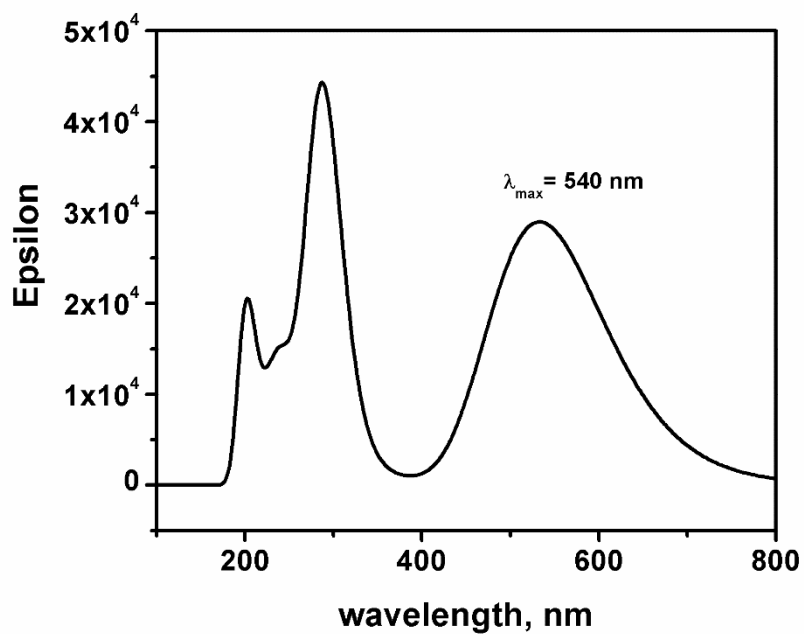
Orbitales Moleculares



HOMO → LUMO

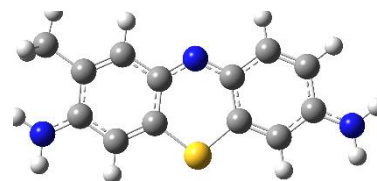
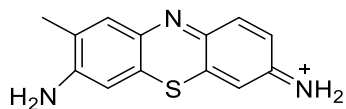


Espectro de absorción electrónica.



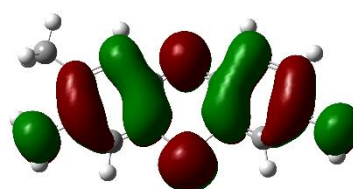
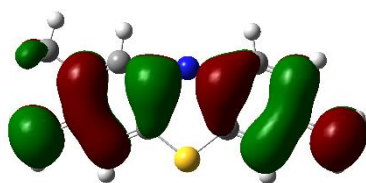
Anexo 13. Espectro de absorción electrónica TBO sin metilo en ACN. B97D/6-311++G (d, p), solvente modelado por C-PCM.

TBO- sin 2 Metilos



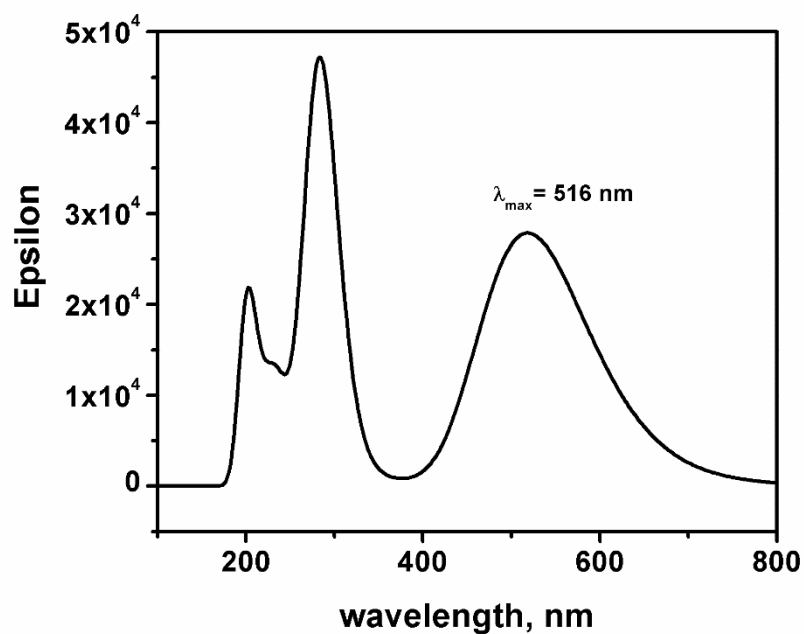
Optimización geométrica B3LYP/6-311++
G(d, p) en ACN, solvente modelado con C-
PCM.

Orbitales Moleculares

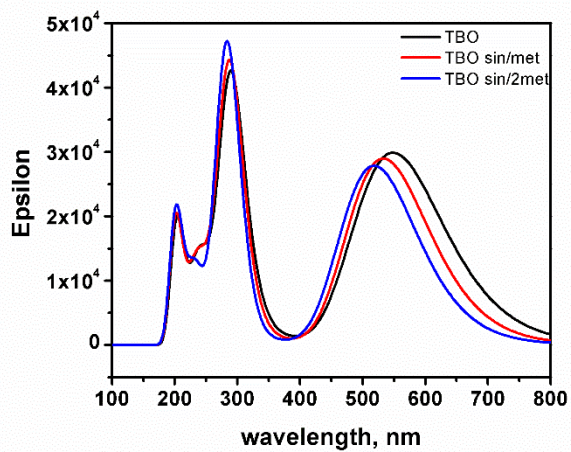


HOMO → LUMO

Espectro de absorción electrónica.

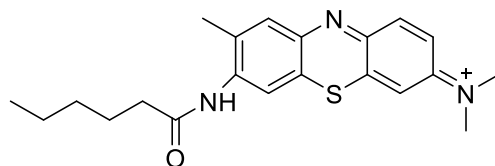


Anexo 14. Espectro de absorción electrónica TBO sin 2 metilos en ACN. B97D/6-311++G (d, p) solvente modelado por C-PCM.

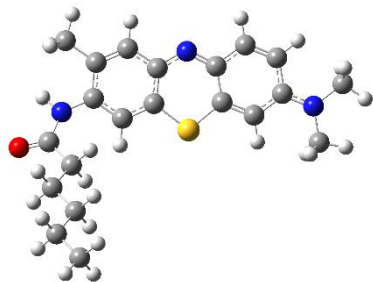


Anexo 15. Espectro de absorción electrónica TBO, TBO sin/metilo y TBO sin / 2 metilos en ACN. B97D/6-311++G (d, p), solvente modelado por C-PCM.

TBO-C6

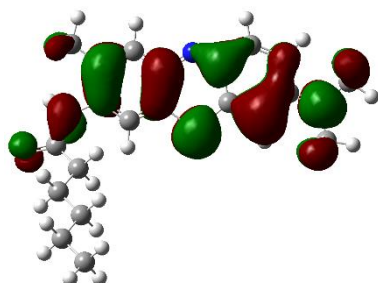


UV-Vis: (CH₃CN) λ_{max} 547 nm, (H₂O) λ_{max} 604 nm. Fluorescence emission: (CH₃CN) λ_{max} 622 nm, (H₂O) λ_{max} 645 nm.

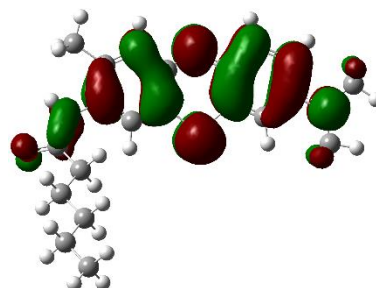


Optimización geométrica B3LYP/6-311++ G(d, p) en ACN, solvente modelado con C-PCM.

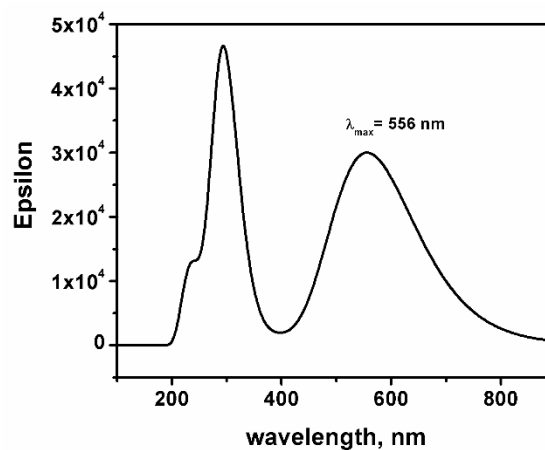
Orbitales Moleculares



HOMO → LUMO

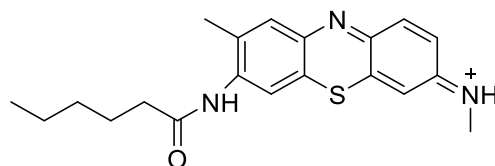


Espectro de absorción electrónica.

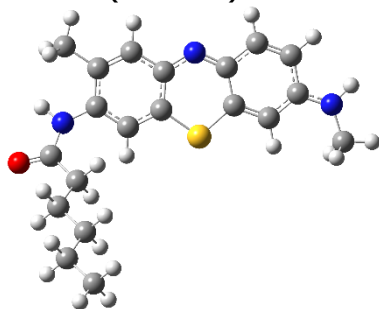


Anexo 16. Espectro de absorción electrónica TBO-C6 en ACN. B97D/6-311++G (d, p) solvente modelado por C-PCM.

TBO-C6 sin metilo

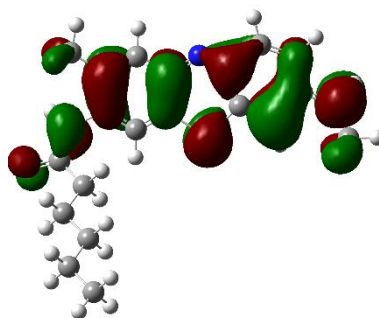


UV-Vis: (CH₃CN) λ_{max} 548 nm, (H₂O) λ_{max} 610 nm. Fluorescence emission: (CH₃CN) λ_{max} 626 nm, (H₂O) λ_{max} 651 nm.

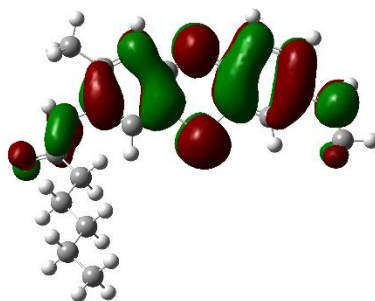


Optimización geométrica B3LYP/6-311++ G(d, p) en ACN, solvente modelado con C-PCM.

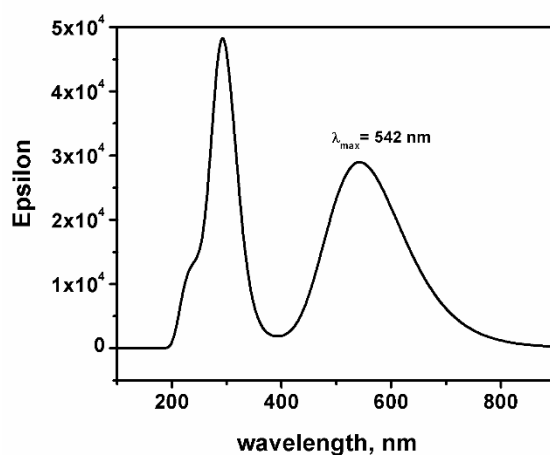
Orbitales Moleculares



HOMO → LUMO

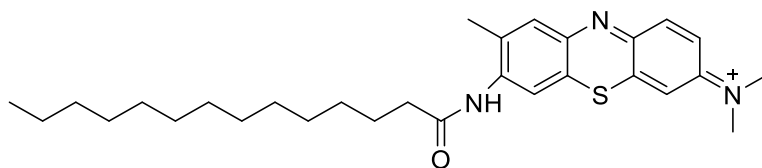


Espectro de absorción electrónica.

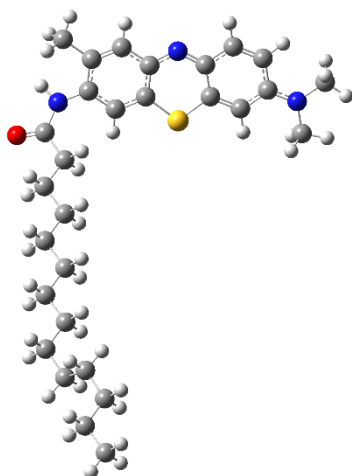


Anexo 17. Espectro de absorción electrónica TBO-C6 sin metilo en ACN. B97D/6-311++G (d, p) solvente modelado por C-PCM.

TBO-C14

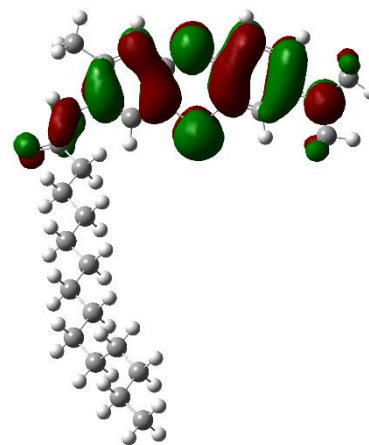
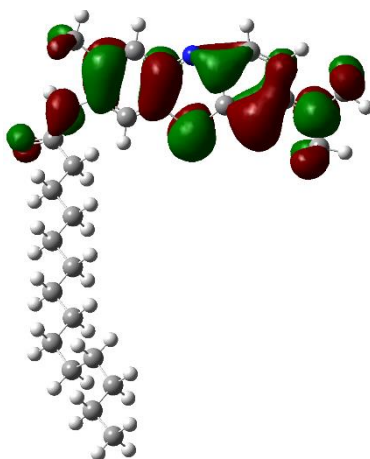


UV-Vis: (CH₃CN) λ_{max} 548 nm , (H₂O) λ_{max} 609 nm. Fluorescence emission: (CH₃CN) λ_{max} 627 nm, (H₂O) λ_{max} 651 nm.



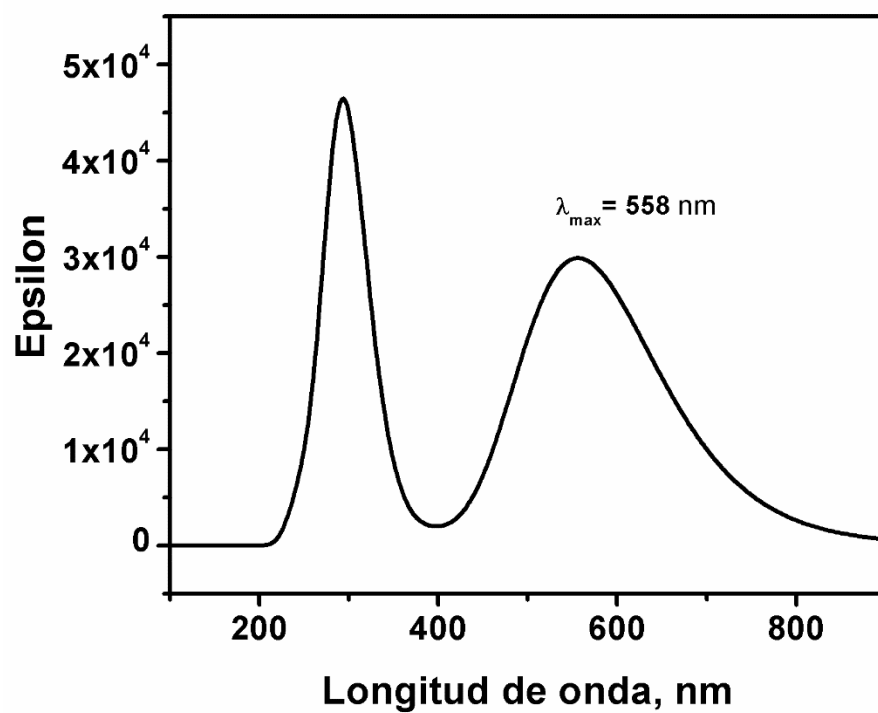
Optimización geométrica B3LYP/6-311++
G(d, p) en ACN, solvente modelado con C-PCM.

Orbitales Moleculares



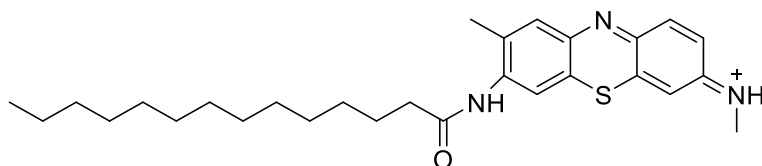
HOMO → LUMO

Espectro de absorción electrónica.

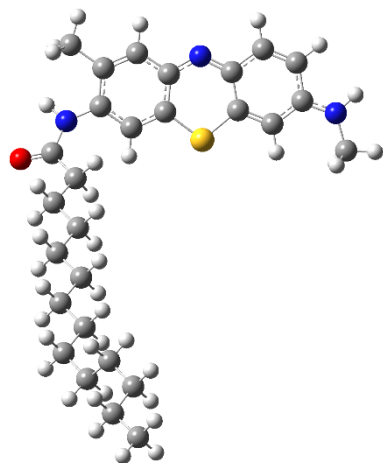


Anexo 18. Espectros de absorción electrónica TBO-C14 en ACN. B97D/6-311++G (d, p) en ACN modelado por C-PCM.

TBO-C14 sin metilo

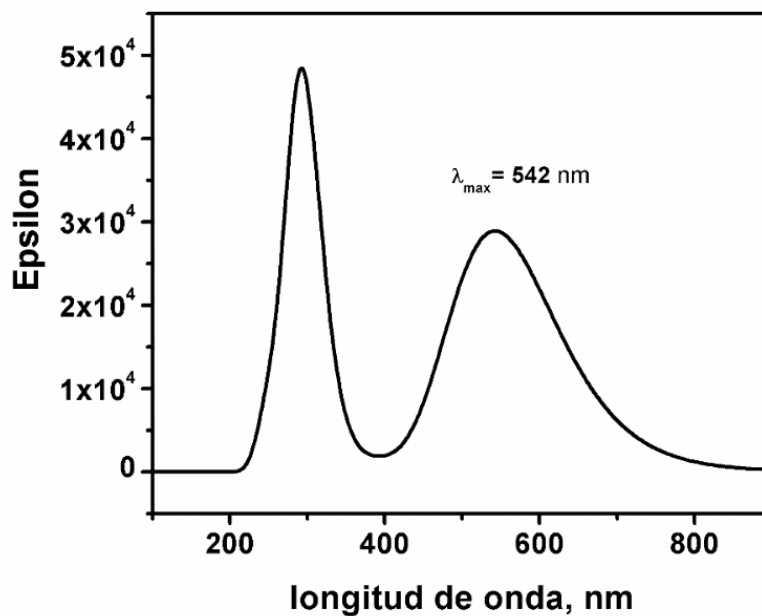


UV-Vis: (CH₃CN) λ_{max} 557 nm, (H₂O) λ_{max} 609 nm. Fluorescence emission: (CH₃CN) λ_{max} 625 nm, (H₂O) λ_{max} 648 nm.

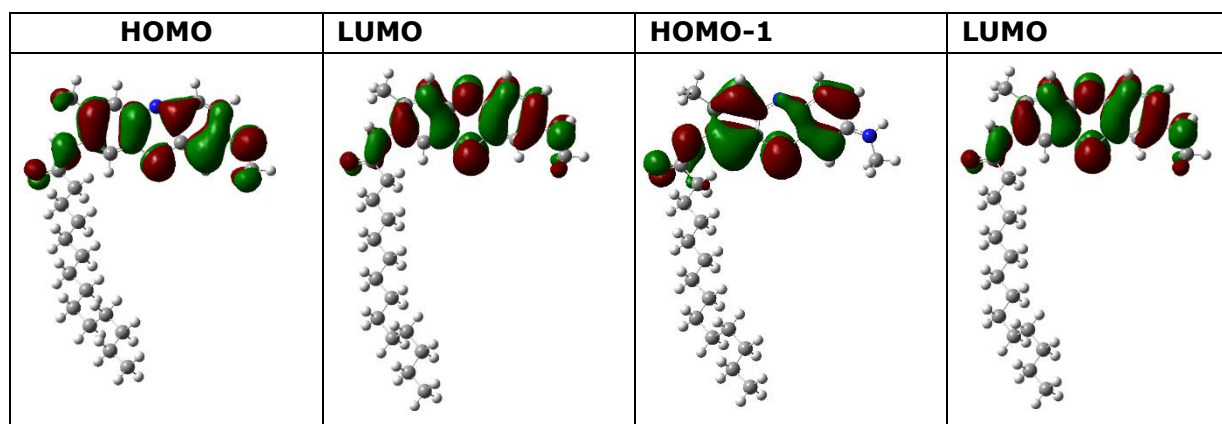


Optimización geométrica B3LYP/6-311++ G(d, p) en ACN, solvente modelado con C-PCM.

Espectro de absorción electrónica

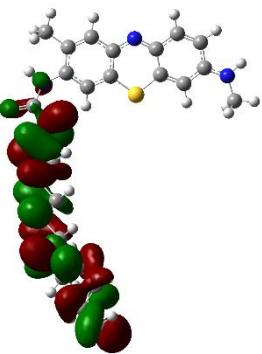
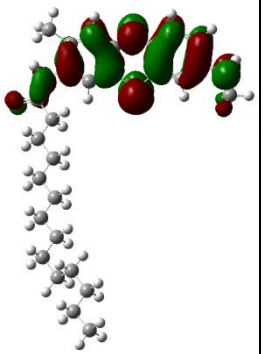
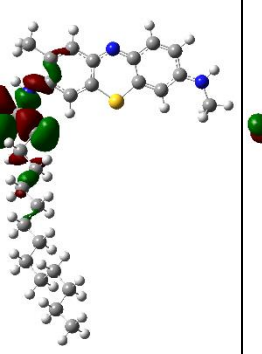
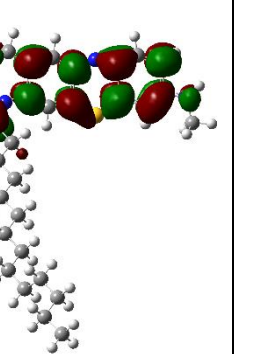
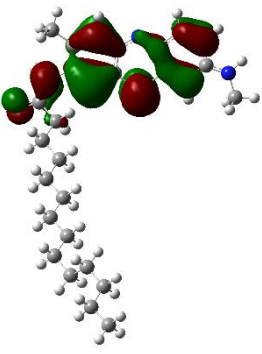
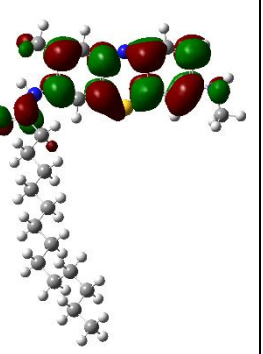
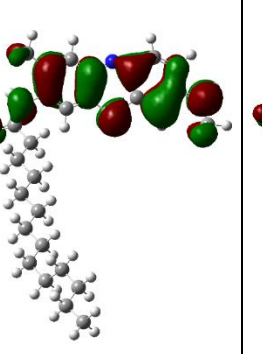
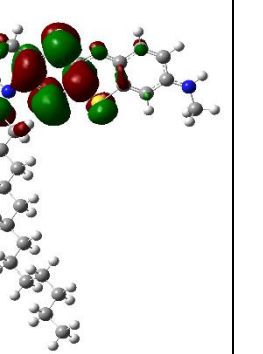


Anexo 19. Espectros de absorción electrónica TBO-C14 sin metilo en ACN. B97D/6-311++G (d, p) en ACN modelado por C-PCM.



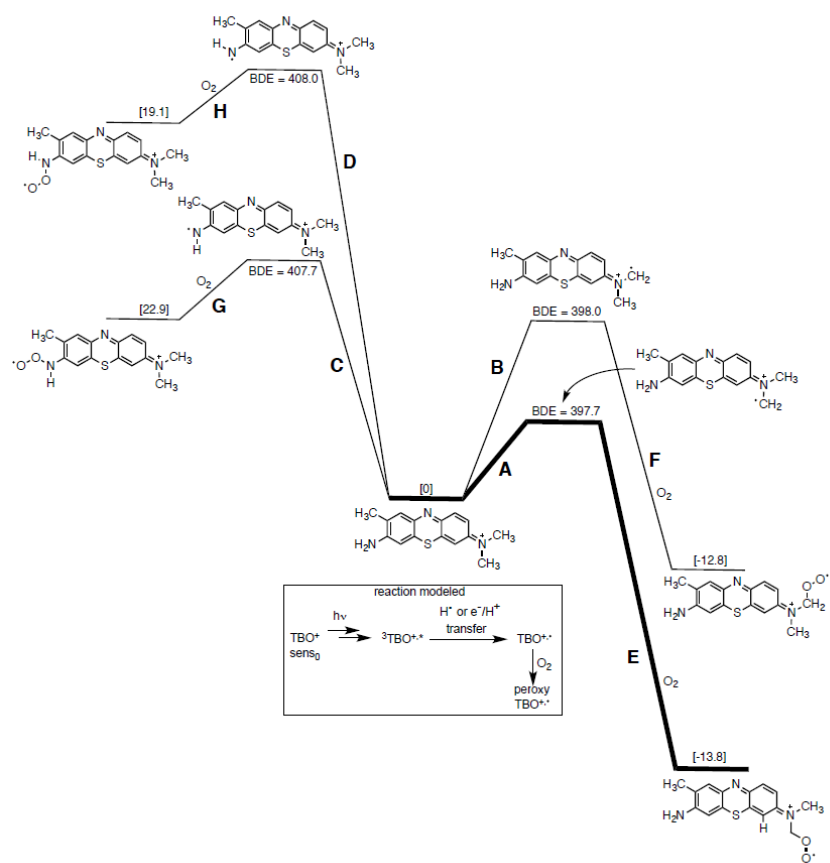
Anexo 20. Orbitales moleculares

En el máximo de absorción existe la contribución de dos transiciones electrónicas: **HOMO→LUMO y HOMO-1→ LUMO**

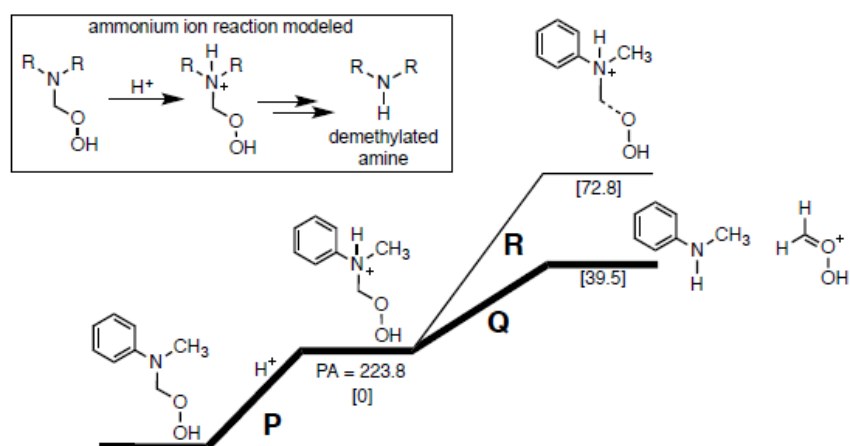
HOMO-19	LUMO	HOMO-2	LUMO+1
			
HOMO-1	LUMO+1	HOMO	LUMO+2
			

Anexo 21. La absorción en 290nm presenta 4 transiciones electrónicas:

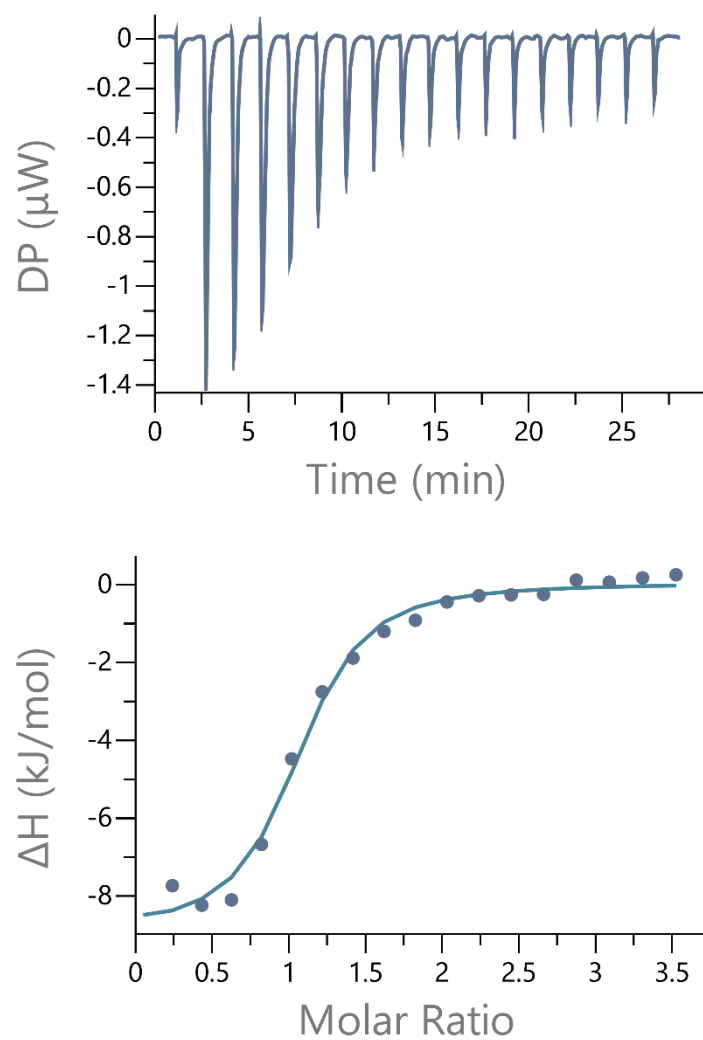
HOMO-19 → LUMO, HOMO-2 → LUMO+1, HOMO-1 → LUMO+2, HOMO → LUMO+2



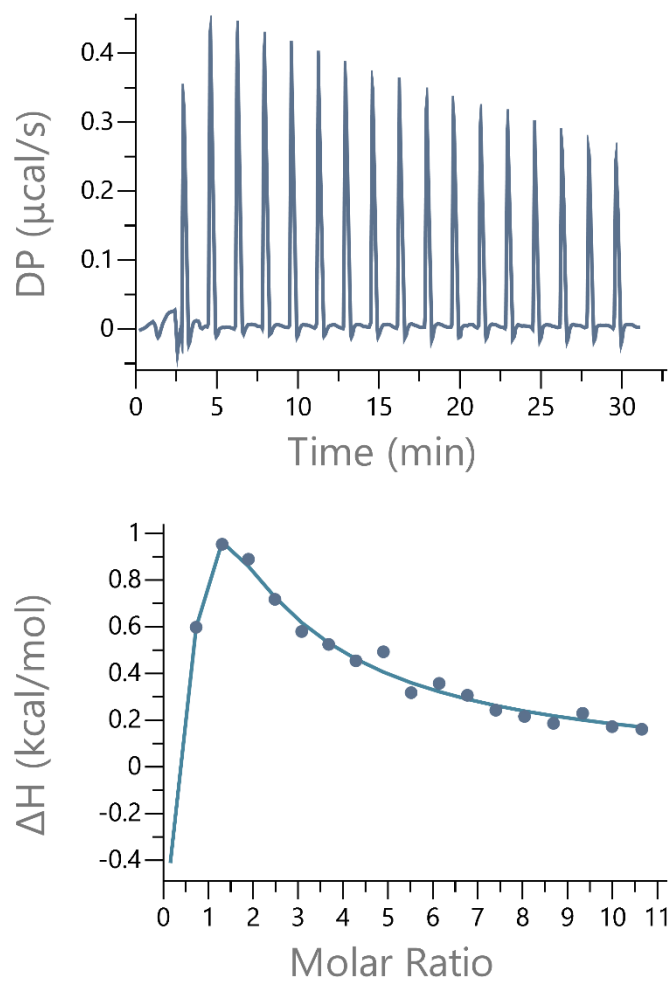
Anexo 22. Cálculos de DFT de posible mecanismo de pérdida del metilo en el TBO⁺.



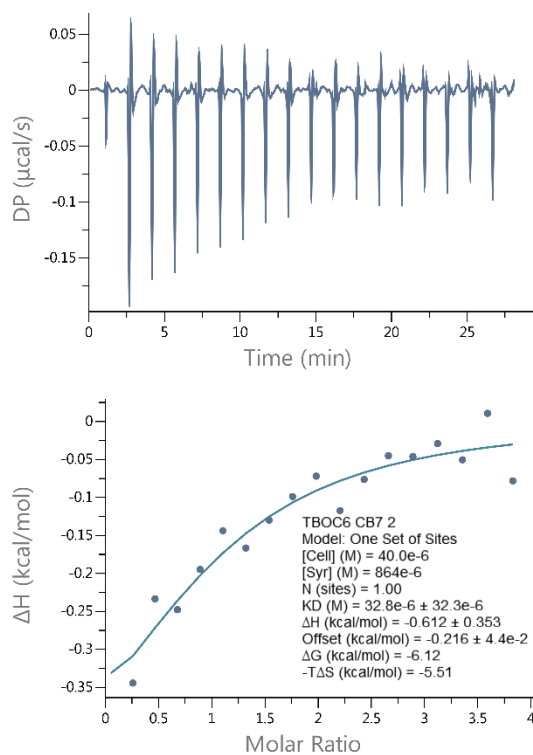
Anexo 24. Cálculos de DFT de posible mecanismo de pérdida del metilo en el TBO⁺.



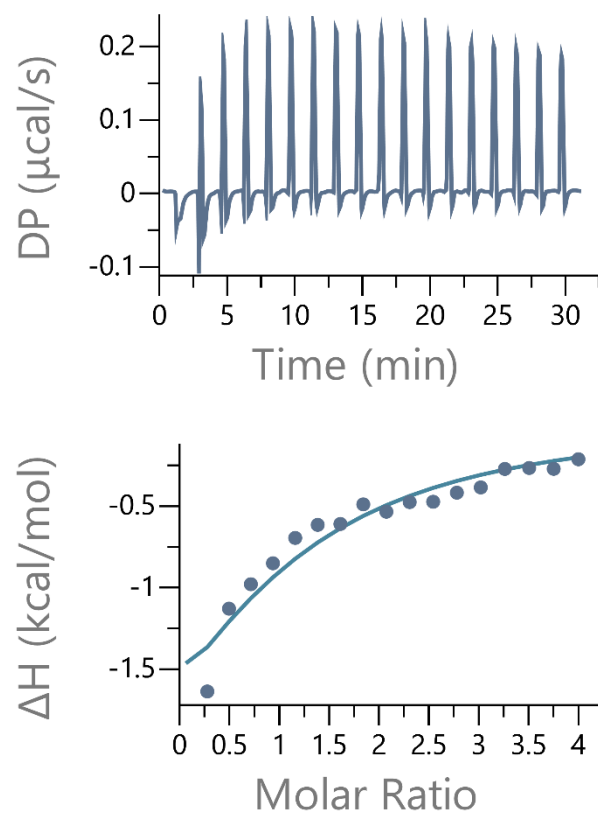
Anexo 25. Isotherma de ITC para la inyección del derivado TBO^+ y el $\text{CB}[7]$.



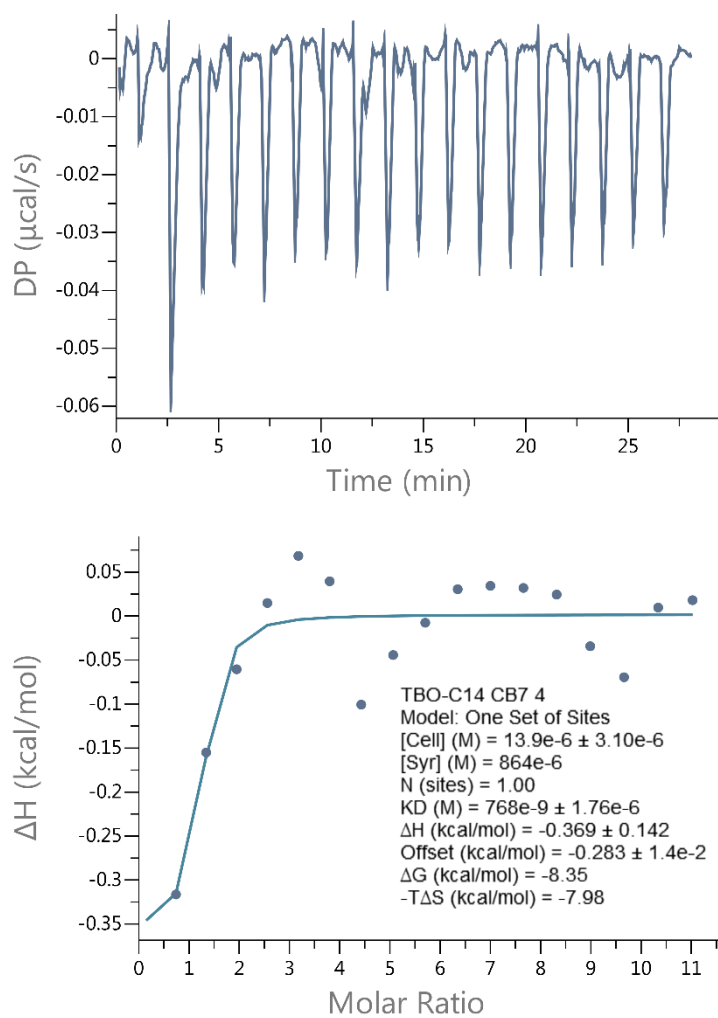
Anexo 26. Isoterma de ITC para la inyección del TBO⁺ y la HSA.



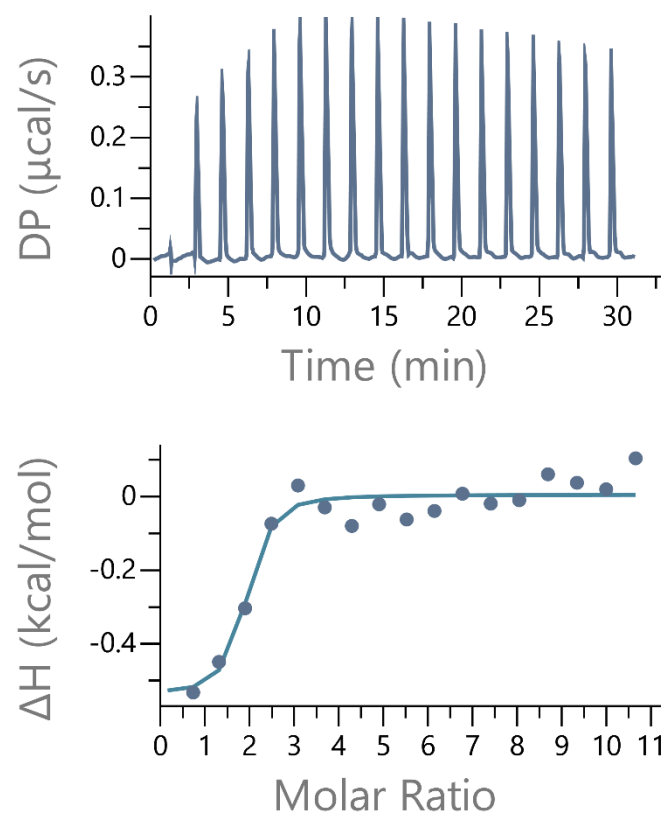
Anexo 27. Isoterma de ITC para la inyección del derivado TBO⁺-C6 y el CB[7].



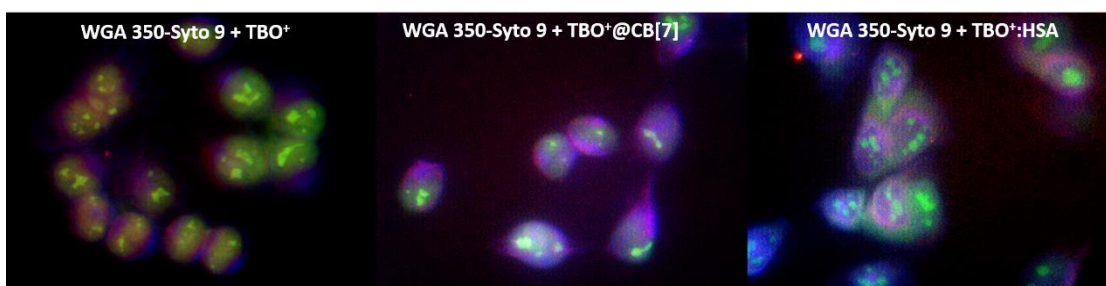
Anexo 28. Isotherma de ITC para la inyección del derivado TBO⁺-C6 y la HSA.



Anexo 29. Isoterma de ITC para la inyección del derivado TBO⁺-C14 y el CB[7].



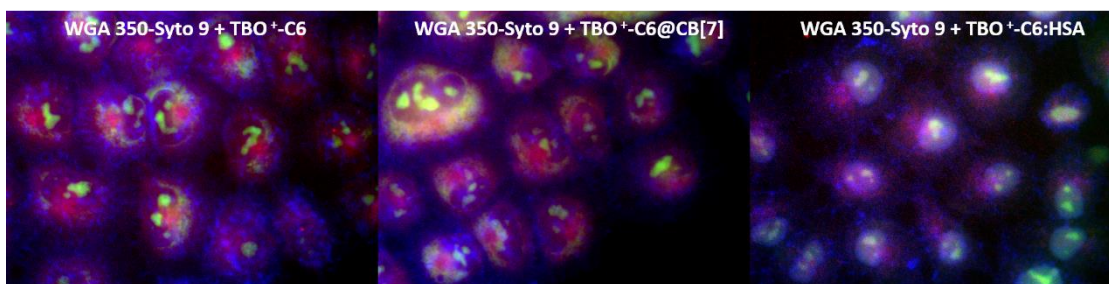
Anexo 30. Isotherma de ITC para la inyección del derivado TBO⁺-C14 y la HSA.



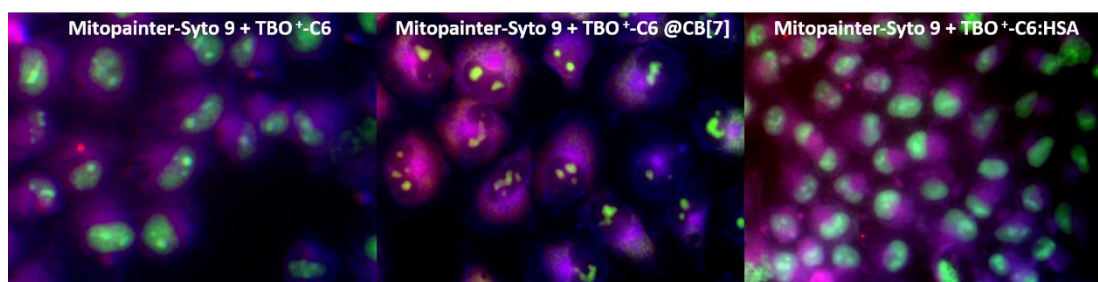
Anexo 31. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con WGA Alexa 350 (canal azul), SYTO 9 (canal verde) y la incorporación de TBO⁺ 0.4 μ M solo (canal rojo) (izquierda) y por medio de los sistema de transporte de CB[7] 50 μ M (TBO⁺@CB[7], centro) y HSA 15 μ M (TBO⁺:HSA, derecha). La superposición de los canales muestra en morado la localización subcelular del TBO⁺.



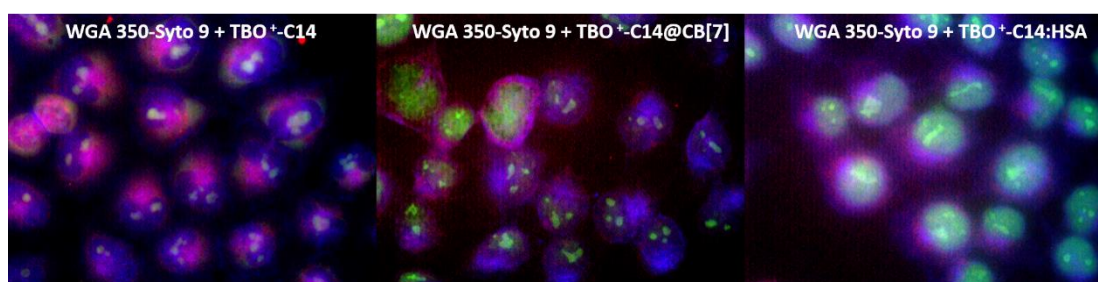
Anexo 32. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con Mitopainter Blue (canal azul), SYTO 9 (canal verde) y la incorporación de TBO⁺ 0.4 μ M solo (canal rojo) (izquierda) y por medio de los sistema de transporte de CB[7] 50 μ M (TBO⁺@CB[7], centro) y HSA 15 μ M (TBO⁺:HSA, derecha). La superposición de los canales muestra en morado la localización subcelular del TBO⁺.



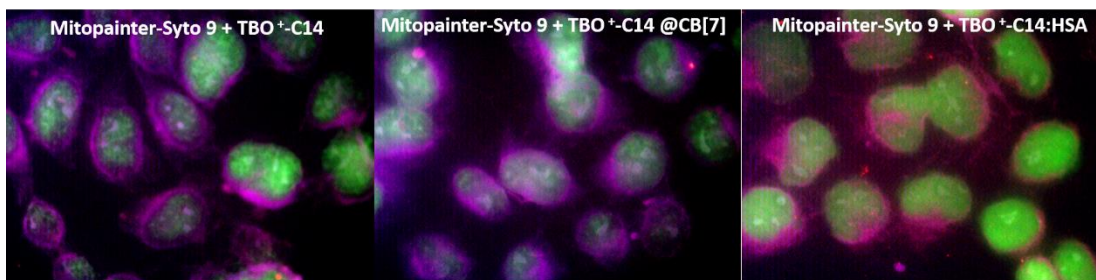
Anexo 33. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con WGA Alexa 350 (canal azul), SYTO 9 (canal verde) y la incorporación de TBO⁺-C6 0.4 μ M solo (canal rojo) (izquierda) y por medio de los sistema de transporte de CB[7] 50 μ M (TBO⁺C6@CB[7], centro) y HSA 15 μ M (TBO⁺C6:HSA, derecha). La superposición de los canales muestra en morado la localización subcelular del TBO⁺-C6.



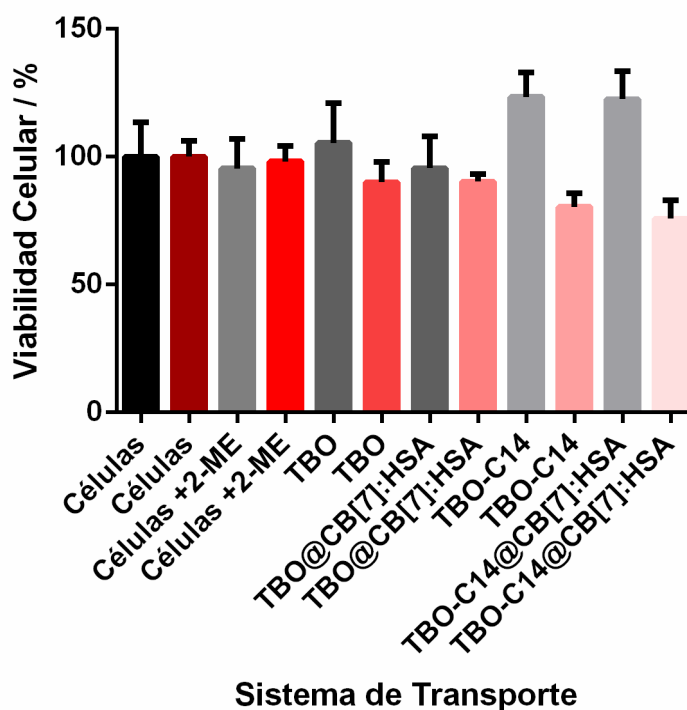
Anexo 34. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con Mitopainter Blue (canal azul), SYTO 9 (canal verde) y la incorporación de TBO⁺-C6 0.4 μ M solo (canal rojo) (izquierda) y por medio de los sistema de transporte de CB[7] 50 μ M (TBO⁺C6@CB[7], centro) y HSA 15 μ M (TBO⁺C6:HSA, derecha). La superposición de los canales muestra en morado la localización subcelular del TBO⁺-C6.



Anexo 35. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con WGA Alexa 350 (canal azul), SYTO 9 (canal verde) y la incorporación de TBO⁺-C14 0.4 μ M solo (canal rojo) (izquierda) y por medio de los sistema de transporte de CB[7] 50 μ M (TBO⁺-C14@CB[7], centro) y HSA 15 μ M (TBO⁺-C14:HSA, derecha). La superposición de los canales muestra en morado la localización subcelular del TBO⁺-C14.



Anexo 36. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa teñidas con Mitopainter Blue (canal azul), SYTO 9 (canal verde) y la incorporación de TBO⁺-C14 0.4 μ M solo (canal rojo) (izquierda) y por medio de los sistema de transporte de CB[7] 50 μ M (TBO⁺C14@CB[7], centro) y HSA 15 μ M (TBO⁺C14:HSA, derecha). La superposición de los canales muestra en morado la localización subcelular del TBO⁺-C14.



Anexo 37. Estudio del efecto sinérgico del 2-metoxiestradiol en la fototoxicidad de los fotosensibilizadores TBO⁺ y TBO⁺-C14 y sus respectivos sistemas de transporte biosupramolecular. Las células fueron pre-incubadas durante 30 minutos con 3 μ M del 2-metoxiestradiol en 100 μ L de medio sin suplementar MC (sin rojo de fenol), luego lavadas dos veces con PBS y se les adicionó las concentraciones de trabajo previamente descritas y se realizó el experimento de fototoxicidad igual que los anteriores. Los sistemas fueron incorporados durante 90 minutos e irradiados durante 90 minutos. Barras oscuras controles en oscuro y barras en rojo muestras irradiadas. TBO⁺ y TBO⁺-C14 0.4 μ M solos y con el sistema de transporte en presencia de CB[7] 50 μ M y HSA 15 μ M (TBO⁺@CB[7]:HSA) y (TBO⁺-C14@CB[7]:HSA).

Publicaciones

PAPER



Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*,
2017, **19**, 2574

Photochemical behavior of biosupramolecular assemblies of photosensitizers, cucurbit[*n*]urils and albumins†

Javiera Cáceres,^a José Robinson-Duggon,^a Anita Tapia,^a Constanza Paiva,^a
Matías Gómez,^a Cornelia Bohne^b and Denis Fuentealba^{*a}

Biosupramolecular assemblies combining cucurbit[*n*]urils (CB[*n*]s) and proteins for the targeted delivery of drugs have the potential to improve the photoactivity of photosensitizers used in the photodynamic therapy of cancer. Understanding the complexity of these systems and how it affects the properties of photosensitizers is the focus of this work. We used acridine orange (AO⁺) as a model photosensitizer and compared it with methylene blue (MB⁺) and a cationic porphyrin (TMPyP⁴⁺). Encapsulation of the photosensitizers into CB[*n*]s (*n* = 7, 8) modified their photoactivity. In particular, for AO⁺, the photo-oxidation of HSA was enhanced in the presence of CB[7]; meanwhile it was decreased when included into CB[8]. Accordingly, peroxide generation and protein fragmentation were also increased when AO⁺ was encapsulated into CB[7]. The triplet excited state lifetimes of all the photosensitizers were lengthened by their encapsulation into CB[*n*]s, while the singlet oxygen quantum yield was enhanced only for AO⁺ and TMPyP⁴⁺, but it decreased for MB⁺. The results obtained in this work prompt the necessity of further investigating these kinds of hybrid assemblies as drug delivery systems because of their possible applications in biomedicine.

Received 12th November 2016,
Accepted 14th December 2016

DOI: 10.1039/c6cp07749h

www.rsc.org/pccp

Introduction

The high costs of drug discovery and development, and the extensive time needed for approval impose a big economical challenge for the pharmaceutical industry over the next few decades.¹ One plausible strategy to overcome this issue is potentiating drugs that already exist and/or tailoring them for the treatments of specific diseases, which can be done with drug delivery systems (DDSs).^{2–5} DDSs not only have the potential to improve drug transport, but can also help to control the release of the drug and to target specific tissues such as cancer,⁶ which continues to demand important development efforts for better prognosis.¹

One promising treatment for several types of cancer is photodynamic therapy (PDT), which is based on the action of light on a photoactive drug (photosensitizer), which in the presence of oxygen induces cytotoxicity due to the generation

of reactive oxygen species (ROS).^{7–10} This is an area of research where the delivery system can play an essential role in improving biodistribution and tumor accumulation.⁸ Many vehicles have been proposed to deliver payloads of drugs such as nanoparticles, quantum dots, proteins, macrocycles, polymers and liposomes, among others.¹¹ DDSs involving photoactive drugs that have been recently studied include polymeric nanoparticles,^{12–15} calcium carbonate microparticles,¹⁶ graphene oxide nanosheets,¹⁷ photo-responsive nanocarriers,^{18,19} and novel optical fibers which can deliver the photoactive drug and/or only singlet oxygen.^{20–22} In spite of the many varieties of DDSs being studied, only a few of them have been marketed to date.⁶

Albumin conjugates have been investigated extensively as drug carriers over the last decade,^{23–25} and constitute one of the examples of DDSs that have effectively reached the public.^{6,25} Albumins are natural fatty acid carriers due to their multiple hydrophobic binding sites,^{26,27} a property that is favorable for the transport of many drugs.^{28,29} The albumin's long circulation times in the bloodstream, small size, lack of immunogenicity and great stability make it ideal for drug delivery applications.^{6,11,23–25} Additionally, albumins can penetrate the defective vascularity of tumors and be retained.⁶ In spite of these advantages, when it comes to photoactive drugs, albumins modify the photochemistry of the drugs,^{30,31} and often reduce the action of photosensitizers.^{32–35} Moreover, there is no general strategy to release drugs from albumins.

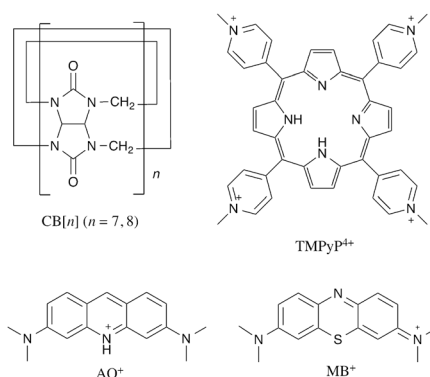
^a Laboratorio de Estructuras Biosupramoleculares, Departamento de Química Física, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
E-mail: dlfuente@uc.cl

^b Department of Chemistry, University of Victoria, P.O. Box 1700 STN CSC, Victoria, BC, V8W 2Y2, Canada

† Electronic supplementary information (ESI) available: Absorption spectra of AO⁺ species during irradiation in the presence of HSA, HSA photo-oxidation mediated by an MB⁺@CB[7] complex in D₂O, and singlet oxygen detection by ABMA. See DOI: 10.1039/c6cp07749h

On the other hand, cucurbit[*n*]urils (CB[*n*]s) have recently emerged as potential candidates for drug delivery due to their ability to bind several types of drugs.^{36–38} Although not yet approved for use, CB[*n*]s are expected to follow cyclodextrins in the near future.^{11,39} Unlike cyclodextrins, binding to CB[*n*]s is extremely high for a synthetic macrocycle, reaching binding constants higher than 10^{15} M^{-1} .^{40,41} CB[*n*]s have been shown to be non-toxic,^{42–44} and they are able to cross the cell membrane,⁴⁵ and are highly soluble in biological fluids.³⁷ One important advantage of CB[*n*]s over proteins is that drug release is easily controlled by competitive host–guest chemistry.^{40,46–49}

The combination of the properties of albumins and CB[*n*]s in one biosupramolecular drug delivery vehicle could be of much benefit for the field. This kind of architecture was first reported by W. Nau, A. C. Bhasikuttan and co-workers for the brilliant green, CB[7] and bovine serum albumin (BSA) complex.⁵⁰ Later work by X. Wang and collaborators reported on the interaction of the well-known photosensitizer tetra(1-methylpyridinium)porphyrin (TMPyP⁴⁺) with CB[8] and BSA,⁵¹ opening a new scope for the use of CB[*n*]s in PDT applications. Such ternary complexes are very scarce in the literature and their applications are therefore limited. We recently reported on the interaction of another well-known photosensitizer acridine orange (AO⁺) with CB[7] and human serum albumin (HSA), and found no such interaction with the protein in the presence of CB[8].⁵² The latter is an interesting model system in the first place because AO⁺ is active as a PDT agent *in vivo*,^{53,54} and this molecule forms complexes with HSA, CB[7] or CB[8], and simultaneously with CB[7] and HSA, allowing the possibility of comparing the photoactivity of a broad range of AO⁺ species. Therefore, we set out to investigate the photoactivity of different complexes of AO⁺ and obtain further insights into the mechanism of action and ROS generation in the biosupramolecular complex. We compared the photoactivity of AO⁺ with TMPyP⁴⁺ and methylene blue (MB⁺), another well-known photosensitizer (Scheme 1), which shone light on the importance of the ternary biosupramolecular complex for drug photoactivity. Our results show that photoactivity cannot be predicted solely from the photo-physical parameters of the photosensitizers in solution and in complex with CB[*n*] because the mode of interaction of the various components in the system with the protein needs to be known.



Scheme 1 Chemical structures of CB[*n*]s (*n* = 7, 8), AO⁺, TMPyP⁴⁺ and MB⁺.

Experimental

Chemicals

Cucurbit[*n*]urils (CB[*n*], *n* = 7, 8), acridine orange (AO⁺), tetra-(1-methylpyridinium)porphyrin (TMPyP⁴⁺), bis(cyclopentadienyl)cobalt(III) hexafluorophosphate (Cob⁺), 9,10-anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid (ABMA), human serum albumin (HSA), bovine serum albumin (BSA), sodium azide (NaN₃) and deuterium oxide (D₂O) were obtained from Sigma and used without further purification. Methylene blue (MB⁺) was obtained from Merck and was recrystallized from benzene/MeOH (3 : 1). Potassium ferricyanide (FeCy) was obtained from Merck and used without further purification.

Sample preparation

Stock solutions of the photoactive molecules (AO⁺, MB⁺ or TMPyP⁴⁺) were prepared in water to approximately 1 mM and the actual concentration was assessed using their molar extinction coefficients (AO⁺ $\epsilon_{492\text{nm}} 6.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$,⁵⁵ MB⁺ $\epsilon_{664\text{nm}} 8.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$,⁵⁶ TMPyP⁴⁺ $\epsilon_{422\text{nm}} 2.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).⁵⁷ Stock phosphate buffer (PB) solutions were prepared by mixing 100 mM Na₂HPO₄ and NaH₂PO₄ solutions to achieve a pH of 7.0 (pH meter Hanna HI2221). Albumin (HSA or BSA) stock solutions were prepared at a concentration of 0.5 mM in 10 mM PB pH 7.0. Stock solutions of CB[7] were prepared in water to approximately 1 mM. Saturated solutions of CB[8] were prepared in 10 mM PB pH 7.0 and filtered. Both CB[*n*]s were titrated against a known concentration of Cob⁺ using UV-Vis spectroscopy.⁵⁸

Aliquots of the stock solutions of the photoactive molecules, CB[*n*]s, albumin and PB were mixed directly in a spectrophotometric cell and the volume was completed to 3.00 mL with water. Final concentrations were 5 μM for AO⁺ and TMPyP⁴⁺, 10 μM for MB⁺, 50 μM for CB[7], 35 μM for CB[8], 5 μM for BSA, 25 μM for HSA and 10 mM PB pH 7.0. For the samples in the presence of additives, FeCy was added to a final concentration of 1 mM and NaN₃ to 10 mM. D₂O-enriched solutions were prepared by diluting stock solutions in D₂O instead of water (> 80% D₂O).

Irradiation set-up

Sample irradiation was carried out in custom-built PTI equipment working with a 150 W Xe lamp. The irradiation wavelength was selected using a monochromator (10 nm bandwidth). The sample was stirred and the temperature was kept at 25 °C using a water bath. All the samples were irradiated at their absorption maxima. AO⁺ was irradiated at 492 nm in the absence of CB[*n*]s and at 485 nm or 465 nm in the presence of CB[7] or CB[8], respectively.⁵² The irradiance absorbed by the samples was the same within error and equal to $31 \pm 3 \text{ W m}^{-2}$ (YSI Kettering 65A radiometer). TMPyP⁴⁺ was irradiated at 422 nm both in the absence and in the presence of CB[*n*]s since the absorption maximum did not change upon complexation.⁵¹ MB⁺ was irradiated at 664 nm in the absence of CB[*n*]s and at 659 nm in the presence of CB[7].^{59,60}

Measurements

Protein photo-oxidation was assessed by the loss in the tryptophan fluorescence exciting the samples at 295 nm and measuring the

emission at 350 nm. Upon irradiation, the samples were measured every 5 min for a total of 30 min. The absorbance at 295 nm was constant throughout the irradiation, and therefore no inner-filter correction was applied. For the sample in the presence of AO^+ and CB[7], additional experiments were performed in the absence and presence of FeCy, D_2O and NaN_3 . Photo-oxidation experiments were performed in triplicate ($\leq 3\%$ error).

Total peroxide formation and hydroperoxides were quantified by the FOX-2 method,^{61,62} according to a published procedure.⁶³ Briefly, during the irradiation, the samples were withdrawn every 5 min and mixed in a proportion of 1 : 10 with FOX reagent containing 150 μM xlenol orange and 250 μM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ in 25 mM sulfuric acid. The absorbance of the product was measured at 560 nm and compared to a standard curve made with H_2O_2 . The quantification of hydroperoxides was done in the presence of catalase. The experiments were performed at least three times ($\leq 10\%$ error).

Protein electrophoresis (SDS-PAGE) was performed to measure HSA fragmentation and cross-linking. A stacking gel of 3% acrylamide and a resolving gel of 8% acrylamide were used. The proteins were denatured by boiling the samples for 5 min in loading buffer containing 62.5 mM Tris buffer pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 100 mM β -mercaptoethanol and traces of bromophenol blue. The running buffer contained 25 mM Tris pH 8.3, 400 mM glycine and 0.1% SDS, and electrophoresis was performed at 50 V for 20 min and at 100 V for 60 min. Silver staining was used to develop the gels and the electrophoretic pattern was analyzed with a GelMax Imager and Doc-It[®]LS software from UVP. The results of the electrophoresis were consistent for repeated samples and the analysis shown herein corresponds to a representative experiment.

Laser flash photolysis was used to measure triplet excited state lifetimes for AO^+ and its complex with CB[7]. The samples were excited using a 266 nm Nd:YAG laser (Quanta-Ray Lab 130-4, Spectra Physics) and the excited state was detected by monitoring the changes in the absorbance of the samples using a Xe-arc lamp from Oriel.⁶⁴ The concentration of the samples was 5 μM ($A_{266\text{nm}} \sim 0.2$) and the samples were degassed with nitrogen for at least 20 min before the measurements. Decays of the triplet excited state of AO^+ in the absence and presence of 50 μM CB[7] were measured at 550 nm,⁵⁵ and at least 10 decays were averaged. The decays were fit to a monoexponential function to obtain the triplet excited state lifetimes.

Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) was detected by the bleaching of ABMA (1.6 μM) by fluorescence emission (Ex 395 nm/Em 407 nm). It must be noted that fluorescence was used only for a relative

estimation of the production of singlet oxygen by the different complexes. To determine $^1\text{O}_2$ quantum yields (Φ_Δ) we used a high concentration of ABMA (200 μM) to trap all $^1\text{O}_2$,⁶⁵ and then the rate of consumption of ABMA was determined by following the absorbance at 380 nm during the course of irradiation. The rate of ABMA bleaching observed for irradiated samples of AO^+ in the absence or presence of CB[*n*]s was compared to Eosin Y as a standard ($\Phi_\Delta = 0.50$).⁶⁶ The absorbance of Eosin Y at the irradiation wavelength was matched to that of AO^+ species. The Φ_Δ value was calculated from the slopes of first-order plots as shown in eqn (1).⁶⁷ Measurements were performed in triplicate.

$$\frac{\Phi_{\Delta \text{ sample}}}{\Phi_{\Delta \text{ standard}}} = \frac{(-d \ln A / dt)_{\text{sample}}}{(-d \ln A / dt)_{\text{standard}}} \quad (1)$$

Results and discussion

Binding of AO^+ , MB^+ and TMPyP^{4+} to serum albumins, CB[*n*]s and ternary interactions

All the photoactive molecules used in this work bind to serum albumins with high affinity,^{50–52,68–70} and the binding constants reported in the literature are summarized in Table 1. We recently reported spectroscopic evidence for the binding of AO^+ close to Trp-214 in HSA, suggesting that this molecule binds to Sudlow's site I.⁵² The data indicated mainly a 1 : 1 interaction, although some minor binding to other sites could not be discarded.⁵² A similar interaction was previously reported for AO^+ with BSA, although with lower affinity ($< 5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$).⁶⁹ The same type of binding has been reported for MB^+ with HSA, where electrostatic interactions played a major role in the stabilization of the complex.^{35,70} The cationic porphyrin TMPyP^{4+} also binds to BSA through electrostatic interactions and the binding is favored at slightly basic pH.⁶⁸

Both AO^+ and MB^+ bind with a higher affinity to CB[7] compared to HSA (Table 1), and form 1 : 1 inclusion complexes (denoted $\text{AO}^+ @ \text{CB}[7]$ and $\text{MB}^+ @ \text{CB}[7]$).^{71,72} On the other hand, TMPyP^{4+} binds to CB[7] with a lower affinity than to BSA (Table 1).⁷³ This porphyrin can bind up to four CB[7] molecules, but the cooperative effect of sequential CB[7] binding to TMPyP^{4+} has not been analyzed.⁷³ The case is different for CB[8], which can bind up to two AO^+ or MB^+ molecules inside its cavity forming 2 : 1 complexes (denoted $(\text{AO}^+)_2 @ \text{CB}[8]$ and $(\text{MB}^+)_2 @ \text{CB}[8]$). It must be noted that the formation of 1 : 1 and 2 : 1 complexes with CB[8] is stepwise, and their relative abundance depends on the concentration of

Table 1 Binding constants (*K*) for AO^+ , MB^+ and TMPyP^{4+} with albumins (HSA or BSA), CB[*n*] (*n* = 7, 8) and protein–CB[*n*] interactions

	$K_{\text{Albumin}}/\text{M}^{-1}$	$K_{\text{CB}[7] \text{ 1:1}}/\text{M}^{-1}$	$K_{\text{CB}[8] \text{ 2:1}}/\text{M}^{-2}$	$K_{\text{Ternary 1:1:1}}/\text{M}^{-1}$
AO^+	$(2.0 \pm 0.5) \times 10^5$ (HSA) ^a	$(3 \pm 1) \times 10^6$ ^a	$(4 \pm 1) \times 10^{14}$ ^a	$(3.5 \pm 0.8) \times 10^4$ (HSA–CB[7]) ^a
MB^+	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^5$ (HSA) ^b $(4.06 \pm 0.04) \times 10^4$ (HSA) ^c	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^7$ ^d	$(1.1 \pm 0.5) \times 10^{16}$ ^d	—
TMPyP^{4+}	7.3×10^3 (BSA) ^e 1.3×10^5 (BSA) ^f	8.2×10^4 ^g	—	4.30×10^5 (BSA–CB[8]) ^f

^a From ref. 52 in 10 mM PB pH 7.0. ^b From ref. 35 in 100 mM PBS pH 7.4. ^c From ref. 70 in 50 mM Tris–HCl buffer pH 7.4. ^d From ref. 71 in water pH 5.5. ^e From ref. 68 in 20 mM PB pH 5.0 at low HSA concentration; errors not reported. ^f From ref. 51 in 5 mM PB pH 7.0; errors not reported. ^g From ref. 73 in water pH 4.0; errors not reported.

the dye and the macrocycle.⁵² There is likely an interaction between TMPyP⁴⁺ and CB[8], but there are no reported binding constants.⁵¹

CB[8] can also bind two different molecules and form a 1:1:1 ternary complex, and this is particularly interesting when one of the components is a protein, as the one reported for TMPyP⁴⁺ and BSA, where a tryptophan residue in the protein is suggested to be included inside the CB[8] cavity together with one of the TMPyP⁴⁺ pyridinium arms.⁵¹ The binding affinity of the porphyrin to BSA in the absence or presence of CB[8] is comparable (Table 1). CB[7] can also induce the formation of a ternary complex with a protein, even though only one molecule is included in the cavity. For this, the molecule has to protrude out of the cavity of CB[7].^{50,52} We observed this behavior for AO⁺ in the presence of CB[7] and HSA, while no interactions were observed for the case of CB[8] probably due to its larger cavity size.⁵² The binding of the AO⁺@CB[7] complex to HSA occurs with lower affinity compared to free AO⁺ (Table 1). On the other hand, the inclusion complex between MB⁺ and CB[7] does not interact with HSA,‡ which suggests that MB⁺ is buried in the cavity of the macrocycle. This point is discussed in more detail later on.

Effect of CB[n]s on protein photo-oxidation mediated by AO⁺

The effect of the encapsulation of AO⁺ into CB[n]s and the formation of a ternary complex with HSA was investigated by irradiating different AO⁺/HSA samples in the absence or presence of either CB[7] or CB[8]. Photo-oxidation of the tryptophan residue in HSA was followed by fluorescence emission. It is important to note that both free and protein-bound species are present in the solutions, so that the results have to be interpreted as overall effects considering the main species present. Based on the binding constants reported in Table 1, we estimate that in the absence of CB[n], about 81% of AO⁺ is bound to HSA. In the presence of excess CB[7], all AO⁺ are bound to CB[7] and about 44% of that complex interacts with HSA to form the ternary AO⁺@CB[7]:HSA complex.

On the other hand, in the presence of excess CB[8], all AO⁺ are bound to CB[8]. The highest photo-oxidation was achieved for the sample in the presence of CB[7], followed by the sample in the absence of CB[n] (Fig. 1), which implies an enhancing effect for CB[7] on the photoactivity of AO⁺. Contrasting with CB[7], irradiation of the sample in the presence of CB[8] results in a significant decrease in photo-oxidation (Fig. 1). We recently reported the different reactivity of MB⁺@CB[n] complexes in the excited state, where we observed that the CB[7] complex was more reactive than the CB[8] complex against an oxidant.⁶⁰ This behavior was proposed to be due to stabilization of the triplet excited state inside CB[7] and significant quenching inside CB[8].⁶⁰ We address the triplet excited state dynamics for AO⁺ and other molecules later in the discussion.

During the course of HSA photo-oxidation, extensive photo-bleaching of AO⁺ was observed for the sample in the presence of CB[7] compared to the samples in the absence of CB[n] or in the presence of CB[8], following the same trend as HSA photo-

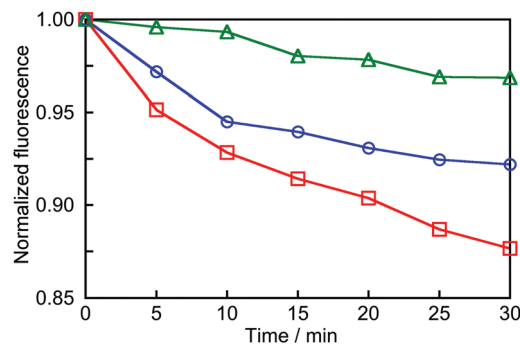


Fig. 1 HSA photo-oxidation mediated by AO⁺ in the absence of CB[n] (blue circles) or in the presence of 50 μM CB[7] (red squares) or 35 μM CB[8] (green triangles). All samples in 10 mM PB pH 7.0 and irradiated at their absorption maxima.

oxidation (Fig. S1–S3 in the ESI†). This result was not expected since CB[7] is reported to increase the photostability of several dyes,⁷⁴ which suggested a possible type I (electron-transfer) process for the AO⁺@CB[7] complex. Acridinium salts are known to be good electron donors in the excited state and are frequently used for photoorganocatalysis.⁷⁵ We further investigated the mechanism of photo-oxidation for the case where the highest photo-oxidation was observed, *i.e.* in the presence of CB[7], by using additives such as the singlet oxygen scavenger NaN₃, electron-acceptor FeCy, which interferes in photo-induced electron-transfer, and D₂O, which lengthens the lifetime of singlet oxygen by about 20 times. These compounds have been used in the past to study photo-sensitized oxidation.⁶³ As shown in Fig. 2, the addition of D₂O resulted in a minor increase in HSA photo-oxidation. If we compare this result with the effect of D₂O on the oxidation of HSA by MB⁺ (a known type II photosensitizer), we can observe that the effect of D₂O is much larger for MB⁺ (Fig. S4 in the ESI†) compared to AO⁺. It must be noted that the isotopic effect of D₂O not only lengthens the singlet oxygen lifetime, but also lengthens the triplet excited state lifetime for MB⁺.⁷⁶ The addition of NaN₃ decreased the HSA photo-oxidation only to some extent, indicating that the amount of singlet oxygen that can be quenched by azide is little, and this

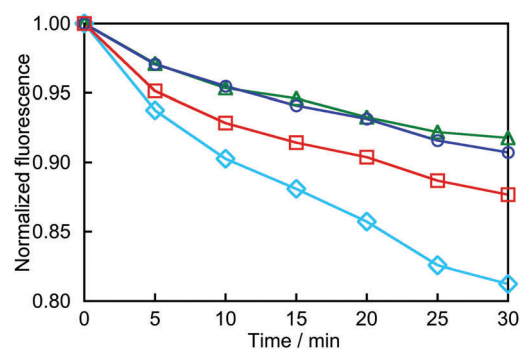


Fig. 2 Effect of D₂O (cyan diamonds), FeCy (blue circles) and NaN₃ (green triangles) on HSA photo-oxidation in the presence of AO⁺ and 50 μM CB[7]. The sample in the absence of additives (red squares) is shown for comparison. All samples in 10 mM PB pH 7.0 and irradiated at 485 nm.

‡ No change in the anisotropy decays was observed for MB⁺ and CB[7] in the absence or presence of HSA. For more details on the technique see ref. 52.

agrees with the small enhancement observed with D₂O. The results discussed above point to a contribution of singlet oxygen in the photo-oxidation, but not likely as the only mechanism. On the other hand, the addition of the electron-acceptor FeCy decreases the photo-oxidation of HSA, pointing to the participation of an electron-transfer mechanism. It must be noted that the magnitudes of the effects of FeCy and NaN₃ are not comparable because the concentration of FeCy is much lower than azide in order to avoid screening of the absorption of light by the trapping agent.⁶³ In all the cases, the effect of the additives on HSA photo-oxidation is smaller than expected for dyes free in solution,⁶³ which suggests that the photo-processes occur in the close vicinity of the protein, so that additives in the solution do not have complete accessibility to inhibit protein photo-oxidation. The fact that the binding of AO⁺ and AO⁺@CB[7] occurs near the tryptophan residue in HSA⁵² is in agreement with a favorable type I photo-oxidation mechanism.

Effect of CB[n]s on the formation of peroxides mediated by AO⁺

The most important reactive oxygen species generated as a consequence of type I and type II photo-processes include peroxides.⁷⁷ Peroxides can be formed as a consequence of the type I mechanism when semireduced photosensitizers interact with oxygen^{78,79} and/or by the dismutation of superoxide radical anions.⁸⁰ On the other hand, type II photo-processes also generate peroxides through the decomposition of singlet oxygen-generated endoperoxides.⁷⁷ We have shown before that hydrogen peroxide is the main species generated as a consequence of protein photo-oxidation mediated by the electron-transfer mechanism, while protein hydroperoxides were not detected.⁶³ For AO⁺ in the presence of CB[7], the formation of peroxides is enhanced compared to the samples in the presence of CB[8] or in the absence of any CB[n] (Fig. 3). The enhancement in the generation of peroxides for the case of CB[7] agrees with the increase in HSA photo-oxidation shown above (Fig. 1). By adding the enzyme catalase before the quantification of peroxides, which decomposes H₂O₂ much faster than protein hydroperoxides,⁶² we can estimate the amount of HSA hydroperoxides (HSA-OOH) and H₂O₂ in solution. We analyzed the generation of both types of

peroxides for the sample that produced the highest amount of total peroxides, *i.e.* in the presence of CB[7]. As seen in the inset of Fig. 3, the generation of H₂O₂ is faster at short irradiation times but quickly levels off, while HSA-OOH increases in concentration over time, doubling the amount of H₂O₂ at long irradiation times. The fact that HSA-OOH are generated in a relatively high yield is important because these species are long-lived in cells and can potentially enhance oxidative stress,⁶² which is beneficial for PDT applications.

Effect of CB[n]s on HSA fragmentation mediated by AO⁺

Protein cross-linking and fragmentation are common processes arising from photosensitization.⁸¹ A previous work reported the photocleavage of BSA induced by a ternary complex formed in the presence of TMPyP⁴⁺ and CB[8].⁵¹ Therefore, we studied the fragmentation of HSA induced by different AO⁺ species. As shown below, SDS-PAGE analysis of the samples irradiated in the presence of AO⁺ alone or in combination with CB[7] or CB[8] reveals the occurrence of photo-induced fragmentation of HSA in all the cases (Fig. 4). Control samples that were not irradiated show the same electrophoretic pattern as the control sample containing only HSA, thus ruling out that either AO⁺ or CB[7] induces any modification in the protein. The control sample in the presence of CB[8] shows some aggregation, which is seen as a diffuse band above the main band for HSA. CB[8]-promoted aggregation has been reported before for the case of BSA,⁵¹ and could be related to the interaction of the macrocycle with hydrophobic amino acids such as tryptophan and phenylalanine.^{82,83} Some cross-linking could be observed above the band for HSA for the irradiated samples, although very minor. Fragmentation, on the other hand, was estimated by densitometry to be 10–16% higher in the irradiated samples compared to the control samples, being the highest when CB[7] was present. The origin of the fragmentation could be related to the decomposition of HSA hydroperoxides, which are formed in considerable amounts as shown above. These HSA hydroperoxides are unstable and promote the formation of α -carbon centered radicals, which lead to protein cleavage.⁸¹

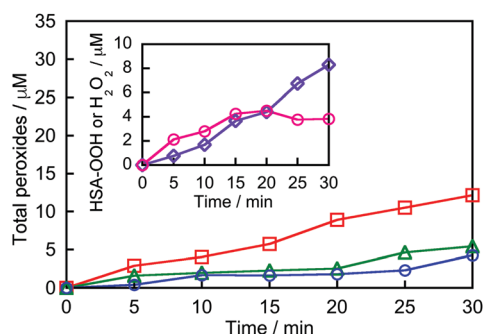


Fig. 3 Peroxide generation during HSA photo-oxidation mediated by AO⁺ in the absence of CB[n] (blue circles) or in the presence of 50 μM CB[7] (red squares) or 35 μM CB[8] (green triangles). Inset: generation of HSA-OOH (purple diamonds) or H₂O₂ (pink circles) during HSA photo-oxidation in the presence of AO⁺ and CB[7]. All samples in 10 mM PB pH 7.0 and irradiated at their absorption maxima.

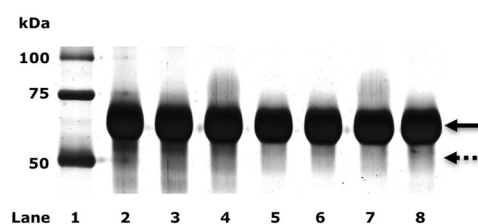


Fig. 4 SDS-PAGE analysis of HSA irradiated for 30 min in the presence of the different AO⁺ species and control samples without irradiation. The full arrow indicates the main band for HSA and the dotted arrow indicates fragmentation. Lane: (1) molecular weight standard, (2) HSA irradiated with AO⁺, (3) HSA irradiated with AO⁺ and CB[7], (4) HSA irradiated with AO⁺ and CB[8], (5) control sample of HSA with AO⁺, (6) control sample of HSA with CB[7], (7) control sample of HSA with CB[8], and (8) control sample of HSA alone.

Comparison of the effect of CB[n]s on protein photo-oxidation mediated by TMPyP⁴⁺ and MB⁺

We have shown above that the overall photoactivity of AO⁺ was enhanced in the presence of CB[7], *i.e.* higher HSA photo-oxidation, fragmentation and peroxide generation. This effect can be due to an overall enhancement of the photophysical and photochemical processes of AO⁺ when forming an inclusion complex with CB[7], and/or due to the formation of a ternary complex with HSA, which would put the reacting species closer together facilitating their reaction. Therefore, it is useful to compare these results with the other photoactive molecules mentioned above: TMPyP⁴⁺, which forms a ternary complex with BSA in the presence of CB[8] (and not CB[7]); and MB⁺, which forms inclusion complexes with both CB[7] and CB[8] (as does AO⁺), but does not interact with HSA.

First, we studied BSA photo-oxidation in the presence of different species of TMPyP⁴⁺. Fig. 5 shows that BSA photo-oxidation is enhanced in the presence of TMPyP⁴⁺ and CB[8], when a ternary complex is formed, similar to the results observed for AO⁺. On the other hand, the sample in the presence of CB[7] shows the same level of photo-oxidation as in the absence of CB[7] (Fig. 5). This result is likely due to the fact that the binding of TMPyP⁴⁺ to BSA competes with the binding to CB[7] (see binding constants in Table 1). It is noteworthy that TMPyP⁴⁺ acts mainly through singlet oxygen generation, while for AO⁺ the electron-transfer mechanism is also important. In spite of this difference, the important point here is that, in principle, the results obtained for AO⁺ and TMPyP⁴⁺ are consistent, *i.e.* the highest photoactivity is observed for the samples where ternary interactions with the protein are favored. It is also interesting to note that both CB[7] and CB[8] can promote the association of the photoactive molecules with the protein and this depends on the structures of photoactive molecules as well as the protein.

Another important comparison is between the photoactivity of AO⁺ and MB⁺. The latter is structurally similar to AO⁺; it forms a 1 : 1 inclusion complex with CB[7] and it binds to HSA. However, there is no formation of a ternary complex with HSA. This is probably because unlike AO⁺, which protrudes out of the

cavity of CB[7],^{84,85} MB⁺ is fully included in the cavity of CB[7] as previous studies suggest.^{59,71} For MB⁺ in the presence of CB[7], the photo-oxidation of HSA was lower compared to the sample in the absence of CB[7] (Fig. 5, inset). This trend is opposite to that observed for HSA in the presence of AO⁺ and CB[7], or BSA in the presence of TMPyP⁴⁺ and CB[8], which suggests that the ternary interaction with the protein favors photo-oxidation, and the sole formation of an inclusion complex with CB[n] does not ensure that the photoactivity is enhanced.

Effect of CB[n]s on triplet excited state lifetimes and singlet oxygen quantum yields for AO⁺, MB⁺ and TMPyP⁴⁺

Singlet oxygen generation by the different AO⁺ species was detected by the loss in the fluorescence of water-soluble anthracene derivative ABMA.⁶⁵ It must be noted that ¹O₂ detection is done in the absence of HSA, since proteins react with this species with high efficiency.^{81,86} The complex of AO⁺ with CB[7] produced the highest amount of ¹O₂, followed by the CB[8] complex and free AO⁺ (Fig. S5 in the ESI[†]). Table 2 shows that the Φ_A value for AO⁺ increases significantly in the presence of CB[7]. This result agrees well with the trend observed in HSA photo-oxidation, fragmentation and peroxide generation described above. Surprisingly, CB[8] also increased the Φ_A value compared to free AO⁺, in spite of the fact that a much lower photo-oxidation was observed for HSA in the presence of CB[8] (see Fig. 1). This is probably because protein photo-oxidation is measured as a loss of tryptophan fluorescence, when in fact several other amino acids such as methionine, histidine, cysteine and tyrosine can also be photo-oxidized.⁸¹ In this sense, the location of the CB[n] complex within the protein where singlet oxygen is being generated can play an essential role in the protein photo-oxidation. While the CB[7] complex is thought to associate near the tryptophan residue (Trp-214), minor binding of the CB[8] complex away from the tryptophan residue or the generation of singlet oxygen by the CB[8] complex in solution can lead to a lower photo-oxidation of this amino acid residue.

If we compare these results with MB⁺ and TMPyP⁴⁺ there are important differences that need to be taken into account. The Φ_A value for MB⁺ is slightly decreased in the CB[7] complex (Table 2) due to a lower rate constant for oxygen quenching of the triplet excited state.⁵⁹ We observe the opposite effect for AO⁺, *i.e.* an enhancement of the Φ_A value, which we believe is possible due to the fact that AO⁺ protrudes significantly out of the CB[7] cavity^{84,85} compared to MB⁺, suggesting that oxygen entry is not limited in this complex. This is the same effect observed for TMPyP⁴⁺, which is barely encapsulated into the CB[8] cavity.⁵¹

As for the reason of the enhancement in the Φ_A value for AO⁺ in the presence of CB[8], it is anticipated that dimers in solution have greater intersystem crossing yields than the corresponding monomers at the expense of fluorescence emission.⁸⁷ However, inside CB[8] the behavior seems to depend on the molecule. For MB⁺, the Φ_A value drops considerably (Table 2). This result is consistent with a previous report of the decreased reactivity of the excited state of MB⁺ inside CB[8] against ferric ions (through electron-transfer) compared to the CB[7] complex.⁶⁰ The difference between the

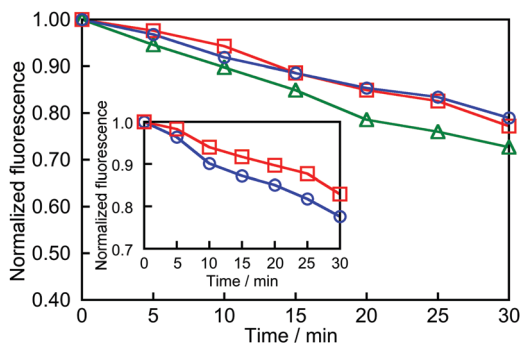


Fig. 5 BSA photo-oxidation mediated by TMPyP⁴⁺ in the absence of CB[n] (blue circles) or in the presence of 50 μ M CB[7] (red squares) or 35 μ M CB[8] (green triangles). Inset: HSA photo-oxidation mediated by MB⁺ in the absence (blue circles) or presence of CB[7] (red squares). All samples in 10 mM PB pH 7.0 and irradiated at their absorption maxima.

Table 2 Triplet excited state lifetimes (τ_T) and $^1\text{O}_2$ quantum yields (Φ_Δ) for photoactive molecules in the absence and presence of CB[7] or CB[8]

	No CB[n]		CB[7]		CB[8]	
	$\tau_T/\mu\text{s}$	Φ_Δ	$\tau_T/\mu\text{s}$	Φ_Δ	$\tau_T/\mu\text{s}$	Φ_Δ
AO ⁺	160 ^a ± 10	0.18 ^a ± 0.01	210 ^a ± 15	0.50 ^a ± 0.01	—	0.31 ^a ± 0.04
MB ⁺	77 ^b ± 5	0.52 ^b	150 ^b ± 12	0.44 ^b	—	≤ 0.02 ^a
TMPyP ⁴⁺	12.1 ^c	0.74 ^c	—	—	117.6 ^c	≥ 0.90 ^{c,d}

^a This work. ^b From ref. 59 and 76; errors for Φ_Δ not reported. ^c From ref. 51; errors not reported. ^d Lower limit determined in the presence of BSA. Singlet oxygen quantum yields determined in triplicate in air-equilibrated solutions. Triplet excited state lifetimes determined in nitrogen-saturated solutions.

behavior of MB⁺ and AO⁺ could be related to a more favorable formation of the 2 : 1 complex in the case of MB⁺, which leads to self-quenching when MB⁺ is excited. This is not the case for AO⁺ since we reported previously a negative cooperativity for the binding of two AO⁺ molecules to CB[8].⁵² There is also the possibility that the MB⁺ dimer forms a tighter complex inside CB[8] compared to AO⁺, restricting to a great extent the diffusion of oxygen.

Another important point in the comparison of the photoactivity of AO⁺, MB⁺ and TMPyP⁴⁺ is their triplet excited state lifetimes. As seen in Table 2, the formation of a 1 : 1 inclusion complex for all the photosensitizers with CB[n]s lengthens the triplet excited state lifetime, which in the case of MB⁺ has been attributed to a slower non-radiative decay due to the restricted mobility imposed by the macrocycle.^{59,76} Similar arguments have been given for the lengthening of the singlet excited state lifetime of several dyes inside CB[7] due to the low polarizability of its cavity.^{72,74} For the case of TMPyP⁴⁺, the restriction of the movement of the porphyrin arms when bound to CB[8] has been associated with longer triplet excited state lifetimes due to slower non-radiative deactivation.^{88,89} The lengthening of the triplet excited state lifetime does not necessarily reflect a higher photoactivity. For example, the binding of TMPyP⁴⁺ to BSA also lengthens the triplet-excited state of the molecule, but the quenching of this state by oxygen is hindered within the protein, thus reducing its potential application in PDT.⁵⁷ This is the point where combining the protein as a vehicle with the inclusion into CB[n]s could have a strong impact.

Conclusions

The results show key points when considering the development of drug delivery systems using complex assemblies. Ternary complex formation between the photosensitizer, CB[n]s and the protein is a requirement for the enhancement of protein photo-oxidation. This requirement is independent of the photo-oxidation mechanism, type I or type II, because it was observed for AO⁺ and TMPyP⁴⁺.

Lengthening of the triplet excited state of the sensitizer due to CB[n] inclusion is not sufficient to enhance the quantum yield of singlet oxygen formation. The trends for this quantum yield suggest that the photosensitizer should not be buried in the cavity of the macrocycle, favoring the quenching by oxygen in the media. The protrusion of the guest is also a key point

when favoring the interaction of the inclusion complex with the protein. In this regard, both CB[7] and CB[8] have shown to be capable of inducing this effect, but due to its greater solubility in water, the use of CB[7] is more promising in further biomedical applications.

Acknowledgements

This work was supported by CONICYT-FONDECYT (Grant 11121223) and at UVic by NSERC (RGPIN-121389-2012).

Notes and references

- 1 T. Reuters, The Changing Role of Chemistry in Drug Discovery, 2011.
- 2 T. M. Allen and P. R. Cullis, *Science*, 2004, **303**, 1818–1822.
- 3 W. J. Lambert, *BioPharm. Int.*, 2007, **20**, 32–39.
- 4 T. Lammers, *Int. J. Pharm.*, 2013, **454**, 527–529.
- 5 C. Alvarez-Lorenzo and A. Concheiro, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 7743–7765.
- 6 F. Kratz, P. Senter and H. Steinhagen, *Drug Delivery in Oncology. From Basic Research to Cancer Therapy*, Wiley-VCH, 2012.
- 7 J. G. Moser, *Photodynamic tumor therapy: 2nd and 3rd generation photosensitizers*, Harwood Academic Publishers, 1998.
- 8 M. R. Hamblin and P. Mróz, *Advances in Photodynamic Therapy. Basic, Translational, and Clinical*, Artech House, 2008.
- 9 M. R. Detty, S. L. Gibson and S. J. Wagner, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 3897–3915.
- 10 A. E. O'Connor, W. M. Gallagher and A. T. Byrne, *Photochem. Photobiol.*, 2009, **85**, 1053–1074.
- 11 H.-J. Schneider, *Supramolecular Systems in Biomedical Fields*, Royal Society of Chemistry, 2013.
- 12 A. R. Blaudszun, Q. Lian, M. Schnabel, B. Loretz, U. Steinfeld, H. H. Lee, G. Wenz, C. M. Lehr, M. Schneider and A. Philippi, *Int. J. Pharm.*, 2014, **474**, 70–79.
- 13 A. C. Niehoff, A. Moosmann, J. Sobbing, A. Wiehe, D. Mulac, C. A. Wehe, O. Reifschneider, F. Blaske, S. Wagner, M. Sperling, H. von Briesen, K. Langer and U. Karst, *Metallomics*, 2014, **6**, 77–81.
- 14 S. Beyer, L. Xie, S. Grafe, V. Vogel, K. Dietrich, A. Wiehe, V. Albrecht, W. Mantele and M. G. Wacker, *Pharm. Res.*, 2015, **32**, 1714–1726.

- 15 L. Zhou, J. H. Liu, F. Ma, S. H. Wei, Y. Y. Feng, J. H. Zhou, B. Y. Yu and J. A. Shen, *Biomed. Microdevices*, 2010, **12**, 655–663.
- 16 Y. Svenskaya, B. Parakhonskiy, A. Haase, V. Atkin, E. Lukyanets, D. Gorin and R. Antolini, *Biophys. Chem.*, 2013, **182**, 11–15.
- 17 W. Miao, G. Shim, S. Lee, S. Lee, Y. S. Choe and Y. K. Oh, *Biomaterials*, 2013, **34**, 3402–3410.
- 18 C. S. Lee, W. Park, S. J. Park and K. Na, *Biomaterials*, 2013, **34**, 9227–9236.
- 19 C. E. Chen, L. Zhou, J. Geng, J. S. Ren and X. G. Qu, *Small*, 2013, **9**, 2793–2800.
- 20 M. Zamadar, G. Ghosh, A. Mahendran, M. Minnis, B. I. Kruff, A. Ghogare, D. Aebisher and A. Greer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 7882–7891.
- 21 D. Bartusik, D. Aebisher, G. Ghosh, M. Minnis and A. Greer, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 4557–4565.
- 22 A. A. Ghogare, I. Rizvi, T. Hasan and A. Greer, *Photochem. Photobiol.*, 2014, **90**, 1119–1125.
- 23 F. Kratz, *J. Controlled Release*, 2008, **132**, 171–183.
- 24 A. O. Elzoghby, W. M. Samy and N. A. Elgindy, *J. Controlled Release*, 2012, **157**, 168–182.
- 25 F. Kratz, *J. Controlled Release*, 2014, **190**, 331–336.
- 26 S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick and N. Franks, *Nat. Struct. Biol.*, 1998, **5**, 827–835.
- 27 J. R. Simard, P. A. Zunszain, J. A. Hamilton and S. Curry, *J. Mol. Biol.*, 2006, **361**, 336–351.
- 28 G. Sudlow, D. J. Birkett and D. N. Wade, *Mol. Pharmacol.*, 1975, **11**, 824–832.
- 29 S. Wanwimolruk, D. J. Birkett and P. M. Brooks, *Mol. Pharmacol.*, 1983, **24**, 458–463.
- 30 I. Vayá, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Jiménez and M. A. Miranda, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 4102–4122.
- 31 S. Monti and I. Manet, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 4051–4067.
- 32 E. Alarcón, A. M. Edwards, A. Aspée, C. D. Borsarelli and E. A. Lissi, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2009, **8**, 933–943.
- 33 E. Alarcón, A. M. Edwards, A. M. García, M. Muñoz, A. Aspée, C. D. Borsarelli and E. A. Lissi, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2009, **8**, 255–263.
- 34 Y. Zhang and H. Gerner, *Photochem. Photobiol.*, 2009, **85**, 677–685.
- 35 E. Alarcón, A. M. Edwards, A. Aspée, F. E. Moran, C. D. Borsarelli, E. A. Lissi, D. Gonzalez-Nilo, H. Poblete and J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2010, **9**, 93–102.
- 36 D. H. Macartney, *Isr. J. Chem.*, 2011, **51**, 600–615.
- 37 S. Walker, R. Oun, F. J. McInnes and N. J. Wheate, *Isr. J. Chem.*, 2011, **51**, 616–624.
- 38 N. Saleh, I. Ghosh and W. M. Nau, in *Supramolecular Systems in Biomedical Fields*, ed. H.-J. Schneider, Royal Society of Chemistry, 2013, pp. 164–212.
- 39 J. X. Zhang and P. X. Ma, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2013, **65**, 1215–1233.
- 40 Y. H. Ko, I. Hwang, D.-W. Lee and K. Kim, *Isr. J. Chem.*, 2011, **51**, 506–514.
- 41 L. Cao, M. Šekutor, P. Y. Zavalij, K. Mlinarić-Majerski, R. Glaser and L. Isaacs, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 988–993.
- 42 G. Hettiarachchi, D. Nguyen, J. Wu, D. Lucas, D. Ma, L. Isaacs and V. Briken, *PLoS One*, 2010, **5**, 10514.
- 43 V. D. Uzunova, C. Cullinane, K. Brix, W. M. Nau and A. I. Day, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 2037–2042.
- 44 R. Oun, R. S. Floriano, L. Isaacs, E. G. Rowan and N. J. Wheate, *Toxicol. Res.*, 2014, **3**, 447–455.
- 45 P. Montes-Navajas, M. González-Béjar, J. C. Scaiano and H. García, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2009, **8**, 1743–1747.
- 46 C. Márquez and W. M. Nau, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 3155–3160.
- 47 C. Márquez, R. R. Hudgins and W. M. Nau, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 5806–5816.
- 48 H. Yang, B. Yuan, X. Zhang and O. A. Scherman, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**, 2106–2115.
- 49 M. E. Aliaga, L. Garcia-Rio, M. Pessêgo, R. Montecinos, D. Fuentealba, I. Uribe, M. Martin-Pastor and O. Garcia-Beltrán, *New J. Chem.*, 2015, **39**, 3084–3092.
- 50 A. C. Bhasikuttan, J. Mohanty, W. M. Nau and H. Pal, *Angew. Chem.*, 2007, **119**, 4198–4200.
- 51 W. Lei, G. Jiang, Q. Zhou, B. Zhang and X. Wang, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, **12**, 13255–13260.
- 52 K. Scholtbach, I. Venegas, C. Bohne and D. Fuentealba, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, **14**, 842–852.
- 53 T. Matsubara, K. Kusuzaki, A. Matsumine, K. Shintani, H. Satonaka and A. Uchida, *Anticancer Res.*, 2006, **26**, 187–193.
- 54 K. Kusuzaki, H. Murata, T. Matsubara, H. Satonaka, T. Wakabayashi, A. Matsumine and A. Uchida, *In Vivo*, 2007, **21**, 205–214.
- 55 A. Kellmann, *Photochem. Photobiol.*, 1974, **20**, 103–108.
- 56 W. L. F. Armarego and C. L. L. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*, Elsevier, Burlington, 6th edn, 2009.
- 57 I. E. Borissevitch, T. T. Tominaga and C. C. Schmitt, *J. Photochem. Photobiol. A*, 1998, **114**, 201–207.
- 58 S. Yi and A. E. Kaifer, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 10275–10278.
- 59 M. González-Béjar, P. Montes-Navajas, H. García and J. C. Scaiano, *Langmuir*, 2009, **25**, 10490–10494.
- 60 T. Fuenzalida and D. Fuentealba, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, **14**, 686–692.
- 61 C. Gay, J. Collins and J. M. Gebicki, *Anal. Biochem.*, 1999, **273**, 149–155.
- 62 P. E. Morgan, R. T. Dean and M. J. Davies, *Free Radical Biol. Med.*, 2004, **36**, 484–496.
- 63 D. Fuentealba, B. Friguet and E. Silva, *Photochem. Photobiol.*, 2009, **85**, 185–194.
- 64 Y. Liao and C. Bohne, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 734–743.
- 65 N. A. Kuznetsova, N. S. Gretsova, O. A. Yuzhakova, V. M. Negrimovskii, O. L. Kaliya and E. A. Luk'yanets, *Russ. J. Gen. Chem.*, 2001, **71**, 36–41.
- 66 R. W. Redmond and J. N. Gamlin, *Photochem. Photobiol.*, 1999, **70**, 391–475.
- 67 F. Wilkinson, W. P. Helman and A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1993, **22**, 113–262.
- 68 I. E. Borissevitch, T. T. Tominaga, H. Imasato and M. Tabak, *J. Lumin.*, 1996, **69**, 65–76.

- 69 X.-Z. Feng, Z. Lin, L.-J. Yang, C. Wang and C.-L. Bai, *Talanta*, 1998, **47**, 1223–1229.
- 70 Y. J. Hu, W. Li, Y. Liu, J. X. Dong and S. S. Qu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, **39**, 740–745.
- 71 P. Montes-Navajas, A. Corma and H. García, *ChemPhysChem*, 2008, **9**, 713–720.
- 72 M. Shaikh, J. Mohanty, P. K. Singh, W. M. Nau and H. Pal, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, **7**, 408–414.
- 73 J. Mohanty, A. C. Bhasikuttan, S. D. Choudhury and H. Pal, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 10782–10785.
- 74 W. M. Nau and J. Mohanty, *Int. J. Photoenergy*, 2005, **7**, 133–141.
- 75 D. Ravelli, M. Fagnoni and A. Albini, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 97–113.
- 76 E. I. Alarcón, M. González-Béjar, P. Montes-Navajas, H. García, E. A. Lissi and J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, **11**, 269–273.
- 77 J. Cadet and P. Di Mascio, in *The Chemistry of Peroxides*, ed. Z. Rappoport, John Wiley & Sons, Ltd, 2006, vol. 2.
- 78 E. Silva, R. Ugarte, A. Andrade and A. M. Edwards, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1994, **23**, 43–48.
- 79 A. de la Rochette, E. Silva, I. Birlouez-Aragon, M. Mancini, A. M. Edwards and P. Morliere, *Photochem. Photobiol.*, 2000, **72**, 815–820.
- 80 I. B. Afanas'ev, *Superoxide Anion: Chemistry and Biological Implications*, CRC Press, 1991.
- 81 D. I. Pattison, A. S. Rahmanto and M. J. Davies, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, **11**, 38–53.
- 82 H. Cong, L. L. Tao, Y. H. Yu, F. Yang, Y. Du, S. F. Xue and Z. Tao, *Acta Chim. Sin.*, 2006, **64**, 989–996.
- 83 A. R. Urbach and V. Ramalingam, *Isr. J. Chem.*, 2011, **51**, 664–678.
- 84 J. Liu, N. Jiang, J. Ma and X. Du, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, 4931–4938.
- 85 M. F. Czar and R. A. Jockusch, *ChemPhysChem*, 2013, **14**, 1138–1148.
- 86 M. J. Davies, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, **3**, 17–25.
- 87 E. G. McRae and M. Kasha, *J. Chem. Phys.*, 1958, **28**, 721–722.
- 88 S. L. Deng, T. L. Chen, W. L. Chien and J. L. Hong, *J. Mater. Chem. C*, 2014, **2**, 651–659.
- 89 G. H. Ahmed, S. M. Aly, A. Usman, M. S. Eita, V. A. Melnikov and O. F. Mohammed, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 8010–8013.

PAPER



Cite this: *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2017, **16**, 1268

Fluorescence properties of aurone derivatives: an experimental and theoretical study with some preliminary biological applications†

Christian Espinosa-Bustos,^a Diego Cortés-Arriagada,^b Marco A. Soto-Arriaza,^{c,f} José Robinson-Duggon,^c Nancy Pizarro,^d Alan R. Cabrera,^{a,e} Denis Fuentealba^{b,*c} and Cristian O. Salas^a

In this paper, we explored the fluorescence properties of eight aurone derivatives bearing methoxy groups and bromine atoms as substituents in the benzene rings. All derivatives showed strong solvatochromic absorption and emission properties in solvents of different polarities. Some of them showed high fluorescence quantum yields, which make them potential compounds for sensing applications. The position of the methoxy groups in the benzofuranone moiety and the presence of bromine atoms in the benzene ring had a strong influence on the fluorescence behaviour of the aurones. DFT calculations allowed us to explain the emission properties of aurones and their solvatochromism, which was related to an excited state with strong charge-transfer character. Aurone **4** has the most promising characteristics showing a large difference in the quantum yields and large Stokes shifts depending on the solvent polarities. These results prompted us to explore some preliminary biological applications for aurone **4** such as the sensing of hydrophobic pockets of a protein and its thermotropic behaviour in liposomes.

Received 1st March 2017,
Accepted 6th June 2017

DOI: 10.1039/c7pp00078b

rsc.li/paps

1. Introduction

Aurone is the common chemical name for 2-benzylidenefuran-3(2H)-ones, which can be natural or synthetic pigments, and are closely related to flavones. These compounds are active on several biological targets, which make them interesting scaffolds for the design of potential therapeutic agents.^{1–4} Aurones such as sulfuretin (Fig. 1) are known to suppress inflammation and oxidative stress^{5,6} and have anti-cancer properties.⁷ Aureusidin has shown antioxidant activity⁸ and 4-chloraurone,

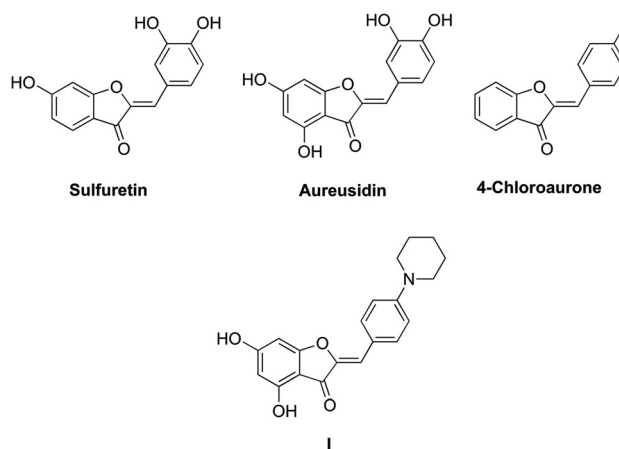


Fig. 1 Chemical structures of selected natural and synthetic aurone derivatives with known biological activities.

isolated from a marine source, has been modified to obtain compounds with potent antibacterial activity.⁹ Recently, the bioactivity of 4-hydroxyl aurone derivatives **I** has been studied in neurological disorders such as Alzheimer disease (Fig. 1).¹⁰

In addition to the interesting biological activities exhibited by aurones, their absorption and fluorescence properties fall in the visible range making them suitable as chemical sensors.^{11,12} This is because the aurone scaffold, also the denominated hemi-indigo structure, absorbs light at longer

^aDepartamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago 6094411, Chile. E-mail: cosalas@uc.cl

^bPrograma Institucional de Fomento a la Investigación, Desarrollo e Innovación. Universidad Tecnológica Metropolitana, Ignacio Valdivieso 2409, P.O. Box 8940577, San Joaquín, Santiago, Chile

^cDepartamento de Química Física, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago 6094411, Chile. E-mail: dlfuente@uc.cl

^dDepartamento de Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Andrés Bello, Viña del Mar 2531015, Chile

^eCentro Integrativo de Biología y Química Aplicada (CIBQA), Departamento de Ciencias Químicas y Biológicas, Universidad Bernardo O'Higgins, General Gana 1702, Santiago 8370854, Chile

^fCentro de Investigación en Nanotecnología y Materiales Avanzados CIEN-UC, Santiago, Chile

†Electronic supplementary information (ESI) available: Fluorescence lifetimes for aurone **4** for different emission wavelengths, frontier molecular orbitals and geometry calculations for all aurones. See DOI: 10.1039/c7pp00078b

wavelengths than any of the other closely related flavonoid pigments. Also, depending on the level of conjugation between the benzene and benzofuranone moieties, some of them exhibit efficient fluorescence emission with large quantum yields and sizable Stokes shifts.¹¹ For this reason, these organic heterocyclic dyes are useful in a variety of applications such as fluorescent labels or probes in biological and medical fields.^{11,13,14} In the last few years, some fluorescent aurone derivatives with potential as cyanide turn-on chemosensors have been synthesized and characterized.^{15–17}

Taking into account these remarkable properties, we have previously synthesized several aurone derivatives with the aim of assaying their activity as Monoamine Oxidase B (MAO-B) inhibitors.¹⁸ Looking to broaden the scope of the use of these aurones, in this work the main purpose was to study their fluorescence properties and some preliminary biological applications (Fig. 2).

2. Experimental section

2.1. Compounds

The synthesis of aurones 1–8 was reported previously by our group.¹⁸ In all these cases, only a geometric isomer (*Z*) was obtained as confirmed by spectroscopic properties. These results agreed with previously reported data and with the mechanism of reaction promoted by Hg(II). All the spectra are available in the ESI† of the cited reference. Methanol, acetonitrile and chloroform were purchased from Merck and were of spectroscopic grade. Ultrapure water was obtained using a Milli-Q water purifying system (resistivity of 18.2 MΩ cm). Stock solutions of all aurones were prepared in methanol to a concentration of 0.5–1.0 mM. Samples for fluorescence measurements were either diluted to a concentration of 5–10 μM in different solvents (added volume ≤1% of the total volume) or evaporated under a stream of nitrogen and dissolved in the corresponding organic solvent.

2.2. Absorption spectra and steady-state fluorescence

Absorption spectra were recorded on a HP8453 UV-Vis spectrophotometer. Fluorescence spectra were measured on a LS55

PerkinElmer fluorimeter at room temperature. Samples were excited at their absorption maxima in the range 380–450 nm. The slits for the excitation and emission monochromators were equivalent to a bandwidth of 2.5 nm. Quantum yields were determined using quinine sulfate in 0.5 M H₂SO₄ as a standard ($\Phi_F = 0.546$),¹⁹ according to eqn (1), where I corresponds to the integrated intensity of the emission spectra and η corresponds to the refractive index of the solvent. Sample absorbances were less than 0.1 and they were matched at the excitation wavelength (395 nm) with the absorbance of the standard.

$$\Phi_F = \frac{I_{\text{sample}}}{I_{\text{standard}}} \times \frac{\eta_{\text{sample}}^2}{\eta_{\text{standard}}^2} \times \Phi_{\text{standard}} \quad (1)$$

2.3. Time-resolved fluorescence

Fluorescence lifetime measurements were carried out with the time correlated single photon counting (TCSPC) technique using a PicoQuant FluoTime300 fluorescence lifetime spectrometer, employing as an excitation source a LDH-P-C-405 laser of 405 nm (FWHM ~54 ps; pulse energy 31 pJ). Lifetime values were obtained by analyzing the fluorescence decays with FluoFit software (PicoQuant). A two-exponential or three-exponential reconvolution fit was used to obtain a value of χ^2 closer to unity. Each reconvolution fit used the instrument response function (IRF) measured from scattered light at the peak emission wavelength of the laser. The goodness of the fit (random residuals around zero) and the reproducibility of the lifetimes for different sample solutions were used as criteria of adequate fit.

2.4. Computational details

Density functional theory (DFT) calculations were performed using the Gaussian09 program²⁰ with the hybrid PBE0 functional²¹ in combination with the 6-31+G(d) basis sets. Xue and co-workers have recently shown that the PBE0/6-31+G(d) methodology gives accurate results regarding the electronic structure and photophysical properties of aurones.¹² All the systems were fully optimized without symmetry constraints, and vibrational frequencies were obtained to ensure that all the optimized structures correspond to energy minima. Time-dependent DFT (TD-DFT) calculations were performed to obtain the first thirty singlet–singlet excited states due to vertical electron promotions from the S₀ ground state. In addition, the first singlet excited state (S₁) was fully optimized by using the TD-DFT gradients (TD-DFT optimization) to obtain the fluorescence emissive states. Implicit solvent effects were included by means of the IEFPCM method,²² with chloroform as solvent. Wavefunction analysis was carried out using the Multiwfn program.²³ Note that *Z*-isomers were selected for the calculations because they are at least 0.16 eV more stable than the *E*-isomers.

2.5. Proteins and liposomes

Human serum albumin (HSA) or poly-L-glutamic acid (PGA) stock solutions (500 μM) were prepared in 10 mM phosphate

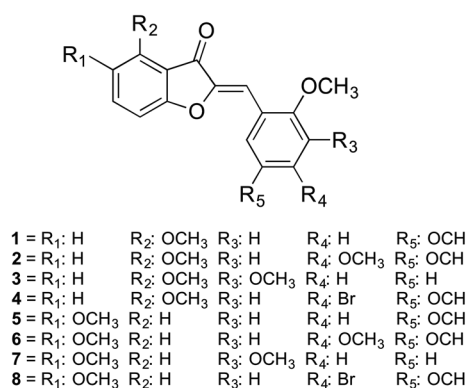


Fig. 2 Chemical structures of aurone derivatives 1–8 considered in this study.

buffer pH 7.0. An aliquot of this solution was diluted in buffer to a concentration of 15 μM and aurone **4** was added from a methanolic stock solution. The preparation of 1- α -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) large unilamellar vesicles (LUVs) was done according to a previously reported procedure.^{24–26} Briefly, DPPC was dissolved in chloroform (500 μM) and later dried under a nitrogen flux. The lipid films were kept under vacuum overnight at room temperature. Multilamellar liposomes were prepared by hydrating and vortexing the lipid films with PBS solution. DPPC LUV dispersion was prepared by the extrusion method, after five freezing and thawing cycles.^{24–26} Extrusion was performed using 400 nm nominal pore polycarbonate filters, employing nitrogen as a pressurizing gas. Aurone **4** was incubated into the LUV suspension by addition of a small aliquot of a concentrated solution in chloroform, and incubated at 50 $^{\circ}\text{C}$ (10 $^{\circ}\text{C}$ above the main lipid transition temperature of the bilayer) for 60 min and allowed to cool down to room temperature before conducting any measurements. At the low concentration of lipids used no significant light scattering was observed during fluorescence measurements.

3. Results and discussion

3.1. Absorption and emission spectra for aurone derivatives

Aurone derivatives **1–8** showed absorption maxima in the visible range in chloroform (Fig. 3), which is consistent with the extended conjugated π system of these molecules. Substitution of a hydrogen atom on the benzene ring of aurone **1** for a methoxy group in aurone **2** led to a bathochromic shift in the absorption maximum, consistent with the electron-donating effect of this group,^{11,12} while changing the position of the methoxy group in the benzene ring for aurones **1** and **3** did not show any effect on their absorption maxima. The same bathochromic shift was observed for aurones **5** and

6 due to the different positions of the methoxy group on the benzofuranone moiety, however, moving this group from position **5** to position **3** in the benzene ring induces a significant hypsochromic shift as observed for aurone **7** compared to **5**. On the other hand, the substitution of a hydrogen atom on the benzene ring with bromine (aurones **4** and **8**) did not show a marked effect on their absorption maxima. The solvent polarity showed a small effect on the absorption maxima as shown in Table 1.

The fluorescence emission spectra in chloroform showed maxima between 462 nm and 535 nm depending on the structure of the aurone. The emission maxima for aurones **1** and **2** showed the same trend as for the absorption maxima (bathochromic shift), while aurone **3** showed a marked hypsochromic shift with respect to **1**. Aurones **5** and **6** did not show any differences in the emission maxima, while aurone **7** was poorly fluorescent (Fig. 4). All aurone derivatives showed a marked solvatochromism in solvents of different polarities and hydrogen bonding behaviour (protic or aprotic). For

Table 1 Absorption and fluorescence emission maxima for aurone derivatives **1–8** in different solvents

Aurone	H ₂ O		CH ₃ OH		CH ₃ CN		CHCl ₃	
	λ_{abs}	λ_{em}	λ_{abs}	λ_{em}	λ_{abs}	λ_{em}	λ_{abs}	λ_{em}
1	417	— ^b	413	594	408	542	413	515
2	435	— ^b	406	— ^b	440	550	430	533
3	420	— ^b	390	— ^b	388	538	414	462
4	417	562	417	557	416	515	422	499
5	448	— ^b	418	— ^b	421	553	423	533
6	440	— ^b	441	— ^b	436	550	429	532
7	— ^a	— ^a	406	— ^b	400	— ^b	401	— ^b
8	— ^a	— ^a	423	— ^b	423	558	425	535

^a Not determined due to low solubility in water. ^b Fluorescence intensity was too low.

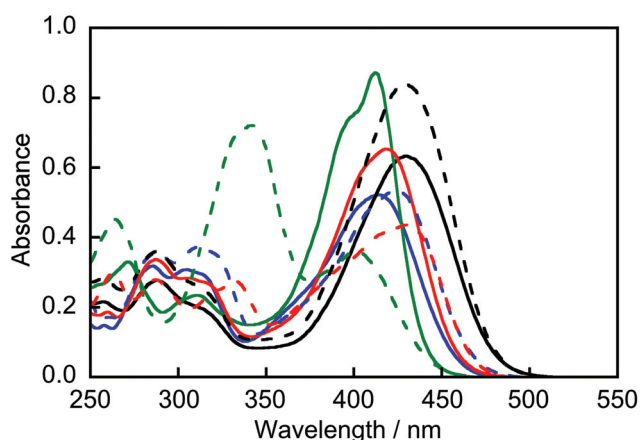


Fig. 3 Absorption spectra for aurone derivatives **1** (blue solid line), **2** (black solid line), **3** (green solid line), **4** (red solid line), **5** (blue dashed line), **6** (black dashed line), **7** (green dashed line) and **8** (red dashed line) in CHCl₃.

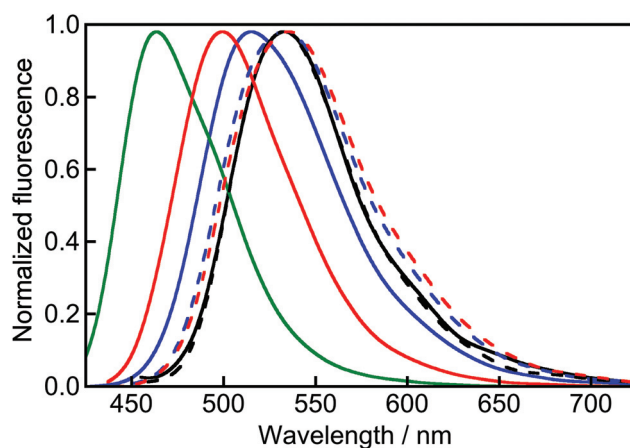


Fig. 4 Normalized fluorescence emission spectra for aurone derivatives **1** (blue solid line), **2** (black solid line), **3** (green solid line), **4** (red solid line), **5** (blue dashed line), **6** (black dashed line) and **8** (red dashed line) in CHCl₃. Aurone **7** was poorly fluorescent.

example, aurone **4** showed a Stokes shift of ~ 80 nm in chloroform, increasing to ~ 150 nm in water. All aurones showed large Stokes shifts in all solvents (~ 50 – 150 nm). In particular, aurone **1** showed the largest Stokes shift of ~ 180 nm in methanol.

The solvatochromic emissive properties of aurone derivatives **1**–**8** are indicative of a charge-transfer (CT) character in the excited state. This point has been proposed before in the literature,¹¹ but only recently theoretical calculations confirmed that the HOMO–LUMO transition has strong π – π^* CT character.¹² DFT calculations for the aurones presented in this work are discussed later on in this paper.

3.2. Fluorescence quantum yields and lifetimes for aurone derivatives

Besides the solvatochromic behaviour shown by the aurones, their relative emission intensities were also different. Therefore, fluorescence quantum yields were determined relative to quinine sulfate.¹⁹ Aurone **4** showed the highest fluorescence quantum yield in chloroform ($\Phi_F = 0.34$), followed by aurones **1** and **5** (Table 2). It must be noted that fluorescence quantum yields for aurone derivatives reported in this work are higher than those previously reported for other solvents.¹¹ Surprisingly, aurone **8** which is an isomer of aurone **4**, having only different positions for the methoxy group in the benzofuranone moiety (Fig. 2), has a very low fluorescence quantum yield. The same structural difference is present between aurones **1** and **5**, however, they have similar fluorescence quantum yields.

The emission intensities showed a dependence on the solvent polarity as seen in Fig. 5 for aurone **4**. This marked difference prompted us to determine the fluorescence quantum yields in polar solvents. The values of Φ_F for aurone **4** in CH_3OH and water were 0.06 and <0.01 , respectively. The fact that the fluorescence quantum yield increases significantly in less polar solvents is in agreement with previous reports.¹¹ Particularly, the fact that aurone **4** is practically non-fluorescent in water and highly fluorescent in non-polar media makes it a good probe for biological applications, as it will be discussed below.

Table 2 Fluorescence quantum yields and lifetimes for aurone derivatives **1**–**8** in CHCl_3 ^a

Aurone	Φ_F ^b	τ_1/ns (A_1)	τ_2/ns (A_2)	τ_3/ns (A_3)	χ^2
1	0.31	— ^c	1.36 (0.45)	7.06 (0.55)	1.15
2	0.20	0.34 (0.18)	2.04 (0.53)	3.80 (0.29)	1.07
3	0.11	0.45 (0.95)	1.43 (0.05)	— ^c	0.96
4	0.34	0.70 (0.21)	— ^c	3.99 (0.79)	1.10
5	0.29	0.66 (0.16)	— ^c	6.97 (0.84)	0.94
6	0.17	0.26 (0.19)	1.93 (0.78)	3.77 (0.03)	1.17
7	— ^c	— ^c	— ^c	— ^c	— ^c
8	0.02	— ^c	— ^c	— ^c	— ^c

^a The samples were excited at 405 nm and the emission was measured at the maxima. ^b Quantum yields relative to quinine sulphate in 0.5 M H_2SO_4 . Errors were estimated to be lower than 10%. ^c Not determined due to low fluorescence emission.

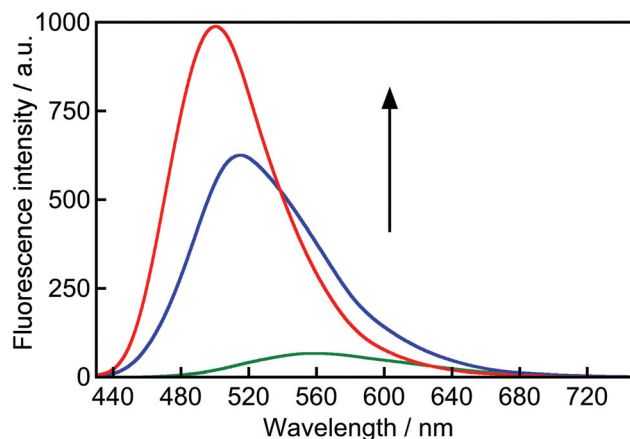


Fig. 5 Fluorescence emission spectra for aurone **4** in CHCl_3 (red), CH_3CN (blue) and CH_3OH (green) for optically-matched samples. The arrow indicates the increase in fluorescence with solvent polarity.

Fluorescence lifetimes were determined in chloroform to study the emissive state of the aurones. All aurones showed up to three fluorescence lifetimes (Table 2), with a short component in the range of 0.3–0.7 ns, a middle component in the range of 1.4–2.0 ns and a long component of 4–7 ns. As seen in Table 2, aurones **1**, **4** and **5** have a larger contribution of the longer lifetime component (4–7 ns), which agrees with the fact that these aurones are more fluorescent. On the other hand, the major contribution for aurone **3** corresponds to a short lifetime of 0.45 ns, which agrees with this aurone being less fluorescent. Aurones **2** and **6** show an intermediate behaviour, having a major contribution of the middle component in the range of 2 ns. It must be noted that no significant differences in the lifetimes or their contributions were observed at different emission wavelengths between 450 nm and 550 nm for aurone **4**, while a small increment in the contribution of the shorter lifetime component was observed only at 550 nm (Table S1 in the ESI†). The fact that there are at least two lifetimes for all aurones suggests the presence of different emitting species. A likely possibility is the generation of *E* isomers by photo-isomerization, which has been observed before for related aurones.¹¹ Irradiation of the samples at their absorption maxima induced spectral changes for all aurones consistent with photo-isomerization (see Fig. S1–S8 in the ESI†). Detailed studies of aurone photo-isomerization are out of the scope of the present work.

3.3. DFT calculations for aurone derivatives

To have a better understanding of the electronic and photo-physical properties of the synthesized aurone derivatives, DFT calculations were performed for aurones **1**, **4** and **5**, which have the highest fluorescence quantum yield values. In addition, compound **8** was also considered because this is a structural isomer of **4**, but it has a weak emission. These compounds show similar electronic properties, with the HOMO–LUMO energy gaps ranging from 3.33 eV to 3.39 eV (Table 3). The latter

Table 3 Properties of the low-lying singlet excited states of aurones **1**, **4**, **5** and **8**^a

Absorption								
Aurone	λ_{exp}	$\lambda_{\text{PBE0}} (\Delta E, \text{eV})$	Monoexcitation	f	D_x	D_y	D_z	$\Delta\text{HL} (\text{eV})$
1	413	445 (2.73)	H $\rightarrow$ L	0.600	2.993	0.096	0.043	3.37
4	422	442 (2.74)	H $\rightarrow$ L	0.779	3.389	0.262	0.024	3.39
5	423	450 (2.70)	H $\rightarrow$ L	0.507	2.704	−0.586	0.000	3.33
8	425	447 (2.72)	H $\rightarrow$ L	0.639	3.069	−0.422	0.000	3.34
Emission								
Aurone	λ_{exp}	$\lambda_{\text{PBE0}} (\Delta E, \text{eV})$	Monoexcitation	f	D_x	D_y	D_z	
1	515	514 (2.41)	L $\rightarrow$ H	0.529	2.985	0.133	0.038	
4	499	502 (2.47)	L $\rightarrow$ H	0.760	3.530	0.327	0.028	
5	533	517 (2.40)	L $\rightarrow$ H	0.474	2.799	−0.486	0.000	
8	535	504 (2.46)	L $\rightarrow$ H	0.670	3.321	−0.323	0.000	

^a λ_{exp} and λ_{PBE0} absorption and fluorescence emission wavelengths in nm, excitation and emission (with 0.70 CI coefficient and 99% of contribution to the excited state wavefunction), oscillator strength (f), and x , y and z components of the transition dipole moment D (in a.u.). H: HOMO; L: LUMO. $\Delta\text{HL} = \epsilon_{\text{LUMO}} - \epsilon_{\text{HOMO}}$, where ϵ_{LUMO} and ϵ_{HOMO} are the energies of the HOMO and LUMO, respectively.

causes minor differences in the first allowed singlet-singlet transitions as obtained by TD-DFT calculations (Table 3).

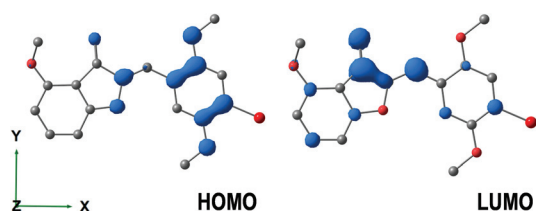
The simulated UV-Vis absorption spectrum in chloroform shows that the first allowed transition (S_1) appears at 445 nm, 442 nm, 450 nm and 447 nm for aurones **1**, **4**, **5** and **8**, respectively, which are in reasonable agreement with the experimental values. In all the cases, the $S_0 \rightarrow S_1$ transition is due to the HOMO $\rightarrow$ LUMO electron promotion (99%) with high oscillator strengths (f). Fig. 6 shows the HOMO and LUMO electron densities of aurone **4** as representative, while the surfaces of aurones **1**, **5** and **8** are shown in the ESI†. It is noted that the HOMO is mainly a π orbital localized in the benzene ring and its methoxy groups (68%); a minor contribution is observed on the benzofuranone moiety. Otherwise, the LUMO is mainly a π^* orbital localized on the benzofuranone moiety (59%), with a lower contribution from the benzene ring (22%). Therefore, the HOMO $\rightarrow$ LUMO electron promotion causes an effective charge separation with localized hole-electron distributions as expected in a charge-transfer excited state; the latter explains the high oscillator strengths of the low-lying transitions and the solvatochromic behaviour of all the compounds. Note that the bromine atom does not contribute either to the HOMO or the LUMO; thus, bromine substitution plays a role in the molecular charge distribution by mesomeric effects. On the other hand, methoxy substitution on the benzofuranone moiety has a high inductive effect when substitution

is in the node of the LUMO orbital (positions 4 and 5). When located in the node of a frontier molecular orbital, the functionalization causes the electron depletion in the σ -system, inducing a less repulsive interaction between σ and π -electrons in the functionalized fragment; thus, the orbital energy is stabilized.^{27,28} The latter is responsible for the red-shift in the absorption and emission wavelengths of aurones **5** and **8** compared to **1** and **4**.

The variations in the oscillator strength (f) for the $S_0 \rightarrow S_1$ transition and the transition dipole moment D (D_x , D_y and D_z) were studied for aurones **1**, **4**, **5** and **8**. The D values are related to the molecular polarization during the electronic excitation, where x , y and z are the Cartesian components of the transition dipole moment (for more details see the ESI†). Aurone **4** shows the highest oscillator strength ($f = 0.779$) compared to aurones **1**, **5** and **8**, which is evidenced by an increase in the transition dipole moment in the x component (see the x axis in Fig. 6). Therefore, the $\pi(\text{benzene}) \rightarrow \pi^*(\text{benzofuranone})$ charge separation is improved in aurone **4**, which is associated with the bromine substitution. In the same way, the molecular polarization in the excited state is improved by the bromine substitution in aurone **8** compared to the unsubstituted aurone **5**; this is a change in the oscillator strength from $f = 0.507$ (**5**) to $f = 0.639$ (**8**). Comparing systems **1** and **5** (or **4** and **8**), it is also concluded that the methoxy functionalization in the position 4 of the benzofuranone moiety causes the red-shifting and also allows the increase of the charge polarization due to electron excitation, which should also be considered in the design of highly efficient fluorophores based on aurones.

By the TD-DFT methodology, the S_1 excited state was fully optimized for all the aurones to obtain the fluorescence emission energies. The emission energies in chloroform are 2.41 eV, 2.47 eV, 2.40 eV and 2.46 eV for compounds **1**, **4**, **5** and **8**, respectively, which agree with the experimental measurements.

The optimized geometries of the emissive states show slight changes with respect to the ground state geometries,

**Fig. 6** HOMO and LUMO densities of aurone **4** in the ground state.

which are centred on the furanone moiety and C–C–C bridge. In this regard, bond distances and bond angles change up to ± 0.03 Å and $\pm 2^\circ$, respectively (see the ESI† for details); these slight geometrical changes have been associated with the Stokes shifts in aurone derivatives from previous DFT calculations.¹² Furthermore, in the S_1 emissive state, aurone **4** shows the highest values of f ($f = 0.760$) and D_x , resulting in a LUMO $\rightarrow$ HOMO deactivation with high fluorescence intensity, as was experimentally observed. Like in the $S_0 \rightarrow S_1$ transition, the hole–electron distributions in Fig. 7 show that the emissive state has charge-transfer character, where the deactivation pathway takes place by electron promotion from the benzofuranone (the hole) to the benzene moiety (the electron) of the aurones (for the hole–electron distribution calculations see the ESI†). It is important to note that the absence of the bromine substituent in the aurone derivatives **1** and **5** leads to lower oscillator strength values in the excited state, and therefore lower emission intensities are observed experimentally. Additionally, the emission energies were also computed in acetonitrile as solvent for comparison purposes; emission energies were of 2.32 eV ($f = 0.607$), 2.36 eV ($f = 0.841$), 2.30 eV ($f = 0.552$) and 2.35 eV ($f = 0.753$) for aurones **1**, **4**, **5** and **8**, respectively. The computed value of aurone **4** agrees with the value obtained experimentally (2.41 eV), and also shows the highest emission related to $S_1 \rightarrow S_0$ deactivation.

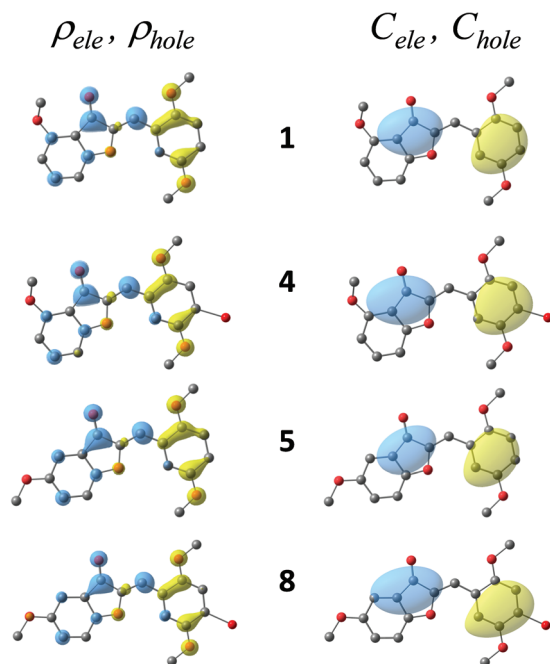


Fig. 7 Hole (ρ_{hole} , yellow) and electron (ρ_{ele} , blue) distributions of the first excited state S_1 (at its optimized geometry) of aurones **1**, **4**, **5** and **8**. Isovalues of 0.003 a.u. C_{hole} (yellow) and C_{ele} (blue) are representations based on the transformed ρ_{hole} and ρ_{ele} by means of Gaussian type functions; they are free of nodes and allow seeing a clear picture of the molecular polarization in the electronic transition. Isovalue of 0.0001 a.u.

3.4. Sensing of hydrophobic environment in proteins

One of the potential applications of fluorescent aurone derivatives is the sensing of hydrophobic environments in biological media.¹¹ This is due to their solvatochromic behaviour, as discussed above, being highly fluorescent in non-polar solvents and weakly fluorescent in polar media. Aurone **4** seems to be the most promising derivative due to its large Stokes shift (strong charge-transfer character in the excited state) and high fluorescence quantum yields. As an example, we show the binding of aurone **4** to human serum albumin (HSA), which is known to possess several binding sites for endogenous and exogenous molecules.²⁹ As can be seen in Fig. 8, the binding of aurone **4** to HSA in buffer produces a hypsochromic shift in the emission maxima, as well as a large increment in the fluorescence intensity of about 25-fold. When poly-L-glutamic acid (PGA) was used instead of HSA, which possesses a more random structure at pH 7,³⁰ the increment in the fluorescence was somewhat smaller suggesting this polypeptide offers a less hydrophobic environment for the aurone. The same behaviour was observed for aurone **1** in the presence of HSA, which also shows a high fluorescence quantum yield and a sizable Stokes shift. However, aurone **1** showed aggregation in water, which led to large variations in the emission intensities and further applications were not pursued. These results are comparable with previously reported sensing of biomolecules with other aurones,¹¹ and contributes to broaden the applications of aurones as fluorescent sensors. Since we have shown above that the inclusion of a bromine atom in the benzene ring improves charge polarization leading to enhanced fluorescence emission, the core of aurone **4** could be used to further develop sensors that will bind to specific regions in proteins.

3.5. Thermotropic behaviour in vesicles

Another important application of fluorescent molecules is the sensing of the microenvironment of the bilayer in lipid vesi-

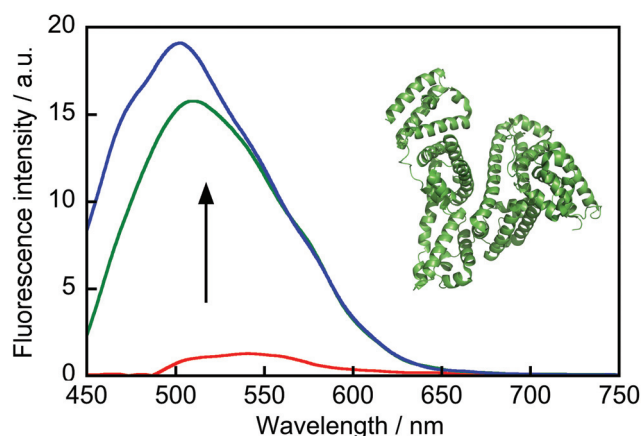


Fig. 8 Fluorescence spectra for aurone **4** (0.5 μM) in 10 mM phosphate buffer pH 7 at 25 $^\circ\text{C}$ in the absence (red) or presence of 15 μM PGA (green) or 15 μM HSA (blue). The samples were excited at 417 nm. Cartoon of the structure of HSA shown in the figure.

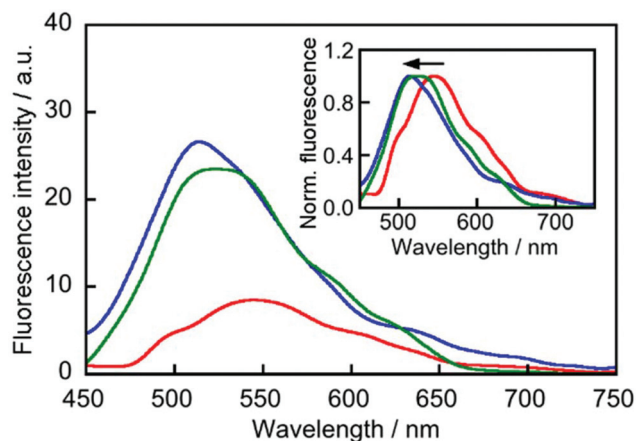


Fig. 9 Fluorescence spectra for aurone 4 (1.0 μM) in water at 25 $^{\circ}\text{C}$ (red), DPPC in the gel phase, at 25 $^{\circ}\text{C}$ (green) and in DPPC in the liquid crystalline phase, at 60 $^{\circ}\text{C}$ (blue). Inset: Normalized fluorescence spectra for aurone 4 in water (red), DPPC at 25 $^{\circ}\text{C}$ (green) and DPPC at 60 $^{\circ}\text{C}$ (blue). The samples were excited at their absorption maxima.

cles, for which aurones have not been investigated before. We explored the fluorescence response of aurone 4 in DPPC LUVs at different temperatures, where DPPC is in the gel phase at 25 $^{\circ}\text{C}$, and at a liquid crystalline phase at 60 $^{\circ}\text{C}$.³¹ As seen in Fig. 9, the fluorescence increases in the presence of DPPC vesicles compared to water, which is indicative of the incorporation of the aurone in the bilayer. This is also supported by the hypsochromic shift observed in the emission spectra (inset in Fig. 9), which agrees with the sensing of a less polar environment.

We also examined the thermotropic behaviour of aurone 4 in DPPC LUVs by measuring the fluorescence anisotropy at different temperatures in the range of 25–60 $^{\circ}\text{C}$. As shown in Fig. 10, aurone 4 shows a large anisotropy value of about 0.28

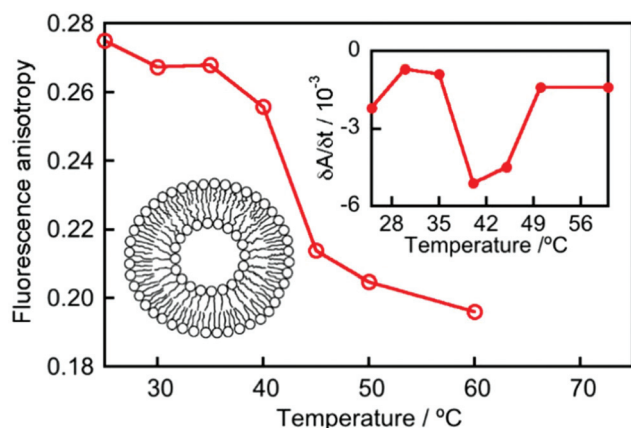


Fig. 10 Fluorescence anisotropy of aurone 4 (1.0 μM) in DPPC vesicles as a function of the temperature. The samples were excited at their absorption maxima. Inset: First derivative of the fluorescence anisotropy profile of aurone 4. The minimum value corresponds to the gel-liquid crystalline phase transition of DPPC. A cartoon of the liposome is included in the figure.

in DPPC at 25 $^{\circ}\text{C}$, which decreases slowly until 40 $^{\circ}\text{C}$ is surpassed. Afterwards, the anisotropy values remain at about 0.20. This thermotropic behaviour is typical of commonly used fluorescent probes such as 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH).^{32,33} The gel-liquid crystalline phase transition temperature of DPPC can be estimated from this curve to be between 40–45 $^{\circ}\text{C}$ (inset in Fig. 10), which is in agreement with the reported value of 41.5 $^{\circ}\text{C}$ determined by the time-resolved fluorescence lifetime of DPH.^{32,33} The same behaviour is observed with a laurdan fluorescence probe, which shows that the phase transition does not affect the morphology of the liposomes.³⁴

It must be noted that it is not our purpose to determine accurately the transition temperature of DPPC, but rather to show that aurones are fairly good as fluorescent probes for the photophysical characterization of lipid vesicles.

4. Conclusions

Aurone derivatives 1–8 studied in this work showed a marked solvatochromic emission behaviour in different solvents and high fluorescence quantum yields. Specifically, the most interesting compound was aurone 4, which exhibited the highest emission quantum yield and sensor-like behaviour for proteins and liposomes. Theoretical calculations showed that the emissive state of aurones 1–8 shows their charge-transfer (CT) character, where the position of the substituents on the benzofuranone and benzene moieties plays a key role in the charge polarization due to electron excitation. Additionally, absorption and emission wavelengths are red-shifted due to inductive effects coming from the methoxy substitution on the benzofuranone moiety. Aurone 4 was successfully tested as a fluorescent probe for the photophysical characterization of proteins as well as lipid vesicles. The aurone scaffold bearing methoxy and bromine substituents is interesting for developing further fluorescence applications such as visible-range optical sensors.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the financial support of FONDECYT (grant 1161816). C. E.-B. would like to thank FONDECYT (Postdoctoral fellowship 3150198). D.C.-A. thanks the financial support by the ICM grant no. 120082.

References

- V. Zwick, A.-O. Chatzivasilieiou, N. Deschamps, M. Roussaki, C. A. Simões-Pires, A. Nurisso, I. Denis, C. Blanquart, N. Martinet, P.-A. Carrupt, A. Detsi and M. Cuendet, Aurones as histone deacetylase inhibitors: Identification of key features, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, **24**, 5497–5501.
- A. Detsi, M. Majdalani, C. A. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina and P. Kefalas, Natural and synthetic 2'-hydroxy-

- chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 8073–8085.
- 3 M. Hadjeri, C. Beney and A. Boumendjel, Recent advances in the synthesis of conveniently substituted flavones, quinolones, chalcones and aurones: Potential biologically active molecules, *Curr. Org. Chem.*, 2003, **7**, 679–689.
- 4 N. Bhasker and M. K. Reddy, Synthesis and Antibacterial Activity of Prenyloxy Chalcones and Prenyloxy Aurones, *Indian J. Heterocycl. Chem.*, 2011, **21**, 49–52.
- 5 S. Y. Shin, M. C. Shin, J. S. Shin, K. T. Lee and Y. S. Lee, Synthesis of aurones and their inhibitory effects on nitric oxide and PGE(2) productions in LPS-induced RAW 264.7 cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 4520–4523.
- 6 M. Y. Song, G. S. Jeong, H. S. Lee, K. S. Kwon, S. M. Lee, J. W. Park, Y. C. Kim and B. H. Park, Sulfuretin attenuates allergic airway inflammation in mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, **400**, 83–88.
- 7 J. M. Kim, E. M. Noh, K. B. Kwon, J. S. Kim, Y. O. You, J. K. Hwang, B. M. Hwang, M. S. Kim, S. J. Lee, S. H. Jung, H. J. Youn, E. Y. Chung and Y. R. Lee, Suppression of TPA-induced tumor cell invasion by sulfuretin via inhibition of NF-kappaB-dependent MMP-9 expression, *Oncol. Rep.*, 2013, **29**, 1231–1237.
- 8 K. S. Kumar and R. Kumaresan, A Quantum Chemical Study on the Antioxidant Properties of Aureusidin and Bracteatin, *Int. J. Quantum Chem.*, 2011, **111**, 4483–4496.
- 9 V. Siddaiah, M. Maheswara, C. Venkata Rao, S. Venkateswarlu and G. V. Subbaraju, Synthesis, structural revision, and antioxidant activities of antimutagenic homoisoflavonoids from *Hoffmanosseggia intricata*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, **17**, 1288–1290.
- 10 Y. Li, X. Qiang, L. Luo, Y. Li, G. Xiao, Z. Tan and Y. Deng, Synthesis and evaluation of 4-hydroxyl aurone derivatives as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem.*, 2016, **24**, 2342–2351.
- 11 N. Shanker, O. Dilek, K. Mukherjee, D. W. McGee and S. L. Bane, Aurones: Small Molecule Visible Range Fluorescent Probes Suitable for Biomacromolecules, *J. Fluoresc.*, 2011, **21**, 2173–2184.
- 12 Y. S. Xue, Y. Y. Dou, L. An, Y. G. Zheng, L. Zhang and Y. Liu, Electronic structure and spectral properties of aurones as visible range fluorescent probes: a DFT/TDDFT study, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 7002–7010.
- 13 M. Ono, Y. Maya, M. Haratake, K. Ito, H. Mori and M. Nakayama, Aurones serve as probes of P-amyloid plaques in Alzheimer's disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, **361**, 116–121.
- 14 Y. Maya, M. Ono, H. Watanabe, M. Haratake, H. Saji and M. Nakayama, Novel Radioiodinated Aurones as Probes for SPECT Imaging of beta-Amyloid Plaques in the Brain, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 95–101.
- 15 H. H. Chen, Y. H. Sun, C. J. Zhou, D. X. Cao, Z. Q. Liu and L. Ma, Three hydroxy aurone compounds as chemosensors for cyanide anions, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2013, **116**, 389–393.
- 16 H. H. Chen, Z. Q. Liu, D. X. Cao, S. S. Lu, J. Z. Pang and Y. H. Sun, Two new fluorescence turn-on chemosensors for cyanide based on dipyridylamine and aurone moiety, *Sens. Actuators, B*, 2014, **199**, 115–120.
- 17 Y. X. Xu, H. H. Chen, R. F. Guan, D. X. Cao, Q. Q. Wu and X. Y. Yu, Synthesis and Cyanide Anion Recognition of a New Displacement Fluorescence Chemosensor Based on Two-branched Aurone, *Fibers Polym.*, 2016, **17**, 181–185.
- 18 N. Morales-Camilo, C. O. Salas, C. Sanhueza, C. Espinosa-Bustos, S. Sepulveda-Boza, M. Reyes-Parada, F. Gonzalez-Nilo, M. Caroli-Rezende and A. Fierro, Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Simulation of Chalcones and Aurones as Selective MAO-B Inhibitors, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2015, **85**, 685–695.
- 19 R. A. Velapoldi and K. D. Mielenz, A Fluorescence Standard Reference Material - Quinine Sulfate Dihydrate, *Appl. Opt.*, 1981, **20**, 1718–1718.
- 20 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez and J. A. Pople, *R. C. Gaussian 03*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
- 21 C. Adamo and V. Barone, Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model, *J. Chem. Phys.*, 1999, **110**, 6158–6170.
- 22 G. Scalmani and M. J. Frisch, Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism, *J. Chem. Phys.*, 2010, **132**, 114110.
- 23 T. Lu and F. Chen, Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer, *J. Comput. Chem.*, 2012, **33**, 580–592.
- 24 L. D. Mayer, M. J. Hope and P. R. Cullis, Vesicles of Variable Sizes Produced by a Rapid Extrusion Procedure, *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, **858**, 161–168.
- 25 M. J. Hope, M. B. Bally, G. Webb and P. R. Cullis, Production of Large Unilamellar Vesicles by a Rapid Extrusion Procedure - Characterization of Size Distribution, Trapped Volume and Ability to Maintain a Membrane-Potential, *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **812**, 55–65.

- 26 L. D. Mayer, M. B. Bally, M. J. Hope and P. R. Cullis, Techniques for Encapsulating Bioactive Agents into Liposomes, *Chem. Phys. Lipids*, 1986, **40**, 333–345.
- 27 I. Avilov, P. Minoofar, J. Cornil and L. De Cola, Influence of Substituents on the Energy and Nature of the Lowest Excited States of Heteroleptic Phosphorescent Ir(III) Complexes: A Joint Theoretical and Experimental Study, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 8247–8258.
- 28 D. Cortes-Arriagada, L. Sanhueza, I. Gonzalez, P. Dreyse and A. Toro-Labbe, About the electronic and photophysical properties of iridium(III)-pyrazino[2,3-f][1,10]-phenanthroline based complexes for use in electroluminescent devices, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 726–734.
- 29 D. Z. Zvetanka, Studies on Drug – Human Serum Albumin Binding: The Current State of the Matter, *Curr. Pharm. Des.*, 2015, **21**, 1817–1830.
- 30 J. D. Nickels, S. Perticaroli, G. Ehlers, M. Feygensohn and A. P. Sokolov, Rigidity of poly-L-glutamic acid scaffolds: Influence of secondary and supramolecular structure, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2015, **103**, 2909–2918.
- 31 T. Parasassi, G. De Stasio, A. d'Ubaldo and E. Gratton, Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence, *Biophys. J.*, 1990, **57**, 1179–1186.
- 32 R. D. Klausner, A. M. Kleinfeld, R. L. Hoover and M. J. Karnovsky, Lipid domains in membranes. Evidence derived from structural perturbations induced by free fatty acids and lifetime heterogeneity analysis, *J. Biol. Chem.*, 1980, **255**, 1286–1295.
- 33 G. M'Baye, Y. Mely, G. Duportail and A. S. Klymchenko, Liquid ordered and gel phases of lipid bilayers: fluorescent probes reveal close fluidity but different hydration, *Biophys. J.*, 2008, **95**, 1217–1225.
- 34 L. A. Bagatolli and E. Gratton, Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles, *Biophys. J.*, 1999, **77**, 2090–2101.

Supramolecular Reversible On–Off Switch for Singlet Oxygen Using Cucurbit[*n*]uril Inclusion Complexes

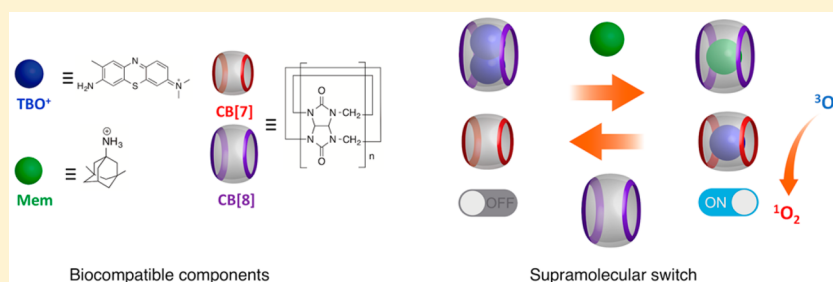
José Robinson-Duggon,[†] Francisco Pérez-Mora,[†] Liliana Valverde-Vásquez,[†] Diego Cortés-Arriagada,[‡] Julio R. De la Fuente,[§] Germán Günther,[§] and Denis Fuentealba^{*,†,§}

[†]Laboratorio de Estructuras Biosupramoleculares, Departamento de Química Física, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

[‡]Programa Institucional de Fomento a la Investigación, Desarrollo e Innovación, Universidad Tecnológica Metropolitana, Ignacio Valdivieso 2409, San Joaquín, Santiago, Chile

[§]Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Química Orgánica y Físicoquímica, Universidad de Chile, Casilla 233, Santiago 1, Chile

S Supporting Information



ABSTRACT: A novel strategy to control the generation of singlet oxygen by a photosensitizer using cucurbit[*n*]uril inclusion complexes is shown herein, and the strategy has great potential for therapeutic applications. We show the basic requirements of the photosensitizer complexes in order to develop an *on–off* switch for singlet oxygen that is reversible using competitive binding. The supramolecular strategy proposed in this paper avoids complex synthetic schemes in order to activate or deactivate the photosensitizer as previous work has shown and supports the use of biocompatible materials. Mechanistic insights into the control over the generation of singlet oxygen are provided, which strongly emphasize the key role of the cucurbit[*n*]uril macrocycles in the stabilization or deactivation of the triplet excited state.

1. INTRODUCTION

Singlet oxygen, $O_2(^1\Delta_g)$ or commonly 1O_2 , corresponds to the first excited state of molecular oxygen,^{1–3} which is very reactive and capable of damaging organic material and biological targets such as DNA, RNA, and proteins.^{4,5} The generation of this species enables many applications in biology and medicine such as the photochemical synthesis of natural products and drugs,⁶ photodegradation of pollutants,^{7–12} photoinactivation of bacteria,^{13–18} and the abatement of cancer cells.^{19–25} The latter is known as photodynamic therapy (PDT), which is a minimally invasive procedure approved for the treatment of several types of cancer.^{24,26–28} This therapy requires the use of a photosensitizer (PS), the presence of oxygen, and light of an appropriate wavelength to excite the PS. 1O_2 is generated through an energy exchange mechanism between the triplet excited state of the PS and molecular oxygen.

Controlling PS activation, and thus the generation of 1O_2 , is crucial to therapeutic applications, in which the PS needs to be administered systemically or topically in its inactive form (*off* state), turned *on* during the therapy, and ideally turned *off* again afterward to avoid patient sensitivity to ambient light. Prior

work on PS activation has included the use of intramolecular quenching of the excited states, e.g. by Förster resonance energy transfer, and activation by different mechanisms such as pH shift, enzymatic cleavage, binding to nucleic acids, or chemical modifications upon light irradiation.^{29–34} However, these approaches require complex synthetic schemes and/or are irreversible after the PS has been switched *on*. This paper demonstrates a novel supramolecular approach to the activation and deactivation of PS using solely competitive binding to macrocycles.

Our group and others have explored the effect of PS encapsulation into cucurbit[*n*]urils (CB[*n*], *n* = 7 or 8, Scheme 1),^{32,35–40} a family of synthetic macrocycles that shows remarkable binding properties for a wide range of guests.^{41–44}

Notably, binding constants for PS based on an acridinium or phenothiazinium core are on the submicromolar range,³⁵ which is amenable for therapeutic applications. We recently reported

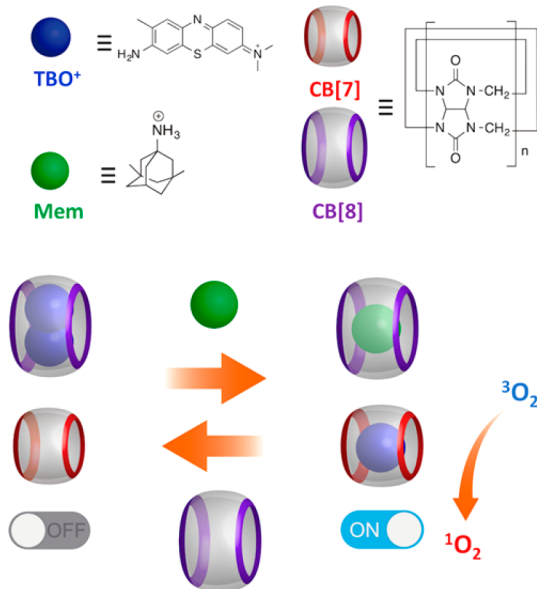
Received: August 3, 2017

Revised: September 12, 2017

Published: September 12, 2017



Scheme 1. Reversible Supramolecular Control of $^1\text{O}_2$ Generation by TBO^+ Using $\text{CB}[n]$ s Inclusion Complexes and Mem as a Competitive Guest^a



^aThe structures for the molecules are shown on top.

the $^1\text{O}_2$ generation by acridine orange complexes with $\text{CB}[7]$ and $\text{CB}[8]$,⁴⁰ which together with reports from other authors^{32,36,45} evidenced that $^1\text{O}_2$ generation can be either enhanced or decreased. To the best of our knowledge, no other macrocycle or other supramolecular approach has demonstrated such ability and versatility.

Here we demonstrate the extraordinary impact of $\text{CB}[n]$ s on $^1\text{O}_2$ generation by the PS toluidine blue O (TBO^+) and show how it can be switched *on* and *off* reversibly by competition with the biocompatible guest memantine (Mem) or by direct self-sorting between different $\text{CB}[n]$ s (Scheme 1).

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Chemicals. Cucurbit[n]uril ($\text{CB}[n]$, $n = 7, 8$), 9,10-anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid (ABMA), rose bengal (RB), memantine (Mem), bis(cyclopentadienyl) cobalt(III) hexafluorophosphate (Cob^+), and deuterium oxide (D_2O) were obtained from Sigma and used without further purification. Toluidine blue O (TBO^+) was obtained from Sigma and purified using preparative TLC, eluted with ethanol/HCl (99:1), and stored in methanol. The purity of TBO^+ was confirmed by ^1H NMR. Ultrapure water from a Milli-Q water purifying system was used to prepare all the solutions (resistivity of 18.2 $\text{M}\Omega\text{ cm}$).

2.2. Sample Preparation. Stock solutions of TBO^+ were prepared in methanol to approximately 1 mM, and the actual concentration was assessed using its molar extinction coefficient (TBO^+ $\epsilon_{636\text{nm}} = 3.97 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).⁴⁶ Stock phosphate buffer (PB) solutions were prepared by mixing 100 mM Na_2HPO_4 and NaH_2PO_4 solutions to achieve a pH of 7.0 (pHmeter Hanna HI2221). Stock solutions of $\text{CB}[7]$ were prepared in water to approximately 1 mM. Saturated solution of $\text{CB}[8]$ was prepared in water and filtered through a 0.2 μm pore-size Minisart filter (Sartorius), resulting in a concentration of 78 μM . Both $\text{CB}[n]$ s solutions were titrated against a known concentration of Cob^+ by ultraviolet–visible (UV–vis) spec-

troscopy.⁴⁷ Memantine stock solution (400 μM) was prepared in 10 mM PB pH 7.0.

Aliquots of the stock solutions of TBO^+ and $\text{CB}[n]$ s were mixed directly in a 1 cm path length quartz cell, and the volume was completed to 3.00 mL with PB pH 7.0. Mem and ABMA were added in small aliquots so the concentration did not change significantly. After addition of Mem, samples were stirred for 5 min before irradiation. This is necessary for the displacement to take place. Final concentrations were 4 μM for TBO^+ , 4 μM for $\text{CB}[7]$, 4 μM for $\text{CB}[8]$, 8 μM for Mem, and 10 mM PB pH 7.0. PB solutions for singlet oxygen quantum yield determination were lyophilized and reconstituted in D_2O , and the pD was adjusted to 7. All samples were prepared and manipulated in the dark.

2.3. Irradiation Setup. Samples were irradiated for 15 min at their absorption maxima using a custom-built PTI equipment working with a 150 W Xe lamp. The irradiation wavelength was selected with a monochromator (10 nm bandwidth). The samples were constantly stirred during irradiation, and the temperature was kept at 20 $^\circ\text{C}$ using a water bath.

TBO^+ was irradiated at 587 nm in the presence of $\text{CB}[8]$ and at 631 nm after the addition of Mem because of the shift in the absorption maxima. The light intensity received by the samples was equal to 58 W m^{-2} at 587 nm and to 45 W m^{-2} at 631 nm (YSI Kettering 65A radiometer).

2.4. Absorption and Fluorescence Measurements. The formation of the inclusion complexes of TBO^+ and $\text{CB}[n]$ s in the presence or absence of Mem was assessed by absorption spectroscopy using an HP8453 spectrophotometer. Fluorescence emission spectra were obtained by exciting the samples at their absorption maxima using a LS55 PerkinElmer fluorimeter. The temperature was kept at 25 $^\circ\text{C}$ with a water bath.

2.5. Singlet Oxygen Measurements. Singlet oxygen was detected by the bleaching of ABMA (1.6 μM). ABMA consumption was measured by exciting the samples at 395 nm and measuring the emission at 412 nm. All measurements were performed twice.

Singlet oxygen luminescence decays at 1270 nm were acquired using a Fluotime 200 spectrometer consisting of a multichannel scaler Nanoharp 200. Excitation at 532 nm was achieved with a FTSS355-Q3 laser (Crystal Laser, Berlin, Germany) working at a 1 kHz repetition rate. For the detection at 1270 nm, a NIR PMT H10330A (Hamamatsu) was employed. Relative singlet oxygen quantum yields (Φ_Δ) were evaluated by comparing the pre-exponential terms at time zero for the 1270 nm signals of optically matched samples. Additionally, triplet excited-state lifetimes were determined from the rise time of decays. Rose Bengal was used as a reference ($\Phi_\Delta = 0.76$).⁴⁸

2.6. Computational Methodology. Theoretical studies were performed at the density functional theory (DFT) level in the ORCA 3.0.3 program.^{49,50} The B3LYP⁴⁹ functional was used in combination with the all-electron Def2-SVP basis sets for all the atoms.⁵¹ The B3LYP functional was selected because of its application in studies related to host–guest complexes involving $\text{CB}[n]$ s.^{52–55} Dispersion force correction for energies and gradients were included by means of the DFT-D3 method, in combination with the Becke–Johnson damping function.⁵⁶ In the DFT-D3 method, the dispersion correction (E_{disp}) is included in the SCF-DFT energies ($E_{\text{SCF-DFT}}$), which are obtained with the exchange–correlation functional; then, the corrected energies are expressed as a sum of electronic and dispersion contributions: $E_{\text{DFT-D3}} = E_{\text{SCF-DFT}} + E_{\text{disp}}$. Basis set

superposition errors were also corrected by the geometrical counterpoise.⁵⁷ All the systems were fully optimized without symmetry or geometry constraints. Continuum solvent effects were included with the COSMO method in the ORCA program, and with water as solvent.⁵⁸ Binding energies (E_{bind}) were obtained as $E_{\text{bind}} = E_{\text{A-B}} - (E_{\text{A}} + E_{\text{B}})$, where E_{A} , E_{B} , and $E_{\text{A-B}}$ correspond to the total energies of the fragment A, B, and the A–B complex, respectively; the lower the value of E_{bind} , the larger the interaction strength. In this regard, total binding energies can be also decomposed into the sum of electronic and dispersion contributions: $E_{\text{bind}} = E_{\text{bind-SCF-DFT}} + E_{\text{vdW}}$, where $E_{\text{bind-SCF-DFT}}$ is the electronic contribution and would be the binding energy without dispersion corrections, whereas E_{vdW} is the dispersion contribution obtained as $E_{\text{vdW}} = E_{\text{disp(A-B)}} - (E_{\text{disp(A)}} + E_{\text{disp(B)}})$, where $E_{\text{disp(i)}}$ are the DFT-D3 dispersion corrections of the host–guest system and the isolated fragments. Wave function analyses were performed in the Multiwfn program;⁵⁹ atomic charges were obtained with the Mulliken method in the ORCA program.

2.7. Laser Flash Photolysis. Experiments were performed on our modernized instrument described previously.^{60,61} The flash photolysis setup is provided with a Continuum Surelite I 10 Hz Q-switched Nd:YAG laser with the second harmonic generators to excite the samples at 532 nm with pulses of 15 mJ. The signals are captured by a Hamamatsu 928 photomultiplier into a WaveSurfer 600 MHz LeCroy oscilloscope. Software written in National Instrument LabViews 8.0 controls the laser, monochromator, and shutters. The captured data are fed into a program, written in Igor Pro 6.3, for treatment and display. The transient spectra were obtained by swiping from 300 to 700 nm each sample solution (3 mL) bubbled with argon for 20 min in 10 mm square quartz cells sealed with a septum. Quenching by oxygen was performed with samples saturated on argon, air, or O₂ measuring the lifetimes at 420 nm for each one.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Basis for the Supramolecular Switch. In order to develop this supramolecular *on–off* switch for ¹O₂, several requirements need to be fulfilled. First, knowing the absorption and emission properties of the PS and its complexes is essential to study the formation of the supramolecular complexes. Figure 1 shows the characteristic absorption and emission spectra for TBO⁺ and its complexes with CB[7] and CB[8]. Both inclusion

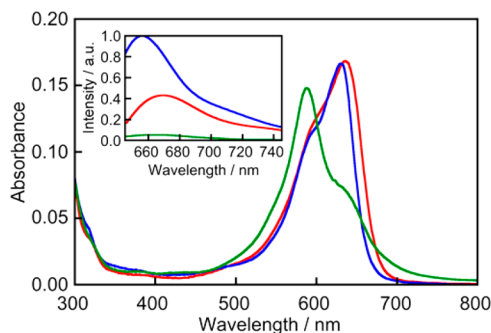


Figure 1. Absorption spectra for TBO⁺ (4 μM) in the absence (red line) and presence of 50 μM CB[7] (blue line) or 35 μM CB[8] (green line) in 10 mM phosphate buffer pH 7.0. Inset: fluorescence spectra for the same samples. Absorption/emission maxima are observed at 636/670, 631/655, and 587/669 nm for TBO⁺, TBO⁺@CB[7], and (TBO⁺)₂@CB[8], respectively.

complexes show blue-shifted maxima for the absorption and emission with respect to TBO⁺, which is the typical behavior observed for structurally similar dyes.^{35,39} On the other hand, the emission intensity for the CB[7] complex is increased, while it is quenched for the CB[8] complex; the latter is consequence of autoquenching inside the cavity due to the inclusion of two dye molecules.^{35,39}

Following the spectral characterization, we determined the binding constants for both complexes. This is likewise a requirement to establish the concentrations of the macrocycles needed to ensure quantitative encapsulation and also to establish if displacement from one macrocycle into the other is feasible. The binding isotherms (Figure 2) were fitted using numerical analysis to 1:1 or 2:1 binding models as previously reported (see refs 39 and 62 for details).

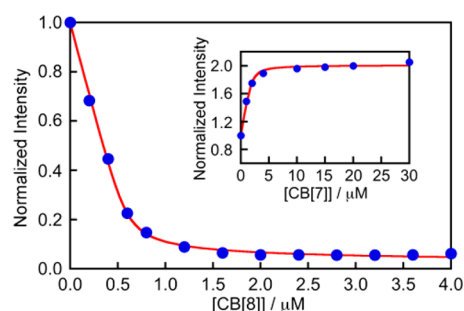


Figure 2. Binding isotherms based on the fluorescence intensity for a solution of TBO⁺ (2 μM) in the presence of different concentrations of CB[8]. Inset: fluorescence intensities for a 2 μM TBO⁺ solution in the presence of different concentrations of CB[7]. All samples in 10 mM phosphate buffer pH 7.0 at 25 $^{\circ}\text{C}$. The data were fitted using numerical analysis as reported in refs 39 and 62.

The values obtained for the binding constants were $(5.5 \pm 0.6) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ for CB[7] with a stoichiometry of 1:1 and $(1.9 \pm 0.1) \times 10^{14} \text{ M}^{-2}$ for CB[8] with a stoichiometry of 2:1. No stepwise binding constants could be discerned in this case for CB[8], which suggests similar binding affinities for both TBO⁺ molecules (no cooperativity). The fact that the binding constant for TBO⁺ with CB[8] is higher than for CB[7] allows for preferential inclusion into the former when both macrocycles are present.

Because the TBO⁺@CB[7] complex has not been reported before in the literature, we performed theoretical calculations to assess the molecular structure of the complex (Figure 3 and details in the Supporting Information). For this purpose, we used dispersion-corrected DFT calculations at the B3LYP-D3/Def2-SVP level of theory.

The two main conformations for the inclusion complex are observed in Figure 3. Conformation 1 is the most stable (binding energy of -1.02 eV) with the dimethylammonium moiety at 4.30 Å of the center of CB[7], while conformation 2 (binding energy of 0.9 eV) is $\sim 0.1 \text{ eV}$ less stable than conformation 1, where the dimethylammonium group is displaced out of the cavity by 2.25 Å with respect to 1, possibly decreasing the electrostatic interaction with CB[7] portals. Electron density analysis based on the NCI scheme shows that TBO⁺ is stabilized by hydrogen bonds with the oxygen atoms of the carbonyl groups at the portals of CB[7], with distances in the range of 2.23–2.39 Å (highlighted as green lines in Figure 3). In both conformations, TBO⁺ is observed to slightly protrude out of the CB[7] cavity.

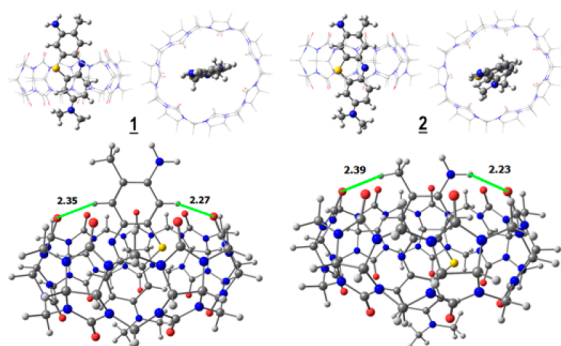


Figure 3. Optimized molecular structures for the two main conformations of $\text{TBO}^+@CB[7]$ inclusion complex. Green lines indicate hydrogen bond interactions. Distances are in angstroms (Å). Color code for the atoms: white (H), gray (C), blue (N), and yellow (S).

Once the complexes were well-characterized, we evaluated their capability to generate $^1\text{O}_2$ by using 9,10-anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid (ABMA) as a chemical trap.^{40,63} The decrease in ABMA fluorescence is indicative of its consumption by reaction with $^1\text{O}_2$ (Figure 4).

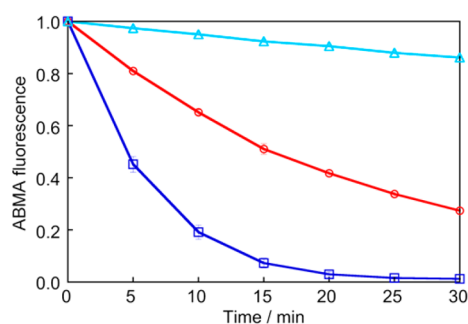


Figure 4. Normalized fluorescence intensity for ABMA ($1.6 \mu\text{M}$) at 412 nm when irradiated with TBO^+ ($4 \mu\text{M}$) in the absence of $\text{CB}[n]$ s (red circles), in the presence of $50 \mu\text{M}$ $\text{CB}[7]$ (blue squares), and in the presence of $35 \mu\text{M}$ $\text{CB}[8]$ (light blue triangles) in 10 mM phosphate buffer $\text{pH } 7.0$. The samples were irradiated at their absorption maxima.

The $\text{TBO}^+@CB[7]$ complex generated more $^1\text{O}_2$ than TBO^+ by itself, while for the $(\text{TBO}^+)_2@CB[8]$ complex $^1\text{O}_2$ generation is almost suppressed. It is noteworthy that the difference between the generation of $^1\text{O}_2$ in the $\text{CB}[7]$ and $\text{CB}[8]$ complexes is very large allowing this system to be used as an *on-off* switch. This behavior is different than previously reported for acridine orange and methylene blue,^{36,40} which showed either an increase or a decrease in $^1\text{O}_2$ generation with both macrocycles, respectively.

3.2. Switching the PS on. The properties shown above for TBO^+ and its complexes allow the design of a switching experiment in which in the same cuvette TBO^+ , $\text{CB}[7]$, and $\text{CB}[8]$ are present.

The binding constants determined allow us to foresee that TBO^+ will bind preferentially to $\text{CB}[8]$ even in the presence of $\text{CB}[7]$, and this is confirmed experimentally by the UV-vis absorption spectra shown in the inset of Figure 5 (red line) where the maxima for the $(\text{TBO}^+)_2@CB[8]$ complex is observed. Upon addition of ABMA to the cuvette and later irradiation of the system, less than 10% of ABMA is consumed indicating little production of $^1\text{O}_2$ (Figure 5; see the

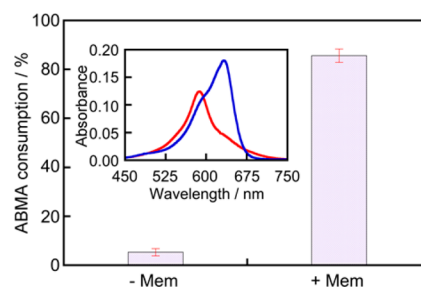
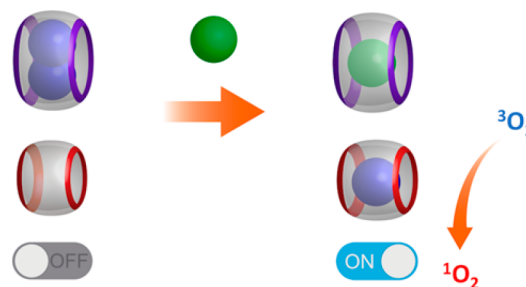


Figure 5. Generation of $^1\text{O}_2$ measured as the consumption of ABMA ($1.6 \mu\text{M}$) before and after the addition of Mem ($8 \mu\text{M}$). Inset: absorption spectra for the sample before (red line) and after (blue line) the addition of Mem. The sample contained TBO^+ ($4 \mu\text{M}$), $\text{CB}[7]$ ($4 \mu\text{M}$), and $\text{CB}[8]$ ($4 \mu\text{M}$) plus ABMA altogether in 10 mM phosphate buffer $\text{pH } 7.0$. The sample was irradiated for 15 min at 587 nm before the addition of Mem and at 631 nm after the addition of Mem.

fluorescence spectra in the Supporting Information). This is the off state.

In order to turn the system *on*, TBO^+ must be displaced from $\text{CB}[8]$ into $\text{CB}[7]$. For this purpose, Mem is an ideal displacement agent as it binds to $\text{CB}[8]$ with a high binding constant of $1.7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ and with a much lower affinity to $\text{CB}[7]$ ($5.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$).⁶⁴ In this regard, Mem has been used recently as a model drug for its release from $\text{CB}[7]$ when coupled to a photoswitch.⁶⁵ After the addition of Mem to the system, the formation of the $\text{TBO}^+@CB[7]$ inclusion complex is observed (inset in Figure 5, blue line). It is important to consider here that the binding constant for Mem with $\text{CB}[8]$ is in practice higher than that for TBO^+ because in the latter case two molecules bind with similar affinities ($\approx 10^7 \text{ M}^{-1}$ for each TBO^+). Upon continued irradiation, about 90% of ABMA was consumed (Figure 5), demonstrating the PS had been switched *on* as depicted in Scheme 2.

Scheme 2. Strategy to Switch *on* the Generation of $^1\text{O}_2$ Using Both $\text{CB}[7]$ and $\text{CB}[8]$ and Mem as a Competitive Guest



3.3. Switching the PS off. The same principles used to switch the system *on* can be used to turn it *off*, which would be highly beneficial to avoid prolonged sensitization to ambient light after therapy.

In this case, the addition of a competitive guest such as Mem is not needed because the binding constant for TBO^+ with $\text{CB}[8]$ is higher than that for $\text{CB}[7]$, although only slightly. Thus, the sole addition of $\text{CB}[8]$ in a slight excess to the system is enough to displace the PS from $\text{CB}[7]$ into $\text{CB}[8]$ as shown in Figure 6. As depicted in Scheme 3, the self-sorting properties of $\text{CB}[n]$ s⁶⁶ allow the movement of the PS between the macrocycles, switching it to the off state.

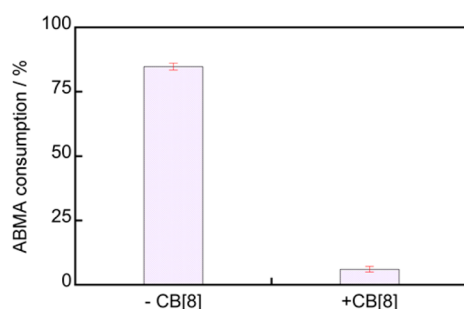
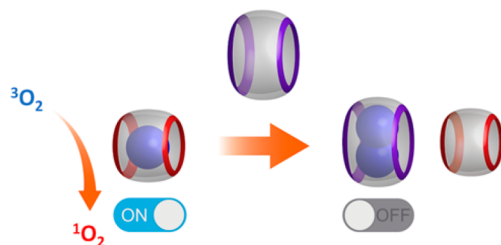


Figure 6. Generation of $^1\text{O}_2$ measured as the consumption of ABMA ($1.6\ \mu\text{M}$) before and after the addition of CB[8] ($8\ \mu\text{M}$). The sample contained TBO $^+$ ($4\ \mu\text{M}$) and CB[7] ($4\ \mu\text{M}$) plus ABMA altogether in 10 mM phosphate buffer pH 7.0. The sample was irradiated for 15 min at 631 nm before the addition of CB[8] and at 587 nm after the addition of CB[8].

Scheme 3. Strategy to Switch off the Generation of $^1\text{O}_2$ Using Self-Sorting Properties of CB[n]s



In this way, the supramolecular control of $^1\text{O}_2$ generation constitutes a simple strategy that encourages further testing in specific applications. As a side benefit, no PS photobleaching is observed during irradiation when TBO $^+$ is encapsulated into CB[n]s, contrary to the irradiation of TBO $^+$ by itself (Figures S2 and S3). This is important because the encapsulation into CB[n]s leads to the possibility of reusing the system several times, as potentially needed for therapeutic applications.

3.4. Insights into the Mechanism. The effects induced by complexation with CB[n]s on the generation of $^1\text{O}_2$ are still not well-understood. The efficiency of $^1\text{O}_2$ generation depends on the triplet excited-state lifetime of the PS, the yield for the triplet excited state (or intersystem crossing), the quenching rate constant of the triplet by oxygen, and competitive deactivation processes. Scaiano and collaborators studied the photophysics of the triplet excited state of methylene blue-CB[7] inclusion complex.³⁶ They reported that inclusion of the PS in the cavity of CB[7] restricts oxygen accessibility, leading to lower quenching rate constants of the triplet excited state resulting in lower quantum yields for $^1\text{O}_2$ generation. On the contrary, our group recently observed an enhancement of $^1\text{O}_2$ generation by acridine orange-CB[7] inclusion complex,⁴⁰ which is the same effect observed herein for TBO $^+$.

To gain insights into the mechanism for $^1\text{O}_2$ control by CB[n]s, we performed laser flash photolysis studies to determine triplet excited-state kinetics and quenching rate constants by oxygen and also direct detection of $^1\text{O}_2$ by its luminescence at 1270 nm (see the Supporting Information for details). $^1\text{O}_2$ quantum yields (Φ_Δ), rate constants for $^1\text{O}_2$ generation (k_Δ), triplet excited-state lifetimes (τ_T), and quenching rate constants by O_2 (k_q) for TBO $^+$ and its CB[n] complexes are summarized in Table 1.

Table 1. Singlet Oxygen Quantum Yields (Φ_Δ), Rate Constants for the Generation of $^1\text{O}_2$ (k_Δ), Lifetimes of the Triplet Excited States (τ_T), and Quenching Rate Constants by O_2 (k_q) for TBO $^+$ in the Absence and Presence of CB[n]s

	no CB[n]	CB[7]	CB[8]
Φ_Δ^a	0.18	0.27	0.07
$k_\Delta [\times 10^5\ \text{s}^{-1}] (1/k_\Delta [\mu\text{s}])^{a,b}$	4.5 (2.2)	0.95 (10.5)	1.2 (8.3)
$\tau_T [\mu\text{s}] (\text{Ar})^c$	7.8	13.8	9.5
$\tau_T [\mu\text{s}] (\text{air})^c$	2.2	8.1	7.3
$\tau_T [\mu\text{s}] (\text{O}_2)^c$	0.47	3.9	2.4
$k_q(\text{O}_2) [\times 10^9\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}]^d$	1.60	0.14	0.25

^aIn D_2O buffer (pD 7). ^bObtained from the growth of the $^1\text{O}_2$ luminescence signal. ^cTriplet excited-state lifetimes measured from the decay at 420 nm in Ar, air, or O_2 -saturated solutions (buffer pH 7). ^dQuenching plots obtained from the lifetime measurements in Ar, air, and O_2 -saturated solutions. Concentrations of O_2 in water reported in ref 36.

Although TBO $^+$ is a potent PS, its Φ_Δ is pH-dependent, and lower values are observed at neutral or acidic pHs,⁶⁷ which explains the value of 0.18 obtained at pD 7. In the presence of CB[7], the value for Φ_Δ increased 1.5 times, whereas it decreased 2.6 times with the addition of CB[8], in agreement with the results shown above for the chemical trapping of $^1\text{O}_2$.

The transient absorption spectra for TBO $^+$ in the absence and presence of CB[7] and CB[8] show similar features with a broad absorption band with maxima at 420 nm and a strong ground-state depletion centered around 600 nm (see the transient spectra in the Supporting Information). The absorption band at 420 nm is strongly quenched by oxygen and thus was attributed to the triplet excited state of TBO $^+$. Its triplet excited-state lifetime in the absence of oxygen (Ar-saturated) increased from 7.8 to 13.8 μs when included into CB[7] and to 9.5 μs when included into CB[8]. These increments are consistent with the encapsulation of other PS into CB[n]s.^{36,40,45} In air- and oxygen-saturated solutions, the triplet lifetimes were shorter as expected for the quenching of the triplet excited state by oxygen. Indeed, the calculated quenching rate constants for TBO $^+$ and its complexes are in the order of $10^9\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$ (see Table 1), which supports the assignment of the transient species to the triplet.

It is remarkable to notice that even when the quenching rate constant by oxygen for the TBO $^+$ @CB[7] complex is lower than for free TBO $^+$ (see Table 1), the Φ_Δ is increased. Therefore, other factors must also be involved in the modification of Φ_Δ . Lengthening of the triplet excited-state lifetime is also observed for the CB[7] complex, and this is likely an effect of slowing radiationless deactivation of the excited state due to restricted motion within the macrocycle. The stabilization of the triplet excited state compensates for a smaller quenching rate constant by oxygen, and this effect adds to the enhancement in $^1\text{O}_2$ generation. Additionally, the increase in intersystem crossing (or triplet quantum yield) is probably the main factor contributing to enhance $^1\text{O}_2$ generation, which has been reported before for CB[7] complexes.⁶⁸ It must be noted that triplet quantum yield estimations assume the molar extinction coefficient for the triplet excited species is the same for free and complexed PS,^{36,68} which might not be the case. Garcia and collaborators proposed that the carbonyl groups at the portals of CB[7] act much as a “carbonylated solvent” promoting higher rates of intersystem crossing.⁶⁸ This effect is probably stronger for PS

that protude slightly out of the cavity of CB[7], which agrees with the results observed here for TBO⁺ and with those reported for acridine orange.⁴⁰

The pronounced decrease in Φ_{Δ} for the CB[8] complex is also puzzling because the triplet excited-state lifetime and quenching rate constant by oxygen in the presence of CB[8] are similar to those for CB[7]. Although a lower triplet yield cannot be discarded, the reason for this intricate behavior is evident in the transient absorption spectra, where a new absorption band at 630 nm appears at long delay times after the laser pulse (Figure S10). This long-lived absorption ($\tau \sim 40 \mu\text{s}$) reveals a decay pathway that is not present for TBO⁺ alone or in the presence of CB[7]. This new species is formed at the expense of the triplet excited state with a rate constant of formation of $1.8 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, which effectively competes with the rate constant for the generation of $^1\text{O}_2$ (Table 1, $k_{\Delta} = 1.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$), thus decreasing the Φ_{Δ} . This new decay process could be attributed to the bimolecular interaction between the two TBO⁺ units included within CB[8].

4. CONCLUSIONS

We have demonstrated a novel strategy to switch *on* and *off* reversibly the generation of $^1\text{O}_2$ by a PS using CB[*n*]s inclusion complexes. The fundamental requirements for this switching behavior were identified, and the key factors contributing to the enhancement or decrease of the $^1\text{O}_2$ generation were shown. The results presented here for TBO⁺ are in principle applicable to other PSs. Considering that all the components used herein are biocompatible, this system is viable for further development in therapeutic applications.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b07736.

ABMA emission spectra, singlet oxygen luminescence, transient absorption spectra, and theoretical calculations (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: dlfuente@uc.cl

ORCID

Diego Cortés-Arriagada: 0000-0002-6709-1723

Denis Fuentealba: 0000-0003-4798-7204

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank CONICYT for the financial support through their FONDECYT research program (Grant No. 1160443). J.R.-D. thanks CONICYT-PCHA/Doctorado Nacional/2015-21150894. D.C.-A. thanks the financial support by the ICM Grant #120082. Powered@NLHPC: This research was partially supported by the supercomputing infrastructure of the NLHPC (ECM-02). The authors deeply thank Carolina Pérez Mora for the creation of the scientific artwork shown herein.

■ REFERENCES

(1) Kearns, D. R. Physical and Chemical Properties of Singlet Molecular Oxygen. *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 395–427.

(2) Schweitzer, C.; Schmidt, R. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1685–1757.

(3) Ogilby, P. R. Singlet Oxygen: There Is Indeed Something New under the Sun. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3181–3209.

(4) Davies, M. J. Singlet Oxygen-Mediated Damage to Proteins and Its Consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305*, 761–770.

(5) Davies, M. J. The Oxidative Environment and Protein Damage. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2005**, *1703*, 93–109.

(6) Ghogare, A. A.; Greer, A. Using Singlet Oxygen to Synthesize Natural Products and Drugs. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 9994–10034.

(7) Bonini, C.; D'Auria, M.; D'Alessio, L.; Mauriello, G.; Tofani, D.; Viggiano, D.; Zimbardi, F. Singlet Oxygen Degradation of Lignin. *J. Photochem. Photobiol., A* **1998**, *113*, 119–124.

(8) Gryglik, D.; Miller, J. S.; Ledakowicz, S. Singlet Molecular Oxygen Application for 2-Chlorophenol Removal. *J. Hazard. Mater.* **2007**, *146*, 502–507.

(9) Escalada, J. P.; Pajares, A.; Gianotti, J.; Biasutti, A.; Criado, S.; Molina, P.; Massad, W.; Amat-Guerri, F.; García, N. A. Photosensitized Degradation in Water of the Phenolic Pesticides Bromoxynil and Dichlorophen in the Presence of Riboflavin, as a Model of Their Natural Photodecomposition in the Environment. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *186*, 466–472.

(10) Kim, H.; Kim, W.; Mackeyev, Y.; Lee, G. S.; Kim, H. J.; Tachikawa, T.; Hong, S.; Lee, S.; Kim, J.; Wilson, L. J.; et al. Selective Oxidative Degradation of Organic Pollutants by Singlet Oxygen-Mediated Photosensitization: Tin Porphyrin Versus C60 Amino-fullerene Systems. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 9606–9613.

(11) Piwowar, K.; Blacha-Grzechnik, A.; Bernas, P.; Zak, J. Phenol Degradation in Heterogeneous System Generating Singlet Oxygen Employing Light Activated Electropolymerized Phenothiazines. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *359*, 426–431.

(12) Zhang, T.; Ding, Y. B.; Tang, H. Q. Generation of Singlet Oxygen over Bi(V)/Bi(III) Composite and Its Use for Oxidative Degradation of Organic Pollutants. *Chem. Eng. J.* **2016**, *284*, 1414–1414.

(13) Dahl, T. A.; Midden, W. R.; Hartman, P. E. Pure Singlet Oxygen Cytotoxicity for Bacteria. *Photochem. Photobiol.* **1987**, *46*, 345–352.

(14) Valduga, G.; Bertoloni, G.; Reddi, E.; Jori, G. Effect of Extracellularly Generated Singlet Oxygen on Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *J. Photochem. Photobiol., B* **1993**, *21*, 81–86.

(15) Maisch, T.; Baier, J.; Franz, B.; Maier, M.; Landthaler, M.; Szeimies, R. M.; Baumler, W. The Role of Singlet Oxygen and Oxygen Concentration in Photodynamic Inactivation of Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 7223–7228.

(16) Ruiz-Gonzalez, R.; White, J. H.; Agut, M.; Nonell, S.; Flors, C. A Genetically-Encoded Photosensitizer Demonstrates Killing of Bacteria by Purely Endogenous Singlet Oxygen. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 1411–1413.

(17) Choudhury, R.; Greer, A. Synergism between Airborne Singlet Oxygen and a Trisubstituted Olefin Sulfonate for the Inactivation of Bacteria. *Langmuir* **2014**, *30*, 3599–3605.

(18) Kasimova, K. R.; Sadasivam, M.; Landi, G.; Sarna, T.; Hamblin, M. R. Potentiation of Photoinactivation of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Mediated by Six Phenothiazinium Dyes by Addition of Azide Ion. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 1541–1548.

(19) Moura, J. C. V. P.; Oliveira Campos, A. M. F.; Griffiths, J. Synthesis and Evaluation of Phenothiazine Singlet Oxygen Sensitising Dyes for Application in Cancer Phototherapy. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1997**, *120*, 459–460.

(20) Wang, X. L.; Zeng, Y.; Zheng, Y. Z.; Chen, J. F.; Tao, X.; Wang, L. X.; Teng, Y. Rose Bengal-Grafted Biodegradable Microcapsules: Singlet-Oxygen Generation and Cancer-Cell Incapacitation. *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 11223–11229.

(21) Bartusik, D.; Aebischer, D.; Ghogare, A.; Ghosh, G.; Abramova, I.; Hasan, T.; Greer, A. A Fiberoptic (Photodynamic Therapy Type) Device with a Photosensitizer and Singlet Oxygen Delivery Probe Tip

for Ovarian Cancer Cell Killing. *Photochem. Photobiol.* **2013**, *89*, 936–941.

(22) Pasparakis, G. Light-Induced Generation of Singlet Oxygen by Naked Gold Nanoparticles and Its Implications to Cancer Cell Phototherapy. *Small* **2013**, *9*, 4130–4134.

(23) Yan, L.; Chang, Y. N.; Yin, W. Y.; Tian, G.; Zhou, L. J.; Liu, X. D.; Xing, G. M.; Zhao, L. N.; Gu, Z. J.; Zhao, Y. L. On-Demand Generation of Singlet Oxygen from a Smart Graphene Complex for the Photodynamic Treatment of Cancer Cells. *Biomater. Sci.* **2014**, *2*, 1412–1418.

(24) Dabrowski, J. M.; Arnaut, L. G. Photodynamic Therapy (PDT) of Cancer: From Local to Systemic Treatment. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 1765–1780.

(25) Ramos, L. C. B.; Marchesi, M. S. P.; Callejon, D.; Baruffi, M. D.; Lunardi, C. N.; Slep, L. D.; Bendhack, L. M.; da Silva, R. S. Enhanced Antitumor Activity against Melanoma Cancer Cells by Nitric Oxide Release and Photosensitized Generation of Singlet Oxygen from Ruthenium Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, *2016*, 3592–3597.

(26) Hamblin, M. R.; Mróz, P. *Advances in Photodynamic Therapy. Basic, Translational, and Clinical*; Artech House: Boston, MA, 2008.

(27) Moser, J. G. *Photodynamic Tumor Therapy: 2nd and 3rd Generation Photosensitizers*; Harwood Academic Publishers: Amsterdam, 1998.

(28) Hamblin, M. R.; Avci, P. *Applications of Nanoscience in Photomedicine*; Elsevier: Cambridge, U.K., 2015.

(29) Lovell, J. F.; Liu, T. W. B.; Chen, J.; Zheng, G. Activatable Photosensitizers for Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2839–2857.

(30) Huang, L.; Yang, W.; Zhao, J. Switching of the Triplet Excited State of Styryl 2,6-Diiodo-Bodipy and Its Application in Acid-Activatable Singlet Oxygen Photosensitizing. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 10240–10255.

(31) Majumdar, P.; Nomula, R.; Zhao, J. Activatable Triplet Photosensitizers: Magic Bullets for Targeted Photodynamic Therapy. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2*, S982.

(32) Wang, X. Q.; Lei, Q.; Zhu, J. Y.; Wang, W. J.; Cheng, Q.; Gao, F.; Sun, Y. X.; Zhang, X. Z. Cucurbit[8]Uril Regulated Activatable Supramolecular Photosensitizer for Targeted Cancer Imaging and Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 22892–22899.

(33) Liu, K.; Liu, Y. L.; Yao, Y. X.; Yuan, H. X.; Wang, S.; Wang, Z. Q.; Zhang, X. Supramolecular Photosensitizers with Enhanced Antibacterial Efficiency. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 8285–8289.

(34) Chen, L. H.; Bai, H. T.; Xu, J. F.; Wang, S.; Zhang, X. Supramolecular Porphyrin Photosensitizers: Controllable Disguise and Photoinduced Activation of Antibacterial Behavior. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 13950–13957.

(35) Montes-Navajas, P.; Corma, A.; García, H. Complexation and Fluorescence of Tricyclic Basic Dyes Encapsulated in Cucurbiturils. *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 713–720.

(36) González-Béjar, M.; Montes-Navajas, P.; García, H.; Scaiano, J. C. Methylene Blue Encapsulation in Cucurbit[7]Uril: Laser Flash Photolysis and near-IR Luminescence Studies of the Interaction with Oxygen. *Langmuir* **2009**, *25*, 10490–10494.

(37) Alarcón, E. I.; González-Béjar, M.; Montes-Navajas, P.; García, H.; Lissi, E. A.; Scaiano, J. C. Unexpected Solvent Isotope Effect on the Triplet Lifetime of Methylene Blue Associated to Cucurbit[7]Uril. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 269–273.

(38) Montes-Navajas, P.; González-Béjar, M.; Scaiano, J. C.; García, H. Cucurbituril Complexes Cross the Cell Membrane. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 1743–1747.

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

(40) Cáceres, J.; Robinson-Duggon, J.; Tapia, A.; Paiva, C.; Gómez, M.; Bohne, C.; Fuentealba, D. Photochemical Behavior of Biosupramolecular Assemblies of Photosensitizers, Cucurbit[n]Urils and Albumins. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 2574–2582.

(41) Kim, J.; Jung, I.-S.; Kim, S.-Y.; Lee, E.; Kang, J.-K.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, K. New Cucurbituril Homologues: Syntheses, Isolation, Characterization, and X-Ray Crystal Structures of Cucurbit[n]Uril ($n = 5, 7$, and 8). *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 540–541.

(42) Day, A. I.; Blanch, R. J.; Coe, A.; Arnold, A. P. The Effects of Alkali Metal Cations on Product Distributions in Cucurbit[n]Uril Synthesis. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **2002**, *43*, 247–250.

(43) Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L. The Cucurbit[n]Uril Family. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844–4870.

(44) Isaacs, L. Cucurbit[n]Urils: From Mechanism to Structure and Function. *Chem. Commun.* **2009**, 619–629.

(45) Lei, W.; Jiang, G.; Zhou, Q.; Zhang, B.; Wang, X. Greatly Enhanced Binding of a Cationic Porphyrin Towards Bovine Serum Albumin by Cucurbit[8]Uril. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13255–13260.

(46) Ben Fradj, A.; Iafi, R.; Gzara, L.; Hamzaoui, A. H.; Hafiane, A. Spectrophotometric Study of the Interaction of Toluidine Blue with Poly (Ammonium Acrylate). *J. Mol. Liq.* **2014**, *194*, 110–114.

(47) Yi, S.; Kaifer, A. E. Determination of the Purity of Cucurbit[n]Uril ($n = 7, 8$) Host Samples. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 10275–10278.

(48) Redmond, R. W.; Gamlin, J. N. A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 391–475.

(49) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry 0.3. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.

(50) Neese, F. The Orca Program System. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 73–78.

(51) Weigend, F.; Ahlrichs, R. Balanced Basis Sets of Split Valence, Triple Zeta Valence and Quadruple Zeta Valence Quality for H to Rn: Design and Assessment of Accuracy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3297–3305.

(52) Biedermann, F.; Uzunova, V. D.; Scherman, O. A.; Nau, W. M.; De Simone, A. Release of High-Energy Water as an Essential Driving Force for the High-Affinity Binding of Cucurbit[n]Urils. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15318–15323.

(53) Sundararajan, M.; Sinha, V.; Bandyopadhyay, T.; Ghosh, S. K. Can Functionalized Cucurbituril Bind Actinyl Cations Efficiently? A Density Functional Theory Based Investigation. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 4388–4395.

(54) Peerannawar, S. R.; Gejji, S. P. Structure and Spectral Characteristics of Diquat-Cucurbituril Complexes from Density Functional Theory. *J. Mol. Model.* **2013**, *19*, S113–S127.

(55) Lu, L. L.; Zhu, S. F.; Zhang, H. J.; Li, F. L.; Zhang, S. W. Theoretical Study of Complexation of Resveratrol with Cyclodextrins and Cucurbiturils: Structure and Antioxidative Activity. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 14114–14122.

(56) Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, H. A Consistent and Accurate Ab Initio Parametrization of Density Functional Dispersion Correction (DFT-D) for the 94 Elements H–Pu. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104.

(57) Kruse, H.; Grimme, S. A Geometrical Correction for the Inter- and Intra-Molecular Basis Set Superposition Error in Hartree-Fock and Density Functional Theory Calculations for Large Systems. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 154101.

(58) Klamt, A. The Cosmo and Cosmo-Rs Solvation Models. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2011**, *1*, 699–709.

(59) Lu, T.; Chen, F. W. Multiwfn: A Multifunctional Wavefunction Analyzer. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, S80–S92.

(60) De la Fuente, J. R.; Canete, A.; Jullian, C.; Saitz, C.; Aliaga, C. Unexpected Imidazoquinoxalinone Annulation Products in the Photoinitiated Reaction of Substituted-3-Methyl-Quinoxalin-2-Ones with N-Phenylglycine. *Photochem. Photobiol.* **2013**, *89*, 1335–1345.

(61) De la Fuente, J. R.; Canete, A.; Carathanassis, N.; Bernazar, L.; Saitz, C.; Diaz-Hernandez, D. Spectral and Kinetic Study of 3-Methylquinoxalin-2-Ones Photoreduced by Amino Acids: N-Phenylglycine Radical Chain Reactions and N-Acetyltryptophan Decarboxylation. *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120*, 2797–2807.

- (62) Tang, H.; Fuentealba, D.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; Kim, K.; Bohne, C. Guest Binding Dynamics with Cucurbit[7]uril in the Presence of Cations. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20623–20633.
- (63) Kuznetsova, N. A.; Gretsova, N. S.; Yuzhakova, O. A.; Negrinovskii, V. M.; Kaliya, O. L.; Luk'yanets, E. A. New Reagents for Determination of the Quantum Efficiency of Singlet Oxygen Generation in Aqueous Media. *Russ. J. Gen. Chem.* **2001**, *71*, 36–41.
- (64) Vazquez, J.; Remon, P.; Dsouza, R. N.; Lazar, A. I.; Arteaga, J. F.; Nau, W. M.; Pischel, U. A Simple Assay for Quality Binders to Cucurbiturils. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 9897–9901.
- (65) Basilio, N.; Pischel, U. Drug Delivery by Controlling a Supramolecular Host-Guest Assembly with a Reversible Photoswitch. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 15208–15211.
- (66) Liu, S. M.; Ruspic, C.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Zavalij, P. Y.; Isaacs, L. The Cucurbit[N]Urils Family: Prime Components for Self-Sorting Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15959–15967.
- (67) Pottier, R.; Bonneau, R.; Jousset-Dubien, J. pH Dependence of Singlet Oxygen Production in Aqueous Solutions Using Toluidine Blue as a Photosensitizer. *Photochem. Photobiol.* **1975**, *22*, 59–61.
- (68) Montes-Navajas, P.; García, H. Cucurbituril Complexation Enhances Intersystem Crossing and Triplet Lifetime of 2,4,6-Triphenylpyrylium Ion. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 2034–2038.

Potential Applications of Cucurbit[*n*]urils Inclusion Complexes in Photodynamic Therapy

José Robinson-Duggon,^[a] Francisco Pérez-Mora,^[a] Luciano Dibona-Villanueva,^[a] and Denis Fuentealba^{*,[a]}

Abstract: Cucurbit[*n*]urils (CB[*n*]) have emerged as potential candidates for drug delivery in several areas due to their strong binding interactions and low toxicity. More recently, their benefits for a type of cancer treatment termed Photodynamic Therapy (PDT) have been recognized. The out-

comes of this therapy rely on better drug delivery strategies and improving overall photoactivity of the drugs, which is where CB[*n*]s could have a strong impact. The effects of these molecular containers on photoactivity are discussed and new interesting work is highlighted.

Keywords: Photodynamic therapy · cucurbit[*n*]uril · photosensitizer · inclusion complex · singlet oxygen

1. Introduction

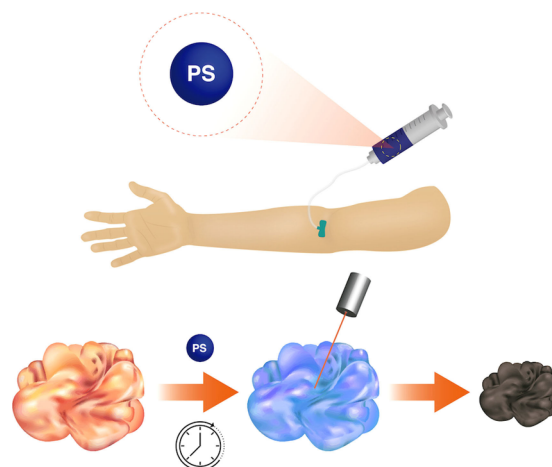
1.1. The Importance of PDT in the Fight Against Cancer

One promising treatment for several types of cancer is photodynamic therapy (PDT). PDT can be understood as the injection or application of an inactive drug (a photosensitizer, PS) to a particular area of the body that presents lesions; the subsequent irradiation with visible light in the presence of oxygen induces cytotoxicity and tissue damage due to the generation of singlet oxygen and other reactive oxygen species (ROS) (Scheme 1).^[1]

The combined effect of visible light and photosensitizers to kill cells was described more than a century ago,^[1] and slowly found its way into modern medicine, although not yet a mainstream treatment. Despite being a clinically approved and non-invasive treatment for many early-stage cancer types (skin, brain, pancreas),^[2] PDT is currently underutilized as a cancer therapy.^[3] The main advantage of PDT over other kinds of therapies is undoubtedly the fact that PDT does not induce resistance like many drugs, and also a single-shot treatment can be administered compared to radiotherapy or chemotherapy. The main problem adopting PDT as a standard medical treatment has to do with the need to develop specialized centers that can carry out high quality randomized trials.^[4]

1.2. Principles of Photodynamic Therapy

Photosensitizers work by absorbing light of a particular wavelength generating a singlet excited state. Afterwards, this state converts into a long-lived triplet excited state by intersystem crossing and it is from this state where chemical reactions usually take place. In the presence of oxygen, an energy-transfer process leads to the generation of singlet oxygen (type II photosensitization mechanism), which is an excited state of molecular oxygen that reacts with biomole-

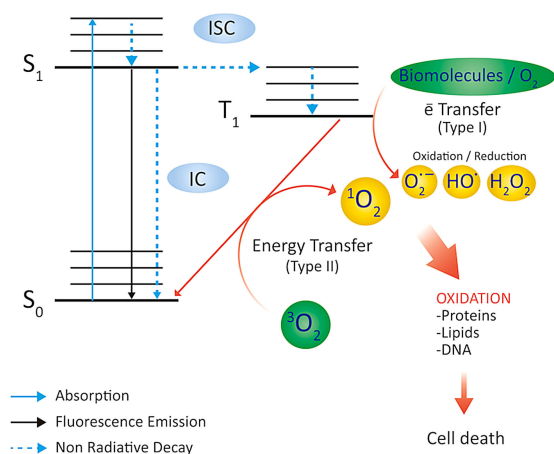


Scheme 1. Cartoon of the PDT treatment of cancer. Injection of the photosensitizer (PS) is followed by accumulation in the tumor and laser irradiation, leading finally to cell death.

cules within the cell producing oxidative stress. Alternatively, the photosensitizer can react directly with biomolecules by an electron-transfer process (type I photosensitization mechanism) leading to radical formation (Scheme 2).^[1]

An ideal PDT drug should produce singlet oxygen and/or other reactive oxygen species; have high absorption coefficients at long wavelengths for a deeper tissue penetration of the light; possess a high intersystem crossing quantum yield;

[a] J. Robinson-Duggon, F. Pérez-Mora, L. Dibona-Villanueva, D. Fuentealba
Laboratorio de Estructuras Biosupramoleculares, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile
Vicuña Mackenna 4860, Macul, Santiago
phone: +56-2-23544383
E-mail: dlffuente@uc.cl
Homepage: biosupramolecular.uc.cl



Scheme 2. Jablonski diagram showing absorption, emission, inter-system crossing and photosensitized reactions (type I and type II).

be amphiphilic for better membrane-crossing ability; show no dark toxicity; have specific tumor accumulation; and be synthetically available.^[1] Additionally, it is desirable that the drugs show fluorescence emission to assess PDT dosimetry, location and pharmacokinetics.^[1] Although there are a number of molecules currently used for PDT, they do not show specific tumoral tissue-targeting abilities, so this area is still a great research focus. One particular problem of PDT is that the

drugs should have rapid clearance to avoid photosensitization by sunlight after the treatment is completed; however, this property goes against the long-circulation times that are needed to achieve high tumor accumulation. Therefore, strategies to “switch on” the photoactive drugs are highly desirable.^[5]

1.3. Generation of Reactive Oxygen Species (ROS) and cell death

The effect of PDT on cells is mainly attributed to singlet oxygen. However, due to the short lifetime of this species in water ($\sim 4 \mu\text{s}$), its action is limited to the surrounding of the photosensitizer.^[1,6] Secondary ROS such as peroxides are less reactive and therefore have greater diffusion coefficients, carrying the damage towards other parts of the cell and increasing oxidative stress.^[1,7]

When it comes to the location of the drug within the cell, the most effective PDT is achieved when the mitochondria is damaged, since it generates enhanced ROS and induces the release of signaling proteins that lead to apoptosis.^[1] For this purpose cationic lipophilic photosensitizers have been shown to selectively target this organelle.^[8] PDT avoids producing DNA damage and therefore drugs are not usually targeted to the nucleus. This is partially to differentiate the mechanism of



José Robinson-Duggon received his degree in Chemistry from Universidad de Panamá in 2007, graduated first in his class. He later moved to United States to pursue his M. S. in Chemistry, in the area of Biological Chemistry as a Fulbright Scholar from 2009 to 2011 under the advisement of professor Harry A. Frank at the University of Connecticut. He joined the Ph.D. program at the Pontificia Universidad Católica de Chile at the research group of professor Denis Fuentelba in 2015 and he is currently a Ph.D. candidate. His research focuses on supramolecular chemistry, specifically on the ternary interactions of CB[n]s with photosensitizers and proteins. He is interested in developing applications for PDT.



Francisco Pérez-Mora is an undergraduate student at the Pharmacy program of the Pontificia Universidad Católica de Chile. He is currently finishing his thesis under the direction of professor Denis Fuentelba, where he worked on the synthesis of photosensitizer derivatives, their interaction with CB[n]s and the evaluation of *in vitro* phototoxicity. He is interested in pursuing doctoral studies in Supramolecular Chemistry.



Luciano Dibona-Villanueva received his degree in Chemistry in 2016 from Universidad de Tarapacá, Arica, Chile. He ranked first among his class generation. He joined the Ph.D. in Chemistry at the Pontificia Universidad Católica de Chile in 2017 at the research group of professor Denis Fuentelba. His current interests are on the synthesis of CB[n]s derivatives and drug-protein conjugation as drug delivery systems.



Denis Fuentelba received his degree in Chemistry in 2004 from Universidad de Tarapacá, Arica, Chile. Later he received his Ph.D. in Biological Chemistry from Pontificia Universidad Católica de Chile in 2009, where he worked with professor Eduardo Silva on the mechanism of photosensitized reactions of advanced glycation endproducts. He later conducted postdoctoral work with professor Cornelia Bohne at the University of Victoria, BC, Canada in Supramolecular Dynamics. Since 2012, he is appointed as an Assistant Professor at Pontificia Universidad Católica de Chile and his research interests include the use of supramolecular systems for photoactive drug delivery and supramolecular photochemistry applied to PDT. He received the Giuseppe Cilento Award from the Inter-American Photochemical Society in 2015 for his work in the field of Photochemistry.

PDT from other therapies such as antineoplastic drugs or ionizing radiation, which allows complementing them.^[1]

Another issue with PDT drugs is the fact that photosensitizers are not targeted for cancer cells. Unfavorable biodistribution of the drugs and lack of accumulation in tumor tissue can make them poorly effective, with high doses being needed for the treatment.^[9] To overcome this problem, several photosensitizer conjugates have been reported in the literature that target specifically cancer cells.^[1,5,9–10]

One type of conjugate involves the small molecule folic acid, which is essential for cell metabolism. The cells take up folic acid by receptor-mediated endocytosis, and this receptor is overexpressed in cancer cells and particularly in advanced cancer stages.^[9] Therefore, folic acid conjugates have been shown to enhance drug action.^[11] Another strategy involves photosensitizer-antibody conjugates that target specific antigens in cancer cells.^[12] This strategy shows high specificity; however, the potential damage on the outside part of the cell, where the antibody attaches, is generally less efficient than that for internalized photosensitizers. There are other common issues with this approach, for example decreased antigen-antibody affinity due to modification of the protein structure, and decreased photoactivity for the protein-bound photosensitizer.^[9,12a]

The quest for the “perfect” photosensitizer is far from over and many efforts will be made to discover new PDT drugs. However, one can argue that a faster approach would be to look for a versatile way to improve the action of the drugs that already exist and have been well characterized. It is here where advances in drug delivery systems could help solve the current problems with PDT and other therapies, while at the same time taking care of the need for more personalized medicines.

2. Drug Delivery systems to Improve Drug Action

Conventional drugs suffer from a series of issues that are detrimental for their action such as susceptibility to enzymatic decomposition, poor permeability and overall difficulties at reaching the target within the diseased tissue. Consequently, high drug doses are administered to ensure that at least some of the drug will reach the desired target. The problem is even more serious with more advanced drugs based on peptides and antibodies, which cannot withstand blood circulation.^[13] Since the efficiency of the therapy is strongly dependent on the drug reaching its target, effective delivery vehicles are more in need every day. In addition, delivery systems have the potential to meet the specific needs of several diseases.

Many vehicles have been used to deliver payloads of drugs such as nanoparticles, quantum dots, proteins, macrocycles, polymers and liposomes, among others.^[9] Generally, the carrier systems aim to enhance bioavailability, solubility and tumor targeting specificity of the drug.^[14] The use of those carrier systems for photosensitizers has been previously reviewed.^[14–15] Particular examples of successful carries in this

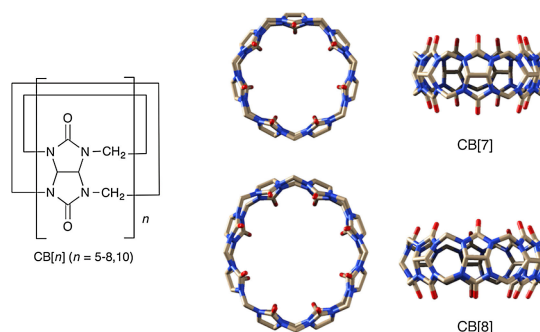
field are photosensitizer-protein chemical conjugates,^[16] and photosensitizer-liposome systems.^[17]

All these systems have “pros and cons”, for example, liposome and protein formulations are highly biocompatible and are approved for a variety of uses in medicine, but their stability and the control of the release are still an issue.^[10] Nanoparticles can carry high amounts of drugs compared to other systems, but there is serious concern about their potential toxicity and difficulties in delivering the nanoparticles to the cell.^[9–10,18] Macrocycles are biocompatible, have great thermal and chemical stability and are available in different sizes, which makes them potent candidates for drug delivery applications.^[18]

Photosensitizers are generally not selective in their accumulation on tumoral tissues. Therefore, the development of delivery vehicles that can carry them more efficiently into tumors is a key area of research for this field.^[15]

2.1. Cucurbit[n]urils as Drug Delivery Vehicles

Macrocycles correspond to a category of macromolecules that are formed by the cyclic union of several monomers, forming a cavity. Their structure is generally rigid compared to flexible aggregates such as micelles. Among the more important families of macrocycles, we can find cyclodextrins, calixarenes and more recently cucurbit[n]urils (CB[n]s).^[18] Cyclodextrins have a natural origin and for that reason they are components of several pharmaceutical formulations.^[19] On the other hand, CB[n]s (Scheme 3) are synthetic macrocycles, which possess remarkably strong binding properties for cationic guests due to their strong negative electrostatic potential at the rims and the release of high-energy water molecules from inside the cavity when the guest binds.^[18,20] The readers are encouraged to explore several reviews about the synthesis and properties of CB[n]s.^[20–21]

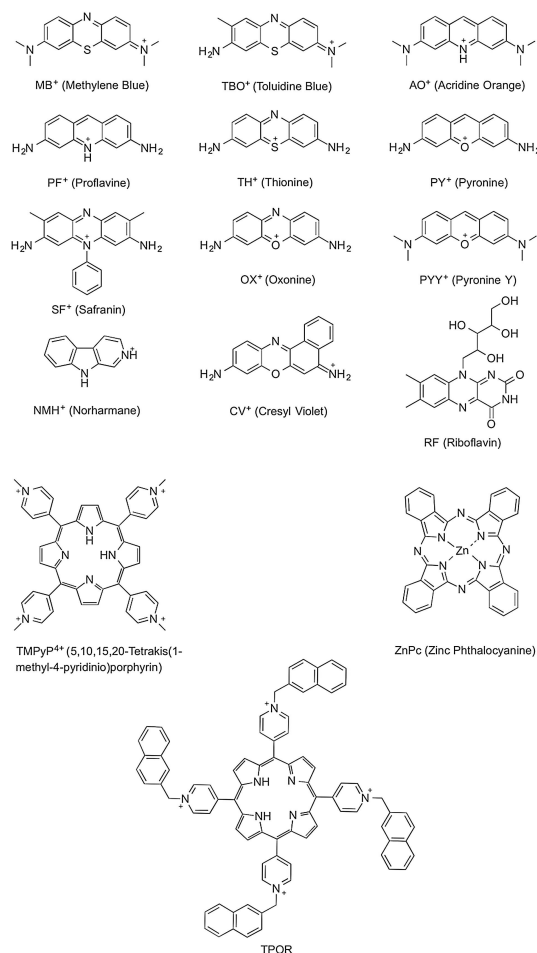


Scheme 3. Cucurbit[n]uril (CB[n], $n = 5–8, 10$) structures. Top and side views for CB[7] and CB[8] are shown in the scheme. The dimensions of the CB[n]s are: (a) outer width 13.1–20.0 Å, (b) cavity width 4.4–11.7 Å, (c) portal width 2.4–10.0 Å, and (d) height 9.1 Å. New twisted CB[n]s ($n = 13, 15$) have been reported recently.^[22]

CB[n]s are emerging as very promising candidates for drug delivery due to their host-guest properties. Firstly, CB[n]s form complexes with a great variety of drugs such as oxaliplatin, alkaloids, insulin and ranitidine, to name a few.^[23] CB[n]s have shown very low toxicities in several cell lines,^[24] which is very promising for biological applications. Regarding their solubility, odd numbered CB[n]s ($n=5, 7$) are more soluble in water than their even numbered counterparts ($n=6, 8, 10$). In this sense, CB[n]s can increase the solubility of some drugs, e.g. benzimidazols, while other guests such as platinum complexes actually help to solubilize CB[8].^[25] Although some CB[n]s are poorly soluble in water, CB[6] can be solubilized readily in different body fluids specially blood plasma and nasal fluid,^[25] which holds potential for drug delivery purposes. Due to the formation of inclusion complexes, CB[n]s can also help to induce disaggregation, which is a common problem causing drugs to loose their efficacy.^[23,25] Another property that is noteworthy is their high thermal stability, which can help to stabilize drug complexes. Solid-state stabilization has been reported for drugs such as pyrazinamide and albendazole.^[18] Additionally, CB[n]s have been shown to protect several benzimidazole drugs from photo-oxidation.^[23] Even more, CB[n]s have been shown to complex several photosensitizers, improving their photostability and their cellular uptake.^[26] The main advantage of using CB[n]s for drug delivery is the fact that the drug can be released “on demand” by taking advantage of their host-guest chemistry. Drug release from CB[n]s can be easily controlled by changing the pH of the media (protonation state), by the addition of salts (competition) or by the binding of a competitor molecule. For example, L. Isaacs and co-workers showed that a drug cargo could be released from CB[7] by competitive binding of a guest molecule.^[27] As other macrocycles, CB[n]s are not directed to a particular type of cell, but they can be derivatized to make them highly specific for cancer cells.^[18,28] Derivatization of CB[n]s is cumbersome, with only a few reports of modified CB[n]s in the literature.^[20] The first *in vivo* studies of the pharmacokinetics of radio-labeled CB[7] and CB[8] were reported by the groups of A. I. Day and F. R. Keene, showing that CB[7] is rapidly excreted unmodified from the serum with high accumulation in the kidneys.^[29]

2.2. Encapsulation of Photosensitizers by Cucurbit[n]urils

Several photosensitizers have been reported to bind to CB[n]s and their structures are shown on Scheme 4. Especially important are photosensitizers derived from phenothiazine dyes, which are commonly used for PDT.^[1,30] H. García and collaborators reported the binding of several phenothiazine and acridine related dyes to CB[7] and CB[8].^[31] The binding constants for this kind of molecules to CB[7] are in the order of 10^6 – 10^7 M⁻¹, which are amenable for therapeutic application of photosensitizers (Table 1).



Scheme 4. Structures for photosensitizers (PS) reported to form complexes with CB[n]s. Note that the positive charges on the molecules have been made explicit on the abbreviations.

Another well-known photosensitizer that has been reported to bind to CB[7] is riboflavin (RF), which possesses a binding constant of $(6.70 \pm 0.05) \times 10^3$ M⁻¹.^[35] RF has been shown to be involved in several photochemical processes in biological systems.^[37] It is interesting to note that RF is not included within the cavity of CB[7], but rather an exclusion complex is formed with its different tautomeric forms.^[35]

The photoactive molecule norharmane (NMH, β -carboline), which has been shown to produce singlet oxygen^[38] and induce DNA damage,^[39] has also been reported to form an inclusion complex with CB[7] with a binding constant of $(9.0 \pm 0.5) \times 10^4$ M⁻¹.^[36]

An interesting case is the report of the binding of tetra(1-methyl)pyridinium porphyrins as a free base or bound to Zn²⁺, Fe³⁺ and Mn³⁺ to CB[10] in conjunction with auxiliary pyridinium guests with binding constants for the ternary complexes in the range of 10^4 – 10^5 M⁻¹.^[40] Porphyrins are the most used type of molecules in PDT, and due to their size, binding studies are still scarce in the literature.

Table 1. Binding constants (K) for photosensitizers complexes with CB[7] and CB[8].

Molecule	$K_{\text{CB}[7]}/\text{M}^{-1}$	$K_{\text{CB}[8]}/\text{M}^{-2}$
AO ⁺	$(3.07 \pm 0.48) \times 10^6$ [a] $(3 \pm 1) \times 10^6$ [b]	$(2.27 \pm 0.73) \times 10^{16}$ [a] $(4 \pm 1) \times 10^{14}$ [b] $(4 \pm 1) \times 10^{14}$ [b]
MB ⁺	$(1.26 \pm 0.28) \times 10^7$ [a]	$(1.06 \pm 0.53) \times 10^{16}$ [a]
PF ⁺	$(1.70 \pm 0.25) \times 10^7$ [a]	$(2.12 \pm 0.59) \times 10^{15}$ [a]
PY ⁺	$(1.47 \pm 0.48) \times 10^7$ [a]	$(3.24 \pm 0.61) \times 10^{13}$ [a]
PYY ⁺	$(4.56 \pm 0.10) \times 10^6$ [a]	$(3.00 \pm 0.50) \times 10^{23}$ [a,c]
OX ⁺	$(1.21 \pm 0.16) \times 10^7$ [a]	$(7.32 \pm 1.63) \times 10^{14}$ [a]
TH ⁺	$(1.35 \pm 0.10) \times 10^7$ [a]	$(2.50 \pm 1.20) \times 10^{16}$ [a]
TMPyP ⁴⁺	8.2×10^4 [d]	—
TPOR	6.6×10^7 [e]	—
RF	$(6.70 \pm 0.05) \times 10^{3[\text{f}]}$	—
NHM ⁺	$(9.0 \pm 0.5) \times 10^4$ [g]	—

[a] From ref.^[31a] in water pH 5.5. [b] From ref.^[32] in 10 mM phosphate buffer pH 7.0. [c] Binding constant based on a 3:1 stoichiometry. [d] From ref.^[33] in water. [e] From ref.^[34] in acetate buffer pH 4.75. [f] From ref.^[35] in 10 mM phosphate buffer pH 7.0. [g] From ref.^[36] in 100 mM phosphate or acetate buffer pH 5.0. Note that interaction for other molecules in Scheme 4 have been observed, but no binding constants were reported. The K value unit for CB[8] complexes (M^{-2}) indicates a 1:2 host:guest complex stoichiometry.

3. Effects of Cucurbit[n]urils on Photochemical Properties

3.1. Triplet Excited States Lifetimes

One of the desirable traits that a good photosensitizer must have in order to be adequate for PDT purposes is a good intersystem crossing (ISC) quantum yield, because the triplet excited state is long-lived and allows for chemical reactions to take place. This makes more favorable the energy transfer to molecular oxygen in order to generate singlet oxygen as a reactive oxygen specie to kill abnormal cells.^[1,10] H. García in collaboration with J. C. Scaiano's group reported that encapsulating MB⁺ within CB[7] increased the triplet excited state lifetime of the free dye from 79.5 μs to 140 μs for the inclusion complex (Figure 1).^[41]

Our group observed the same effect for Acridine Orange (AO⁺) upon complexation with CB[7] with respect to the free dye.^[42] The triplet excited state lifetime for the free AO⁺ is $160 \pm 10 \mu\text{s}$, which increased to $210 \pm 15 \mu\text{s}$ upon complexation (data measured in nitrogen). Both of these dyes form complexes with CB[7] with high binding affinity (see Table 1) and both of these complexes bind CB[7] with a stoichiometry of 1:1.^[31–32] It has been postulated that the reason for the increase in the triplet excited state lifetime with respect to the corresponding free dye is due to a restricted mobility upon complexation which decreases the radiationless deactivation of the excited states.^[41–43] On the other hand, the complexes with CB[8] for these dyes have a stoichiometry of 2:1 with binding constants in the order of 10^{14} – 10^{16} M^{-2} ,^[31a,32] but their triplet

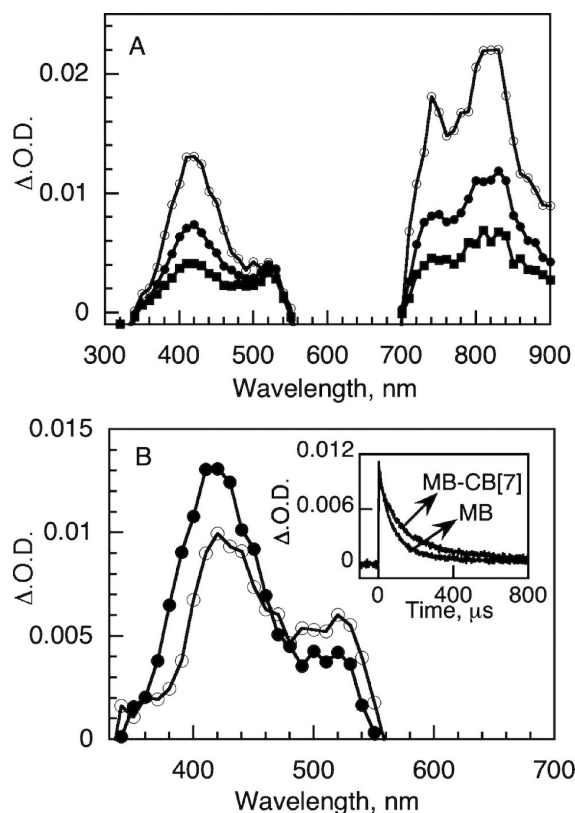


Figure 1. Transient absorption spectra of a deaerated aqueous MB solution (λ_{ex} 308 nm) (A) measured at 0.5 μs (○), 48 μs (●) and 101 μs (■) after the laser pulse; (B) in the absence (●) or in the presence (○) of CB[7] measured at 0.5 μs after the laser pulse (λ_{ex} 308 nm, $E=10 \text{ mJ}$). The inset shows time profiles measured at 420 nm on the microsecond time scale for both of them (MB and MB-CB[7]). Reprinted with permission from reference.^[41] Copyright © 2009, American Chemical Society.

excited state lifetimes have not been reported. X. Wang and collaborators reported that 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinio) porphyrin tetra(p-toluenesulfonate) (TMPyP⁴⁺), another photosensitizer with potential for PDT, binds to CB[7] as well as CB[8]. The triplet excited state lifetime was measured for the free and complexed porphyrin. The same phenomena as described above for MB⁺ and AO⁺ was observed for the triplet excited state lifetime of TMPyP⁴⁺. In the absence of CB[8] the triplet excited state lifetime is 12.1 μs and in the presence of CB[8] a noticeable increase in the triplet excited state lifetime of 117.6 μs is seen.^[43]

Although not a photosensitizer, a fundamental study in the field was reported by H. García and collaborators for the complexation of 2,4,6-triphenylpyrylium (TP⁺) with CB[7] and CB[8], with binding constants of $7.54 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ and $1.45 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, with a stoichiometry of 1:1 for both complexes.^[44] They conducted laser flash photolysis experiments to shine some light into the intersystem crossing quantum yield and the triplet excited state lifetime of free TP⁺ and encapsulated within both macrocycles. They observed that the

triplet excited state lifetime of TP^+ in the presence of $CB[n]$ s increased by a factor of 5 and by a factor of 50 upon inclusion in $CB[7]$ and $CB[8]$, respectively.^[44a] They attributed this increased in the triplet excited state lifetime to the restricted mobility of TP^+ within the macrocycles since the predominant relaxation pathways is dependent of the rotation of the 2,6-phenyl rings around the pyrylium core. They noticed from single-crystal XRD crystal structures that once encapsulated within $CB[n]$ s this impedes the rotation of the phenyl rings which are located outside the macrocycle due to unfavorable repulsive interactions between the hydrogen located in the ortho position of the phenyl rings and oxygen atoms of the portals of the $CB[n]$ s. The limited rotation of this phenyl rings around the pyrylium core was accountable for the increased in the triplet excited state lifetime of TP^+ .^[44a] Another important observation was the variation in the intersystem crossing (ISC) quantum yield upon inclusion in $CB[7]$ and $CB[8]$. In the absence of $CB[n]$ s the ISC quantum yield was reported to be 0.11, but in the presence of $CB[n]$ s the values obtained were 0.46 and 0.94 for $CB[7]$ and $CB[8]$ inclusion complexes, respectively. It is noteworthy that internal conversion (IC, a type of radiationless decay) quantum yield decreased noticeably from 0.33 in the absence of $CB[n]$ s to 0.08 inside $CB[7]$ and 0.01 inside $CB[8]$. As for the fluorescence, the values were also modified by encapsulation having the highest fluorescence quantum yield for the free TP^+ , 0.56, to a slight drop of 0.46 for the $TP^+@CB[7]$ and a very pronounced drop of the fluorescence quantum yield in the $TP^+@CB[8]$ of 0.05.^[44a]

All these data support the fact that $CB[n]$ s encapsulation of photosensitizers lengthens their triplet excited state lifetime due to the restriction in mobility within the macrocycle with respect to the free dye, thus decreasing the radiationless deactivation processes.

3.2. Singlet Oxygen Quantum Yields

The generation of reactive oxygen species, predominantly singlet oxygen, is the ultimate goal in order for the PDT to be effective in killing cancer cells.^[1,6b,45] It has been suggested that the structure of the inclusion complex is determinant for singlet oxygen generation.^[41–42] For the encapsulation of MB^+ into $CB[7]$ ($MB^+@CB[7]$), the photosensitizer is buried inside the cavity, therefore the access to molecular oxygen is restricted and the singlet oxygen quantum yield decreases from 0.52 for the free dye (MB^+) to 0.44 for $MB^+@CB[7]$. The authors of this study proposed that the rate determining step for singlet oxygen generation should be the entry of oxygen into the cavity of $CB[7]$ which contains the excited MB^+ (Figure 2).^[41] It must be mentioned that singlet oxygen was detected directly by its near-infrared (NIR) luminescence emission, which is unequivocal sign that this species is being generated in the media. In other cases, especially in complex biological matrices such as cells, singlet oxygen is detected with the aid of chemical probes.^[46]

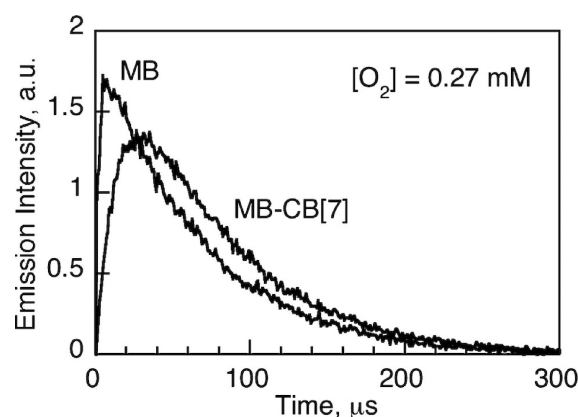


Figure 2. Luminescence decay traces observed at 1270 nm after excitation of an air-saturated solution of MB in the absence or presence of $CB[7]$ in D_2O following 308 nm laser excitation; note the delay caused by $CB[7]$ addition. Reprinted with permission from reference.^[41] Copyright © 2009, American Chemical Society.

It was reported that in the structure of the inclusion complex of $AO^+@CB[7]$, the photosensitizer protrudes out of the macrocycle (Figure 3),^[47] which is a different structure for this complex in comparison with $MB^+@CB[7]$. The differ-

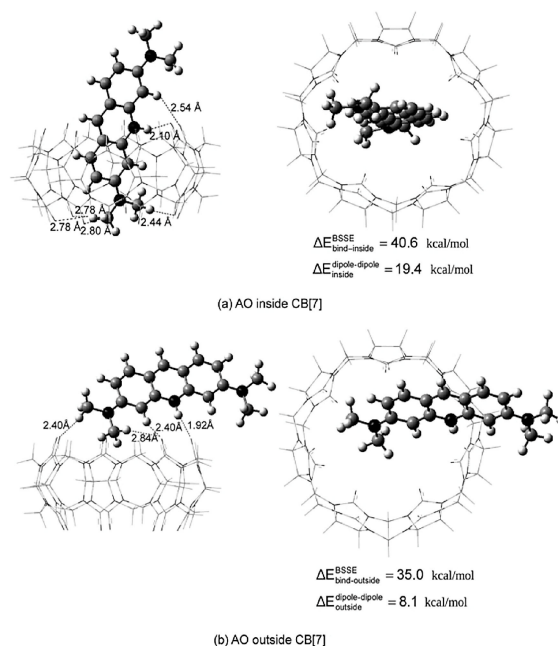


Figure 3. Side and overhead views of AO^+ (a) inside and (b) outside the $CB[7]$ cavity, calculated by the B3LYP/6-31G(d) method. The interaction energies of AO^+ inside and outside the cavity of $CB[7]$ with basis set superposition error (BSSE) and their dipole-dipole interaction energies are also shown. Reprinted with permission from reference.^[47] Copyright © 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

ences in the structure of the inclusion complexes should therefore grant them different photochemical properties.

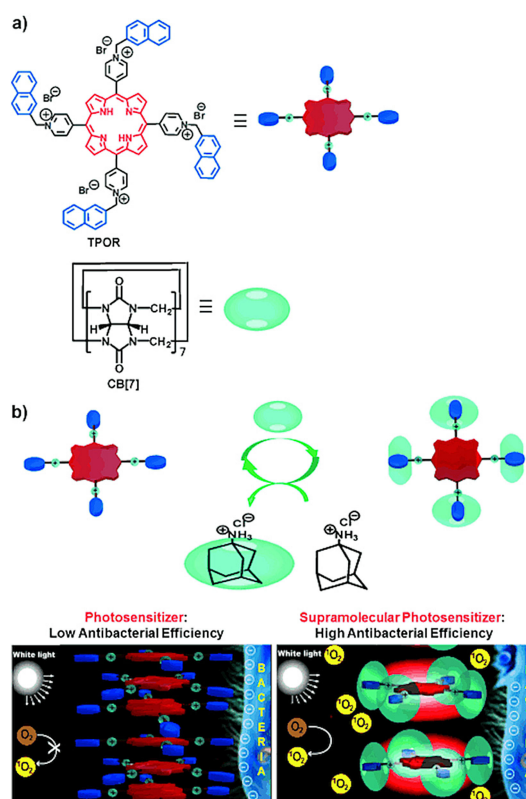
Recently our group reported the photochemical behavior of AO^+ inclusion complex with CB[7] and CB[8] and compared it to data reported for MB^+ and TMPyP^{4+} in order to assess the effect that the differences in the structure of these inclusion complexes has in the singlet oxygen quantum yield.^[42] In the case of $\text{MB}^+ @ \text{CB}[7]$ as mentioned above, it decreases once the complex is formed. We evaluated the inclusion complex with CB[8] denoted as $(\text{MB}^+)_2 @ \text{CB}[8]$ and we observed that the singlet oxygen quantum yield decreases to 0.02 (upper limit), which was attributed to self-quenching of the excited state.^[42]

The singlet oxygen quantum yield for TMPyP^{4+} free in aqueous solution was reported to be 0.74.^[48] The macrocycle CB[8] encapsulates only the arms of the porphyrin TMPyP^{4+} within its hydrophobic cavity, and that is enough to increase its singlet oxygen quantum yield to 0.90 (lower limit determined in the presence of protein).^[43]

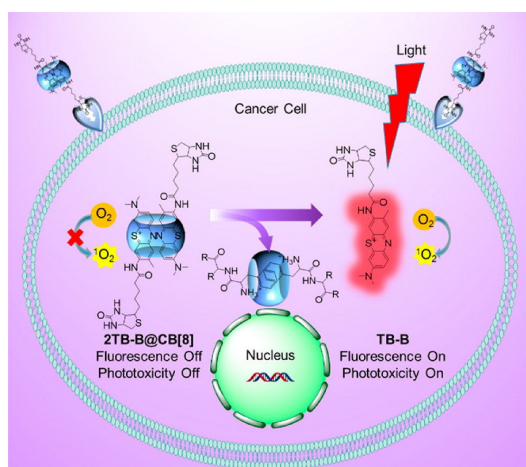
On the other hand, AO^+ has a singlet oxygen quantum yield of 0.18, and upon complexation this value increases for both CB[*n*]s. The increase in the singlet oxygen quantum yield for the $\text{AO}^+ @ \text{CB}[7]$ to 0.50 is believed to be attributed to the photosensitizer protruding out of the cavity (Figure 3), meanwhile the value for the complex $(\text{AO}^+)_2 @ \text{CB}[8]$ also increases to 0.31 due to a greater intersystem crossing yields for AO^+ dimer in comparison with the monomer.^[49]

In 2013, X. Zhang and collaborators reported the construction of a supramolecular complex with enhanced antibacterial efficiency by using a porphyrin derivative with four positively charged arms, designated as TPOR. This cationic porphyrin forms a 1:4 complex with CB[7] ($\text{TPOR} @ (\text{CB}[7])_4$), with a binding affinity of $6.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ for each CB[7]. The formation of the complex induces the disaggregation of the photosensitizer, notably enhancing the singlet oxygen generation (Scheme 5). Although the singlet oxygen generation rate was 7.5 times faster for the complex $\text{TPOR} @ (\text{CB}[7])_4$ than the modified porphyrin TPOR,^[34] this is mainly an effect of porphyrin aggregation which quenches the excited state, which is different to the cases discussed above where encapsulation modified the excited state deactivation processes. In a later report by the same group, TPOR was used in combination with CB[8], which has the ability to incorporate two arms of different TPOR units, forming an hyperbranched supramolecular polymer that disrupts the porphyrin aggregation and enhances singlet oxygen generation.^[50]

Recently, X. Z. Zhang, Y. X. Sun and colleagues reported a novel application of the encapsulation of photosensitizers within CB[*n*]s.^[51] They prepared a Toluidine Blue O (TBO^+) derivative with biotin ($\text{TBO}^+ \text{-B}$) to target cancer cells and turn off the phototoxicity by the encapsulation of two molecules within CB[8] (Scheme 6). They reported that free $\text{TBO}^+ \text{-B}$ can generate singlet oxygen. Once the derivative was encapsulated within CB[8] with a stoichiometry of 2:1 to generate the inclusion complex $(\text{TBO}^+ \text{-B})_2 @ \text{CB}[8]$ the generation of singlet oxygen was turned off. The binding affinity for the



Scheme 5. a) Chemical structures of the TPOR (photosensitizers) and CB[7]. b) The construction of $\text{TPOR}/(\text{CB}[7])_4$ supramolecular photosensitizers and the mechanism for the enhanced antibacterial efficiency of $\text{TPOR}/(\text{CB}[7])_4$ compared with that of TPOR. Reprinted with permission from reference.^[34] Copyright © 2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.



Scheme 6. CB[8]-regulated supramolecular aPS and its mechanism for targeted cancer imaging and photodynamic therapy. Reprinted with permission from reference.^[51] Copyright © 2016, American Chemical Society.

complex was reported to be $2.67 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, although this value probably represents the binding of one $\text{TBO}^+\text{-B}$ molecule since values for the binding of two molecules within CB[8] are in the order of the $10^{13}\text{--}10^{16} \text{ M}^{-2}$.^[31a] They reported that the singlet oxygen generation in the complex is decreased due to a fast intermolecular electron transfer.^[51]

This $\text{TBO}^+\text{-B}$ derivative could be released by the competitive binding of FGG peptide, since it had been reported that the binding affinity of *N*-terminal aromatic peptides to CB[8] is in the order of $10^9\text{--}10^{11} \text{ M}^{-2}$.^[52] They observed that the fluorescence of $(\text{TBO}^+\text{-B})_2\text{@CB[8]}$ was recovered after 20 seconds of mixture with the peptide. When the $(\text{TBO}^+\text{-B})_2\text{@CB[8]}$ complex was injected into mice, the fluorescence was recovered after 2 hours indicating that the modified photosensitizer could be activated within the body. They observed that $(\text{TBO}^+\text{-B})_2\text{@CB[8]}$ was stable in the blood and was able to be activated by small molecular weight species in the cells. They screened for a variety of small molecular weight compounds such as glucose, pyruvic acid, glutamine, lactic acids, salts, 20 aminoacids and oligopeptides such as GW, GY, GF, GG, FG, YG, WG and FGG. They saw evidence that only the *N*-terminal aromatic peptides FG, YG, WG and FGG had the ability to recover the fluorescence of the system. ROS generation capabilities for both free $\text{TBO}^+\text{-B}$ and $(\text{TBO}^+\text{-B})_2\text{@CB[8]}$ complex were studied in SCC-7 cells using DCFH-DA fluorescent probe.^[53] The cells presented similar ROS generation once incubated and irradiated with $\text{TBO}^+\text{-B}$ and $(\text{TBO}^+\text{-B})_2\text{@CB[8]}$, which they attributed to the capability of $(\text{TBO}^+\text{-B})_2\text{@CB[8]}$ to be fully activated within the cell. Due to the great potential impact of such results for PDT, similar applications are foreseen.

3.3. Photobleaching and Photodegradation

Photobleaching is the permanent loss of the absorption properties of a molecule due to photo-induced chemical modifications. This effect is detrimental for PDT due to the loss in the ability to generate reactive oxygen species and the loss of fluorescence for tissue localization.

One of the first examples of the effect of encapsulation in photobleaching was presented for rhodamine G6 (RhG6), a very common fluorescent dye used in lasers, that has also been shown to induce the photosensitized killing of bacteria.^[54] Encapsulation within CB[7] was able to increase the photostability of the dye by a factor of 1.5 at low irradiances ($< 1 \text{ kW cm}^{-2}$) and by a factor of 30 at high irradiances (10 MW cm^{-2}). The increase in the photostability was attributed to several factors related with CB[7] inner cavity such as its low polarizability, the confinement of the dye and protection from quenchers such as water and oxygen.^[55]

Methylene blue has been shown to be protected from photobleaching when encapsulated inside CB[7] and CB[8], during the photosensitized oxidation of human serum albumin. In this case, the generation of singlet oxygen is the main mechanism for the observed protein photooxidation.^[42] On the

contrary, the same molecule encapsulated within CB[7] shows increased photodecomposition when irradiated in the presence of iron(II) and hydrogen peroxide.^[56] In the latter case, the mechanism of action is proposed to be mainly photo-induced electron transfer. For the same irradiation conditions, the $(\text{MB}^+)_2\text{@CB[8]}$ complex shows negligible photodecomposition,^[56] showing that this process is strongly dependent on the mechanism of the photo-reactions.

For the photosensitizer AO^+ , enhanced photobleaching is observed in the presence of CB[7] when irradiated with human serum albumin, while for the CB[8] complex there is no photobleaching (Figure 4).^[42] The difference with the behavior for MB^+ discussed above can be attributed to the photo-

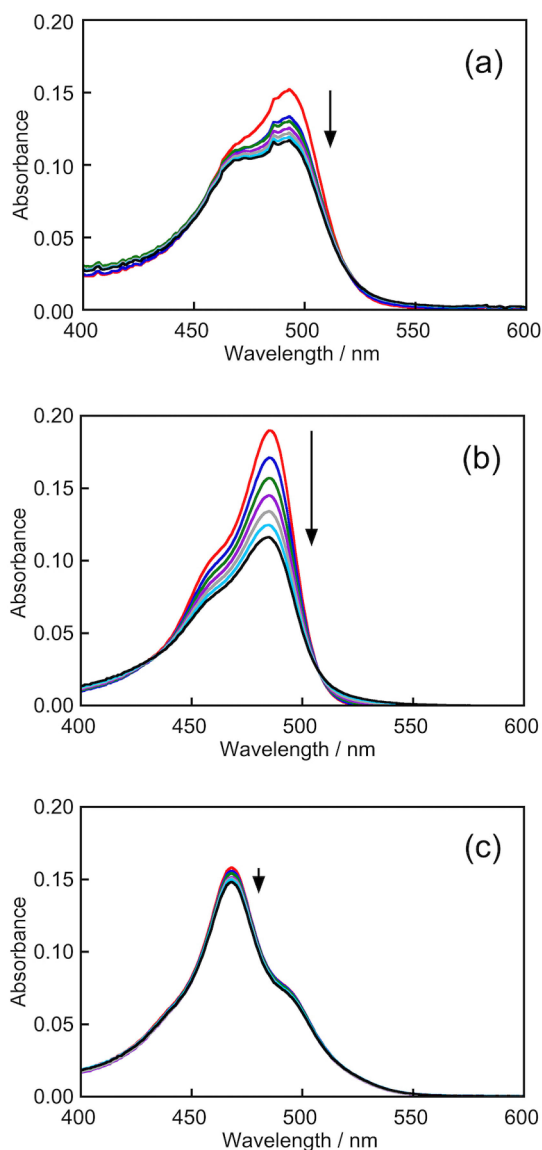


Figure 4. AO^+ in the presence of HSA irradiated (a) in the absence of CB[n] at 492 nm, (b) in the presence of CB[7] at 485 nm and (c) in the presence of CB[8] at 465 nm. Adapted from reference^[42] with permission of the PCCP Owner Societies ©2017.

sensitizing mechanism. While MB^+ is primarily a type II photosensitizer (singlet oxygen generator), AO^+ acts mainly through type I mechanism (electron-transfer) and thus, the effect of encapsulation into CB[7] is different. It must be pointed out that the protection imposed by CB[8] comes with a decrease in the overall photoactivity of the photosensitizer, and therefore, CB[7] seems to be the most promising CB[n] in this regard. Since avoiding photobleaching allows to reuse the photosensitizer during therapeutic applications, the encapsulation of a type II photosensitizer might be more well-suited for PDT.

Although not specific for PDT, photodegradation of drugs is also a big concern for biomedical applications. In this sense, it is important to highlight the effect of CB[7] on the photodegradation of benzimidazole-derived drugs.^[57] This macrocycle was shown to increase the photostability of thiabendazole (TBZ) and fuberidazole (FBZ) drugs, but not for albendazole (ABZ), carbendazim (CBZ) and the parent drug benzimidazole (BZ).^[57] In their experimental conditions of pH 2.4 under intense UV irradiation, the inclusion complexes of FBZ@CB[7] and TBZ@CB[7] decomposed 7 and 3 times more slowly, respectively, than their corresponding free form.^[57]

4. Effect of CB[n]s on Photophysical Properties

The photophysical properties of an extensive list of fluorescent dyes (including photosensitizers) and their supramolecular interactions with CB[n]s have been reviewed by R. N. Dsouza, U. Pischel, and W. M. Nau.^[58] In this section we present the data for selected photosensitizers, giving emphasis to the changes in absorption and fluorescence emission, and the implications for PDT.

4.1. Absorption Spectra

Complexation of photosensitizers and other fluorescent dyes into CB[n]s results in changes in their absorption spectra. This is useful for keeping track of the complexation of the PS. Complexation typically produces a shift (bathochromic or hypsochromic) in their absorption maxima. As an example, we show the absorption spectra of AO^+ in the absence or presence of CB[7] and CB[8] (Figure 5), which has been well-studied by several groups.^[31a,32,59] When AO^+ is encapsulated into CB[7] and CB[8], a characteristic blue-shift from 492 nm to 485 nm and 468 nm, respectively, is observed. This behavior is common for other photosensitizers.

Most of the photosensitizers discussed above are cationic fluorescent dyes, which can be readily encapsulated within CB[n]s.^[55b] Among this group of molecules, it has been reported that not only the shifts in the absorption and emission spectra are relevant, but also the fact that the brightness ($\epsilon_{\text{max}} \times \Phi_f$) of almost all these molecules is improved when encapsulated in CB[7]. This increase can be attributed mainly

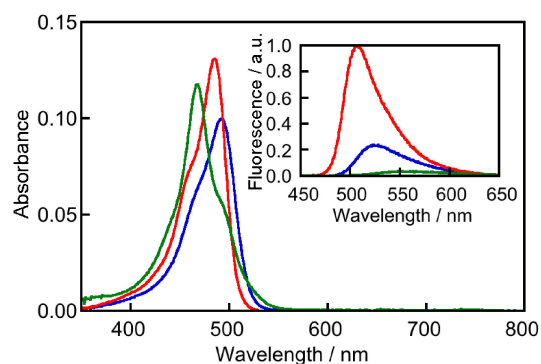


Figure 5. Absorption spectra for AO^+ (2 μM) in the absence (blue) and presence of 50 μM CB[7] (red) or 20 μM CB[8] (green) in 10 mM phosphate buffer pH 7.0 at 20 °C. Inset: fluorescence spectra for the same samples.^[32] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry (RSC) on behalf of the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and RSC.

to changes in their fluorescence emission, but also to their absorption coefficient. Photophysical data for selected photosensitizers are summarized on Table 2. Changes in UV-VIS spectra, are different depending on the photosensitizer. For example, AO^+ exhibits a more pronounced blue-shift when encapsulated in CB[8] than in CB[7], compared to MB^+ . For other dyes such as CV^+ bathochromic shifts have been reported, which is concordant with decreasing polarity of the environment.^[55b]

The work by S. Sun, X. Peng and collaborators needs to be highlighted in this section. They showed that phenothiazine (PTZ), which is the core of several photosensitizers, forms a 1:1:1 ternary complex with methyl viologen (MV^{2+}) and CB[8]. This complex shows NIR absorption due to the induction of intermolecular charge-transfer between PTZ and MV^{2+} within the cavity of CB[8]. Penetration of light through the tissues at the NIR range is deeper than in the visible range, which holds great potential for PDT applications. Additionally, this complex showed photo-induced DNA cleavage due to the generation of $^1\text{O}_2$ and $^{\bullet}\text{OH}$ radicals.^[60] As mentioned earlier, CB[n]s can also help to obtain better quality spectra because they help solubilize photosensitizers in order to avoid aggregation.^[58] The shifts in UV-VIS spectra, can be attributed to changes in microenvironment, from the polar aqueous solvent to the hydrophobic cavity of CB[n]s.^[55b] It is noteworthy that CB[n]s are transparent in the visible region of the spectrum, and this allows full flexibility in the selection of the appropriate irradiation wavelength for each photosensitizer, for example when detecting their emission inside living cells.

4.2. Fluorescence Emission

As previously mentioned, fluorescence can increase dramatically when complexation with CB[7] occurs, while CB[8] can sometimes quench the fluorescence emission. In general,

Table 2. Photophysical properties for selected photosensitizers and their inclusion complexes with CB[7].

Photosensitizer	Abs λ_{max} /nm	Em λ_{max} /nm	Φ_f	τ /ns	$\epsilon/\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Condition ^[a]
MB ⁺	665 ^[61]	685 ^[62]	0.03 ^[61,64]	0.52 ± 0.03 ^[61] 0.370 ^[62]	95,000 (664 nm) ^[65]	
MB ⁺ @CB[7]	661 ^[61]	686 ^[63]	0.02 ^[63] 0.22 ^[61] 0.13 ± 0.01 ^[31a]	0.345 ^[63] 1.49 ± 0.03 ^[61]		
AO ⁺	435 ^[66] 492 ^[32,66]	550 ^[66] 535 ^[66–67] 525 ^[32]	0.055 ^[66] 0.041 ^[66]	6.2 ^[66] 1.7 ^[66–67] 2.01 ± 0.04 ^[32]	62,000 (491 nm) ^[68]	pH 12.0 pH 7.0
AO ⁺ @CB[7]	485 ^[32]	508 ^[32]	0.25 ^[67] 0.20 ^[31a]	3.46 ± 0.02 ^[32]		pH 7.0
RF	450 ^[69] 370 ^[69]	530 ^[35]	0.267 ± 0.01 ^[70] 0.26 ^[5]	4.70 ^[71]	12,200 (450 nm) ^[72]	pH 7.0
RF@CB[7]	~380 ^[71]	532 ^[71]	0.146 ^[71]	4.32 ^[71]		pH 7.0
TMPyP ⁴⁺	422 ^[73] (Soret) 520 ^[73] 552 ^[73] 585 ^[73] 640 ^[73]	715 ^[73] 675 ^[73]	0.017 ^[73] 0.047 ^[33]	4.9 ^[73] 5.0 ^[33]	234,000 (422 nm) ^[73]	PBS pH 7.4
TMPyP ⁴⁺ @(CB[7]) ₄	427 ^[74]	655 ^[33] 717 ^[33]	0.030 ^[74] 0.078 ^[33]	11.0 ^[33]		

^[a] All measurements in neutral solutions in water unless stated otherwise.

encapsulation within CB[7] results in more efficient fluorescence as can be seen in Figure 5 inset, where fluorescence of AO⁺ increased when encapsulated within CB[7], and this phenomenon is accompanied by a blue shift (from 525 nm to 508 nm). On the contrary, complexation with CB[8] results in a drastic decrease of the fluorescence and a red shift of the maximum to 560 nm (Figure 5 inset). On the same note, for MB⁺, complexation with CB[7] enhances its emission,^[31a] and this is not always the case for other commonly used macrocycles. For example, calixarenes, while being able to encapsulate MB⁺, quench its fluorescence,^[75] and cyclodextrins, although are able to increase the fluorescence of the photosensitizer, they form weak complexes with MB⁺.^[58,76] This enhancement in the fluorescence can also be seen in other photosensitizers such as TMPyP⁴⁺.^[33] However, in the case of RF, the fluorescence is quenched and somewhat red shifted (~2 nm) when encapsulated into CB[7].^[35] This result is not expected, because encapsulation into CB[7] should restrict the vibrational and rotational motions of the guest, resulting in a reduced non-radiative decay rate of the excited guest. The authors explain this behavior by stating that lactim form of RF (less fluorescent) generates more favorable complexes with CB[7] than the lactam form of RF, probably due to more favorable dipole-dipole interactions with the former.

This large increase in fluorescence is very useful in PDT, because it allows to locate the photosensitizer within the cell and track important parameters such as tumor intake using fluorescence based assays.^[51,77]

4.3. Fluorescence Lifetime and Quantum Yield

In general, the complexation of photosensitizers within CB[7] induces not only enhanced fluorescence emission, but also increases fluorescence quantum yields,^[26a] and lengthens fluorescence lifetimes.^[55b] This is attributed mainly to the cavity of the CB[7] which offers a less polar environment and of low polarizability, as well as the structural confinement provided, causing less rotational and vibrational freedom, which in turn reduces non-radiative decay pathways.^[58] The enhancing effect of CB[7] in fluorescent quantum yield can be greater than using less polar solvents and can even be comparable to complex structural modifications of the photosensitizer.^[55b] Regarding CB[8], the formation of dimers is favored and this generally results in reduced fluorescence quantum yields; although the fluorescence lifetimes are sometimes longer.^[32,58] This is especially true for tricyclic dyes such as AO⁺ and MB⁺, where dimerization produces self-quenching due to π - π interactions, decreasing the fluorescence emission.^[26a,32]

The increase in fluorescence quantum yield and/or change in the fluorescence lifetimes resulting on modulation of fluorescence, can be useful in the detection of the molecules during drug delivery and cellular localization using techniques such as Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM), because it could allow greater contrast^[55b] and improvements of the signal-to-noise ratio as well as differentiating the emission of the photosensitizer from background noise.^[78]

5. Effects of CB[n]s on the Delivery of Photosensitizers to Cells

5.1. Solubilization

Although cationic photosensitizers that are reported to bind to CB[n]s are readily soluble in water, more hydrophobic photosensitizers are needed in order to have better incorporation in tumoral cells. In this sense, porphyrins and phthalocyanines represent highly hydrophobic molecules with high efficiencies of singlet oxygen generation. In general, macrocycles like cyclodextrins increase the solubility of poorly water soluble drugs by forming inclusion complexes.^[79] In this context, the solubilizing properties of CB[n]s with multiple pharmaceuticals have been reviewed in the past by the groups of D. Macartney, N. Wheate and W. M. Nau,^[18,23,25] and the readers are directed to the references cited for more information.

An interesting report from the group of A. C. Tedesco claimed a complex between ZnPc, a highly water-insoluble photosensitizer, and CB[7] have increased solubility in water; however, the photosensitizer still needed to be delivered into cells using a liposomal formulation to enhance phototoxicity.^[80]

CB[7] has shown to increase the solubility of several dyes in water,^[55b] although not specifically photosensitizers. On the other hand, acyclic CB[n]-containers have been shown to increase the solubility of many pharmaceuticals.^[81] For example, the effect of this type of acyclic containers on the solubility of anticancer drugs paclitaxel and tamoxifen were shown to be enhanced by a factor of 2750-fold and 118-fold, respectively.^[81] Although similar results can be expected using photosensitizers, a direct determination of the solubility of PDT drugs in the presence of CB[n]s is to be established.

5.2. Protection against Aggregation and Enzymatic Reduction

Aggregation of photosensitizers in biological media, usually leads to a loss of photoactivity, decreasing singlet oxygen quantum yields. This is a very well-known problem for porphyrin-based photosensitizers, where dimerization and further aggregation are triggered by pH, ionic strength, electrostatic interactions (Van der Waals, H-bonding, etc) and π - π interactions. Many photosensitizers have hydrophobic characteristics; therefore, they aggregate easily in aqueous solutions, which produces the self-quenching of the excited state, thus diminishing the photoactivity of the drug.^[1,6b,10,30a,c] In this sense, encapsulation into CB[7] ensures that the photosensitizer is in its monomeric form, boosting the photoactivity.^[42,82]

For phenothiazine dyes such as MB⁺ and TBO⁺, their reduction *in vivo* by NADPH-dependent enzymes is a serious drawback for PDT. The reduced form of the dyes (leuco form) do not absorb light, decreasing their overall photoactivity.^[83]

Some examples of encapsulating the dye in nanoparticles have been shown to decrease the enzymatic reduction of MB⁺,^[84] but a supramolecular approach would be more general and versatile. The group of X. Z. Zhang and collaborators showed that a TBO⁺ derivative is protected from enzymatic reduction by CB[8] (Figure 6).^[51] As shown in Figure 7, our own studies suggest that MB⁺ has an even higher degree of protection inside CB[7] compared to CB[8], and in this case the dye is photoactive unlike inside CB[8].

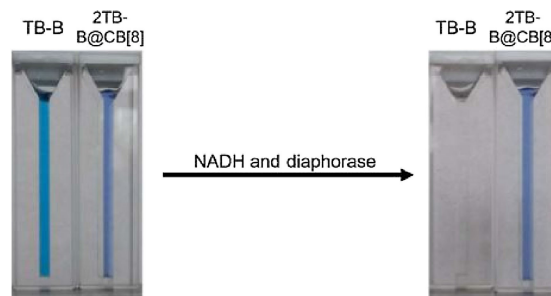


Figure 6. Color changes for TBO⁺ derivative (TB-B) free and included inside CB[8] before and 30 min after the exposure to diaphorase and NADH as reduction agent model. Reprinted with permission from reference.^[51] Copyright © 2016, American Chemical Society.

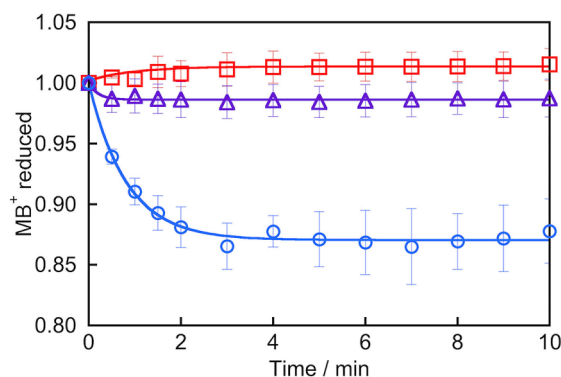


Figure 7. Absorbance decay (normalized) at 660 nm for MB⁺ (3 μ M) in the absence (blue circles) or presence of CB[7] (red squares) or CB[8] (purple triangles). Solutions containing NADPH (0.45 μ mol) and diaphorase (0.05 mg) in 10 mM phosphate buffer pH 7.4.

It is inferred from these studies that CB[n]s act as a physical barrier against enzymatic attack, but other effects such as changes in oxidation/reduction potential due to complexation cannot be discarded.

5.3. Effects of CB[n]s on Incorporation into Cells

It has been reported by H. García and collaborators that CB[n]s complexes of AO⁺ and PYY⁺ can cross the cell membrane

(Figure 8).^[26b] And even more so, it has also been demonstrated that CB[n]s nanoparticles (~100 times bigger than lone CB[n]s) can cross the cell membrane, opening up a world of possible biological applications.^[85] It is important to mention that, since CB[n]s exhibit great association constants with the photosensitizers here mentioned, it allows for transportation of the whole supramolecular system through the membrane with no interference from external factors such as the presence of Dulbecco's modified Eagle's culture medium or buffers necessary for conducting the experiments.^[26b]

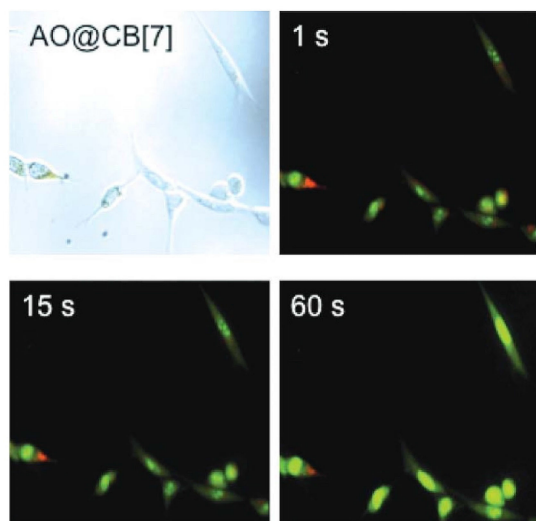


Figure 8. Optical microscopy images of 3T3 cells taken under white light illumination (top left) or fluorescence images exciting with E4 filter set ($\lambda_{\text{ex}} \approx 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 470 \text{ nm}$) for AO@CB[7] at 1 s (top-right), 15 s (bottom left) and 60 s (bottom right) of exposure.^[26b] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry (RSC) on behalf of the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and RSC.

5.4. Effects of CB[n]s on Phototoxicity on Cultured Cells *In Vitro*

In 2014, the group of A. C. Tedesco reported a photosensitizer complex encapsulated into liposomes, (ZnPc@CB[7])-Lp, and its phototoxic effect *in vitro* against B16-F10 melanoma cells.^[80a] They were able to observe that the cell viability was 50% for all the light doses used for the ZnPc@CB[7] complex. Meanwhile for the (ZnPc@CB[7])-Lp system, they reported that the cell viability was light dose-dependent going from 70% (± 0.82) to 9% (± 1.41) for the lowest to the highest light dose used (Figure 9). The results showing a higher phototoxicity for the liposomal formulation were attributed to the fact that the ZnPc@CB[7] complex presents more hydrophilic properties compared to the liposomal formulation. This increased the interaction with B16-F10 melanoma cells, thus ensuring a rapid cellular uptake.^[80a]

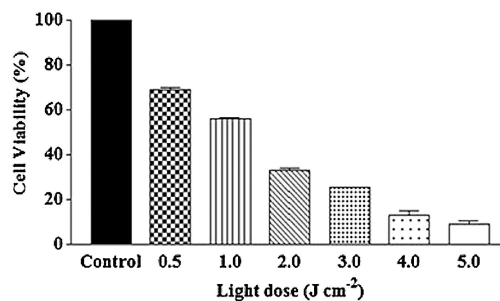


Figure 9. Cell viability results of B16-F10 cells after treatment using liposomes containing CB[7]:ZnPc (0.25 mg mL⁻¹ ZnPc) irradiated with different light doses ($p < 0.001$ compared to control 100%). Reprinted from reference,^[80a] Copyright©2012 with permission from Elsevier.

The same group had previously reported the phototoxic effect of magneto-liposomes (ML) that contained the same ZnPc@CB7 complex on B16-F10 cells.^[80b] They observed that the cells were more susceptible to the photodamage induced by ZnPc@CB7-ML upon irradiation compared to control experiments, and a synergistic effect was noted for the combination of AC (alternating current) magnetic field with PDT. In this particular case the direct effect of the presence of CB[7] is hard to elucidate.

X. Z. Zhang's group used the synthetic porphyrin TPOR complexed with CB[7] to induce phototoxicity on bacteria. The complex presented enhanced antibacterial properties against *Escherichia Coli* when irradiated with white light leading to an enhancement in the phototoxicity from 17% colony inhibition by TPOR to 97% for the TPOR@(CB[7])₄ complex (Figure 10). It must be noted that CB[7] itself is not phototoxic. CB[7] improved TPOR phototoxicity due to the disaggregation of the photosensitizer, increasing its ability to generate singlet oxygen as discussed previously. This cationic porphyrin accumulated efficiently in the bacterial surface (negatively charged) and because singlet oxygen is relatively short-lived, this potentiates its effect by being in close proximity to the target.^[34] This is an interesting work showing that photosensitizer complexes with CB[n]s can also be applied to antibacterial treatments, and are not just reserved for cancer applications.

The TBO⁺ derivative prepared with biotin (TBO⁺-B) by X. Z. Zhang and colleagues previously mentioned above (Scheme 6), showed a phototoxicity effect against SCC-7 (squamous cell carcinoma). They observed minimal dark toxicity for TBO⁺-B and (TBO⁺-B)₂@CB[8], which is very promising for PDT applications. Upon irradiation, both systems were phototoxic for the cells (Figure 11), which is in agreement with their similar capability of generating ROS, particularly singlet oxygen (see discussion in section 3.2). The most interesting attribute is that the (TBO⁺-B)₂@CB[8] complex showed selectivity to target cancer cells that over-express the biotin receptor. This was shown for SCC-7

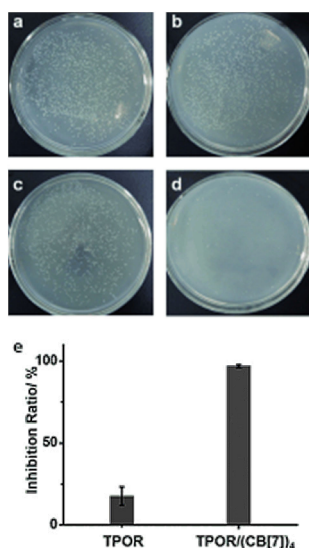


Figure 10. Plate photographs for *E. coli* on YTD agar plate treated with a) TPOR in the dark, b) TPOR under photo-irradiation, c) TPOR/(CB[7])₄ in the dark, d) TPOR/(CB[7])₄ under photoirradiation, and e) biocidal activities of TPOR and TPOR/(CB[7])₄ toward *E. coli*. The values represent the mean standard deviation of three separate experiments. The error bars represent standard deviations of data from three separate measurements. The concentration of TPOR is fixed at 7.2×10^{-7} M for killing *E. coli*. Copyright © 2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

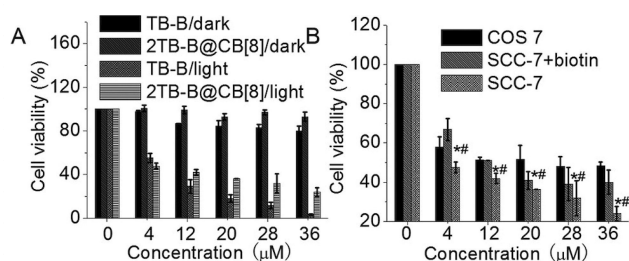


Figure 11. (A) Dark toxicity and phototoxicity of TB-B and 2TB-B@CB[8] incubated with SCC-7 cells. (B) Phototoxicity of COS 7 cells, biotin (100 μM) pretreated SCC-7 cells, and SCC-7 cells incubated with 2TB-B@CB[8], * $p < 0.05$ and # $p < 0.05$ when SCC-7 group compared with COS 7 and SCC-7 + biotin groups, by student's t test.

compared to COS7 normal cells (african green monkey kidney fibroblast cells) in Figure 11.

Furthermore, *in vivo* experiments were conducted to assess the antitumor efficacy of (TBO⁺-B)₂@CB[8] using an irradiation laser light of 660 nm, 1 W/cm² for 5 minutes on the first, fourth and seventh day. It was reported that (TBO⁺-B)₂@CB[8] demonstrated a better tumor growth inhibition than free TBO⁺-B, which was confirmed by the lack of body weight changes and the survival of the mice once the experiment ended. This conclusion was further supported by hematoxylin and eosin staining where the damage in the tumor could be compared. Overall the mice treated with (TBO⁺-B)₂@CB[8] showed significant tumor cell death, meanwhile

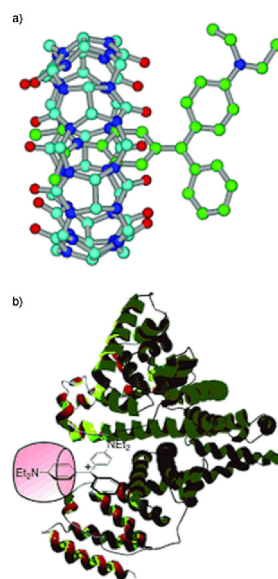
the mice treated with TBO⁺-B presented limited apoptosis/necrosis in the tumor tissue and the PBS treated mice showed that the majority of the tumor cells survived.^[51]

There are a few reports in the literature using CB[n]s inclusion complexes to enhance the phototoxicity of photosensitizers with potential PDT applications. Given the versatility of this supramolecular approach, more research on this area is needed to potentiate its applications.

5.5. Combination of CB[n]s with Proteins (Biosupramolecular Assemblies)

In spite of the noticeable properties of CB[n]s as drug delivery vehicles, their rapid clearance^[29] might work against the high accumulation of photosensitizers in tumors needed for PDT. In this sense, there may be a great benefit in combining CB[n]s with serum proteins in a *biosupramolecular* assembly. That would allow combining the beneficial properties of CB[n]s on the photoactivity of photosensitizers, with the prolonged circulation times of serum proteins.

The first example of such biosupramolecular assembly was published in 2007 by the group of A. C. Bhasikuttan in collaboration with W. Nau (Scheme 7).^[86] The interaction between the tryphenylmethane dye *Brilliant green* (BG), CB[7] and bovine serum albumin (BSA) was identified by an enhancement of the fluorescence of the dye by a factor of 300, while the interaction of BG with CB[7] alone or with BSA yielded fluorescence enhancements by factors of 6 and 45, respectively. The binding constant determined for the ternary system was $(3.9 \pm 0.6) \times 10^5$ M⁻¹, about an order of magnitude



Scheme 7. a) AM1-optimized geometry of the BG-CB7 complex and b) schematic representation of the fluorescent ternary complex BG-CB7-BSA. Copyright © 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

higher than in the absence of either BSA or CB[7] ($(1.7 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for BG-CB[7] and $(3.2 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for BG-BSA). Note that the binding constant value unit is informed as M^{-1} and not M^{-2} for the ternary complex. This is because (BG-CB[7])-BSA formation consists of a pre-existing complex of CB[7] and BG to which BSA is added. Therefore, the interaction between the three components was cooperative in nature. Similar results were observed with the protein lysozyme, which suggested a broader application for this kind of interactions.^[86] It must be noted that no photochemical applications have been reported for this complex.

In 2010, the group of X. Wang reported the enhancement of the binding of the cationic porphyrin TMPyP⁴⁺ to BSA in the presence of CB[8].^[43] The photosensitizer TMPyP⁴⁺ binds to BSA with a binding constant of $1.35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, which is increased 3.2-fold in the presence of CB[8] ($4.30 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). This is suggested to be possible by the simultaneous inclusion of two moieties inside CB[8], i.e. the photosensitizer and an amino acid from the protein chain. On the other hand, CB[7] binding is in competition with the binding to BSA, and no ternary interaction is observed. An enhancement of the singlet oxygen quantum yield from 0.74 to 0.90 was observed for this complex.

Both biosupramolecular assemblies have in common that they use large dyes with multiple arms in order to provide an anchoring moiety to both the protein and the macrocycle. Our group followed up with a report on the ternary interaction between AO⁺, CB[7] and human serum albumin (HSA) (Scheme 8).^[32] In spite of being a small molecule, the extended protrusion out of the CB[7] cavity observed for AO⁺ (shown in Figure 3) is a plausible explanation for the interaction with the protein. The binding constant for the ternary system was estimated to be $(3.5 \pm 0.8) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, very similar to the binding of the photosensitizer by itself to the protein ($2.5 \pm 0.4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.^[32] In this case, there are no drastic changes in the fluorescence emission or lifetime of the complex, but there are noticeable traits in the anisotropy decays which revealed this interaction. Such interactions are rare and relocation of the dye between the protein and macrocycle has been observed

for other molecules.^[87] It is also important to mention that there are similar approaches using inclusion complexes of porphyrins with cyclodextrins and lipoproteins.^[88]

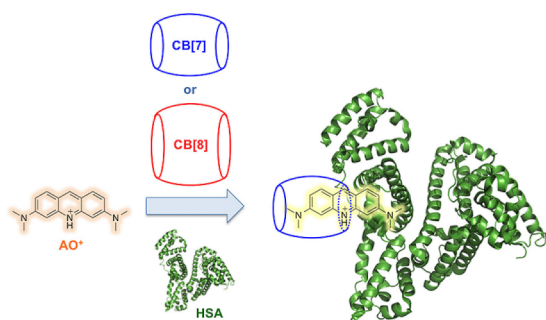
6. Summary and Outlook

In this review we have summarized the properties that make CB[n]s so attractive for PDT applications. Although PDT has been an intensive area of research during the last decades, only recently the use of CB[n]s complexes has been noted as having strong potential for therapeutical applications. Enhanced solubilization of photosensitizers and prevention of aggregation by CB[n]s in biological media are two properties that directly affect the outcome of PDT *in vivo*. In this regard, encapsulation of neutral photosensitizers should be explored to expand on the use of CB[n]s in PDT, specially porphyrins which are the standard for this type of treatment.

Synthetic approaches (modifying photosensitizers) to increase intersystem crossing, and thus singlet oxygen generation, have shown to decrease fluorescence emission since both processes are competing deactivation pathways from the singlet excited state. Fluorescence emission is essential for detection *in vivo*, and thus a careful balance between this process and triplet excited state generation must be considered. CB[n]s have shown the potential to enhance both the fluorescence and intersystem crossing as shown for AO⁺. However, this is not a general effect and more efforts should be put into fully understanding how this mechanism is related to the structure of the complexes.

Ternary interactions between PS complexes with CB[n]s and proteins is also an area that could be exploited for *in vivo* drug delivery purposes. Strong binding to serum proteins would allow for longer circulation times in the bloodstream, improving accumulation of PS in tumors and *in vivo* studies are likely to shed light on the applicability of this strategy in the future. Certainly, the structures of the PS, the CB[n] and the protein are determinant for this kind of ternary interactions. The key feature being protrusion of the PS out of the cavity of the CB[n] to generate a hydrophobic region that interacts with the protein.

The stabilization of the singlet excited state within CB[7] has been largely discussed in the literature; however, the stabilization of the triplet excited state seems to have been somewhat overlooked in the past. This is an essential requirement to enhance both singlet oxygen generation and direct electron-transfer reactions to biomolecules. On the other hand, CB[8] has the opposite effect, shutting down both fluorescence and singlet oxygen generation or electron-transfer processes. Therefore, both CB[7] and CB[8] have characteristics that could be beneficial for PDT since at different stages of the treatment full photoactivity (during treatment) or no photoactivity (after the treatment) are desired. Most of the work in the literature in this topic has been carried out with CB[7], and it surely presents amenable properties for PDT; however, other



Scheme 8. Cartoon of the proposed structure for AO⁺-CB[7]-HSA ternary complex.^[32] Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry (RSC) on behalf of the European Society for Photochemistry, the European Photochemistry Association, and RSC.

members of this family including CB[n] derivatives should be explored in more detail.

Given the transcendent role of singlet oxygen in therapeutic applications of PDT and the need to control the photoactivity of the PS to reduce side-effects, the encapsulation of PS into CB[n]s has the potential and versatility to meet these requirements. Control over the generation of singlet oxygen is a very interesting area of research that is likely to bring new advances in the near future.

Acknowledgements

The authors thank CONICYT for the financial support through their FONDECYT research program (Grant N°1160443). J.R.-D. and L.D.-V. thank CONICYT-PCHA/Doctorado Nacional/2015-21150894 and CONICYT-PCHA/Doctorado Nacional/2017-21170457, respectively. The authors deeply thank Carolina Pérez Mora for the creation of scientific artwork for our research.

References

- [1] M. R. Hamblin, P. Mróz, *Advances in Photodynamic Therapy. Basic, Translational, and Clinical*, Artech House, **2008**.
- [2] D. W. Felsher, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 375–380.
- [3] a) P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzenienė, D. Kessel, et al., *CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 250–281; b) S. B. Brown, E. A. Brown, I. Walker, *Lancet Oncol.* **2004**, *5*, 497–508.
- [4] S. G. Bown, *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **2012**, *10*, S69–S74.
- [5] P. Majumdar, R. Nomula, J. Zhao, *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2*, 5982–5997.
- [6] a) R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X. H. Hu, C. J. H. Childs, C. H. Sibata, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2004**, *1*, 27–42; b) A. E. O'Connor, W. M. Gallagher, A. T. Byrne, *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 1053–1074.
- [7] M. J. Davies, S. L. Fu, R. T. Dean, *Biochem. J.* **1995**, *305*, 643–649.
- [8] H. Dummin, T. Cernay, H. W. Zimmermann, *J. Photochem. Photobiol. B* **1997**, *37*, 219–229.
- [9] F. Kratz, P. Senter, H. Steinhagen, *Drug Delivery in Oncology. From Basic Research to Cancer Therapy*, Wiley-VCH, **2012**.
- [10] M. R. Hamblin, P. Avci, *Applications of Nanoscience in Photomedicine*, Elsevier, **2015**.
- [11] F. Dosio, S. Arpicco, B. Stella, P. Brusa, L. Cattel, *Int. J. Pharmaceut.* **2009**, *382*, 117–123.
- [12] a) P. M. R. Pereira, B. Korsak, B. Sarmento, R. J. Schneider, R. Fernandes, J. P. C. Tome, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2518–2529; b) J. G. Moser, *Photodynamic Tumor Therapy: 2nd and 3rd Generation Photosensitizers*, Harwood Academic Publishers, **1998**.
- [13] a) T. Lammers, *Int. J. Pharmaceut.* **2013**, *454*, 527–529; b) C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 7743–7765.
- [14] S. A. Sibani, P. A. McCarron, A. D. Woolfson, R. F. Donnelly, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 1241–1254.
- [15] Y. N. Konan, R. Gurny, E. Allémann, *J. Photochem. Photobiol. B* **2002**, *66*, 89–106.
- [16] H. Jeong, M. Huh, S. J. Lee, H. Koo, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, K. Kim, *Theranostics* **2011**, *1*, 230–239.
- [17] L. Delanaye, M. A. Bahri, F. Tfibel, M. P. Fontaine-Aupart, A. Mouithys-Mickalad, B. Heine, J. Piette, M. Hoebeke, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 317–325.
- [18] N. Saleh, I. Ghosh, W. M. Nau, in *Supramolecular Systems in Biomedical Fields* (Ed.: H.-J. Schneider), Royal Society of Chemistry, **2013**, pp. 164–212.
- [19] J. X. Zhang, P. X. Ma, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2013**, *65*, 1215–1233.
- [20] K. I. Assaf, W. M. Nau, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 394–418.
- [21] a) J. Kim, I.-S. Jung, S.-Y. Kim, E. Lee, J.-K. Kang, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 540–541; b) J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaacs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844–4870; c) L. Isaacs, *Chem. Commun.* **2009**, 619–629; d) S. J. Barrow, S. Kaser, M. J. Rowland, J. del Barrio, O. A. Scherman, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 12320–12406; e) Y. H. Ko, I. Hwang, D. W. Lee, K. Kim, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 506–514; f) J. Murray, K. Kim, T. Ogoshi, W. Yao, B. C. Gibb, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2479–2496.
- [22] Q. Li, S.-C. Qiu, J. Zhang, K. Chen, Y. Huang, X. Xiao, Y. Zhang, F. Li, Y.-Q. Zhang, S.-F. Xue, et al., *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4020–4023.
- [23] D. H. Macartney, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 600–615.
- [24] a) G. Hettiarachchi, D. Nguyen, J. Wu, D. Lucas, D. Ma, L. Isaacs, V. Briken, *PLoS ONE* **2010**, *5*, 10514; b) V. D. Uzunova, C. Cullinane, K. Brix, W. M. Nau, A. I. Day, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2037–2042.
- [25] S. Walker, R. Oun, F. J. McInnes, N. J. Wheate, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 616–624.
- [26] a) P. Montes-Navajas, A. Corma, H. García, *Chem. Phys. Chem.* **2008**, *9*, 713–720; b) P. Montes-Navajas, M. Gonzalez-Bejar, J. C. Scaiano, H. García, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 1743–1747.
- [27] C. Kim, S. S. Agasti, Z. J. Zhu, L. Isaacs, V. M. Rotello, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 962–966.
- [28] L. P. Cao, G. Hettiarachchi, V. Briken, L. Isaacs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12033–12037.
- [29] F. Li, A. K. Gorle, M. Ranson, K. L. Vine, R. Kinobe, M. Feterl, J. M. Warner, F. R. Keene, J. G. Collins, A. I. Day, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 4172–4179.
- [30] a) M. A. Farrukh, in *Advanced Aspects of Spectroscopy* (Eds.: L. M. Moreira, J. P. Lyon, A. P. Romani, D. Severino, M. R. Rodrigues, H. P. M. d. Oliveira), InTech, **2012**; b) J. C. V. P. Moura, A. M. F. Oliveira Campos, J. Griffiths, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1997**, *120*, 459–460; c) M. Wainwright, N. J. Grice, L. E. C. Pye, *Dyes Pigm.* **1999**, *42*, 45–51; d) K. R. Kasimova, M. Sadasivam, G. Landi, T. Sarna, M. R. Hamblin, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 1541–1548.
- [31] a) P. Montes-Navajas, A. Corma, H. García, *Chem. Phys. Chem.* **2008**, *9*, 713–720; b) P. Montes-Navajas, H. García, *J. Photochem. Photobiol. A* **2009**, *204*, 97–101.
- [32] K. Scholtbach, I. Venegas, C. Bohne, D. Fuentealba, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 842–852.
- [33] J. Mohanty, A. C. Bhasikuttan, S. D. Choudhury, H. Pal, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 10782–10785.
- [34] K. Liu, Y. L. Liu, Y. X. Yao, H. X. Yuan, S. Wang, Z. Q. Wang, X. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8285–8289.
- [35] S. Dutta Choudhury, J. Mohanty, A. C. Bhasikuttan, H. Pal, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 10717–10727.
- [36] R. B. Wang, I. W. Wyman, S. H. Wang, D. H. Macartney, *J. Incl. Phenom. Macro.* **2009**, *64*, 233–237.

- [37] E. Silva, A. M. Edwards, *Flavins: Photochemistry and Photobiology*, Royal Society of Chemistry, **2006**.
- [38] a) R. S. Becker, L. F. Ferreira, F. Elisei, I. Machado, L. Latterini, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 1195–1204; b) M. M. Gonzalez, J. Arnbjerg, M. P. Denofrio, R. Erra-Balsells, P. R. Ogilby, F. M. Cabrerizo, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 6648–6656.
- [39] M. Vignoni, F. A. Rasse-Suriani, K. Butzbach, R. Erra-Balsells, B. Epe, F. M. Cabrerizo, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 5300–5309.
- [40] S. Liu, A. D. Shukla, S. Gadde, B. D. Wagner, A. E. Kaifer, L. Isaacs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2657–2660.
- [41] M. González-Béjar, P. Montes-Navajas, H. García, J. C. Scaiano, *Langmuir* **2009**, *25*, 10490–10494.
- [42] J. Cáceres, J. Robinson-Duggon, A. Tapia, C. Paiva, M. Gómez, C. Bohne, D. Fuentealba, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 2574–2582.
- [43] W. Lei, G. Jiang, Q. Zhou, B. Zhang, X. Wang, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13255–13260.
- [44] a) P. Montes-Navajas, H. García, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 2034–2038; b) P. Montes-Navajas, L. Teruel, A. Corma, H. García, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1762–1768.
- [45] a) J. M. Dabrowski, L. G. Arnaut, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 1765–1780; b) M. R. Detty, S. L. Gibson, S. J. Wagner, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3897–3915.
- [46] a) B. Li, L. Lin, H. Lin, B. C. Wilson, *J. Biophotonics* **2016**, *9*, 1314–1325; b) N. Hananya, O. Green, R. Blau, R. Satchi-Fainaro, D. Shabat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 11793–11796.
- [47] a) J. Liu, N. Jiang, J. Ma, X. Du, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4931–4938; b) M. F. Czar, R. A. Jockusch, *Chem. Phys. Chem.* **2013**, *14*, 1138–1148.
- [48] F. Wilkinson, W. P. Helman, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1993**, *22*, 113–262.
- [49] E. G. McRae, M. Kasha, *J. Chem. Phys.* **1958**, *28*, 721–722.
- [50] Y. Liu, Z. Huang, K. Liu, H. Kelgtermans, W. Dehaen, Z. Wang, X. Zhang, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 53–56.
- [51] X. Q. Wang, Q. Lei, J. Y. Zhu, W. J. Wang, Q. Cheng, F. Gao, Y. X. Sun, X. Z. Zhang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 22892–22899.
- [52] A. R. Urbach, V. Ramalingam, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 664–678.
- [53] K. Han, Q. Lei, S. B. Wang, J. J. Hu, W. X. Qiu, J. Y. Zhu, W. N. Yin, X. Luo, X. Z. Zhang, *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25*, 2961–2971.
- [54] M. Vimaladevi, K. C. Divya, A. Girigoswami, *J. Photochem. Photobiol. B* **2016**, *162*, 146–152.
- [55] a) J. Mohanty, W. M. Nau, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3750–3754; b) W. M. Nau, J. Mohanty, *Int. J. Photoenergy* **2005**, *7*.
- [56] T. Fuenzalida, D. Fuentealba, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 686–692.
- [57] A. L. Koner, I. Ghosh, N. Saleh, W. M. Nau, *Can. J. Chem.* **2011**, *89*, 139–147.
- [58] R. N. Dsouza, U. Pischel, W. M. Nau, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7941–7980.
- [59] M. Shaikh, J. Mohanty, P. K. Singh, W. M. Nau, H. Pal, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 408–414.
- [60] S. Sun, W. Gao, F. Liu, J. Fan, X. Peng, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 5888–5892.
- [61] E. I. Alarcón, M. González-Béjar, P. Montes-Navajas, H. García, E. A. Lissi, J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 269–273.
- [62] E. M. Tuite, J. M. Kelly, *J. Photochem. Photobiol. B* **1993**, *21*, 103–124.
- [63] S. J. Atherton, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1816–1822.
- [64] Y. J. Liu, S. Yamamoto, Y. Sueishi, *J. Photochem. Photobiol. A* **2001**, *143*, 153–159.
- [65] K. Bergmann, C. O'konski, *J. Phys. Chem.* **1963**, *67*, 2169–2177.
- [66] M. Shaikh, J. Mohanty, P. K. Singh, W. M. Nau, H. Pal, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 408–414.
- [67] Y. Kubota, R. F. Steiner, *Biophys. Chem.* **1977**, *6*, 279–289.
- [68] E. Vogelmann, W. Rauscher, H. E. Krameer, *Photochem. Photobiol.* **1979**, *29*, 771–776.
- [69] P. Heelis, *Chem. Soc. Rev.* **1982**, *11*, 15–39.
- [70] P. Drössler, W. Holzer, A. Penzkofer, P. Hegemann, *Chem. Phys.* **2003**, *286*, 409–420.
- [71] S. Dutta Choudhury, J. Mohanty, A. C. Bhasikuttan, H. Pal, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 10717–10727.
- [72] L. Whitby, *Biochem. J.* **1953**, *54*, 437.
- [73] E. Reddi, M. Cecon, G. Valduga, G. Jori, J. C. Bommer, F. Elisei, L. Latterini, U. Mazzucato, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 462–470.
- [74] W. Lei, G. Jiang, Q. Zhou, B. Zhang, X. Wang, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13255–13260.
- [75] Q. Lu, J. S. Gu, H. P. Yu, C. Liu, L. Wang, Y. Y. Zhou, *Spectrochim. Acta A* **2007**, *68*, 15–20.
- [76] H.-J. Schneider, *Supramolecular Systems in Biomedical Fields*, Royal Society of Chemistry, **2013**.
- [77] P. Montes-Navajas, M. González-Béjar, J. C. Scaiano, H. García, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 1743–1747.
- [78] C. Marquez, F. Huang, W. M. Nau, *IEEE Trans. Nanobioscience* **2004**, *3*, 39–45.
- [79] J. Szejtli, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743–1754.
- [80] a) G. C. Bolfarini, M. P. Siqueira-Moura, G. J. F. Demets, A. C. Tedesco, *Dyes Pigm.* **2014**, *100*, 162–167; b) G. C. Bolfarini, M. P. Siqueira-Moura, G. J. F. Demets, P. C. Morais, A. C. Tedesco, *J. Photochem. Photobiol. B* **2012**, *115*, 1–4.
- [81] D. Ma, G. Hettiarachchi, D. Nguyen, B. Zhang, J. B. Wittenberg, P. Y. Zavalij, V. Briken, L. Isaacs, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 503–510.
- [82] L. H. Chen, H. T. Bai, J. F. Xu, S. Wang, X. Zhang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 13950–13957.
- [83] J. P. Tardivo, A. Del Giglio, C. S. de Oliveira, D. S. Gabrielli, H. C. Junqueira, D. B. Tada, D. Severino, R. de Fatima Turchiello, M. S. Baptista, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2005**, *2*, 175–191.
- [84] Y. Y. Han, J. Bu, Y. Y. Zhang, W. J. Tong, C. Y. Gao, *Macromol. Biosci.* **2012**, *12*, 1436–1442.
- [85] K. M. Park, K. Suh, H. Jung, D.-W. Lee, Y. Ahn, J. Kim, K. Baek, K. Kim, *Chem. Commun.* **2009**, 71–73.
- [86] A. C. Bhasikuttan, J. Mohanty, W. M. Nau, H. Pal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4120–4122.
- [87] a) F. Chandra, K. Pal, S. Lathwal, A. L. Koner, *Mol. Biosyst.* **2016**, *12*, 2859–2866; b) M. Shaikh, J. Mohanty, A. C. Bhasikuttan, V. D. Uzunova, W. M. Nau, H. Pal, *Chem. Commun.* **2008**, 3681–3683.
- [88] a) I. Yakavets, I. Yankovsky, L. Bezdetnaya, V. Zorin, *Dyes Pigm.* **2017**, *137*, 299–306; b) I. Yankovsky, E. Bastien, I. Yakavets, I. Khludayev, H. P. Lassalle, S. Grafe, L. Bezdetnaya, V. Zorin, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *91*, 172–182.

Received: August 31, 2017

Accepted: October 12, 2017

Published online on November 6, 2017

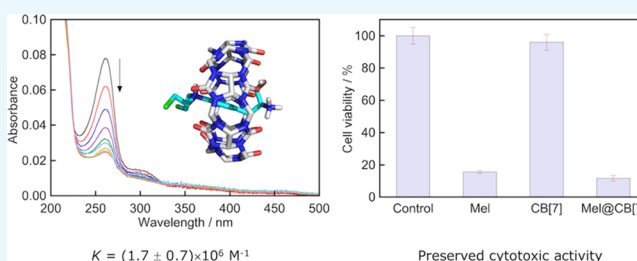
Encapsulation of Chemotherapeutic Drug Melphalan in Cucurbit[7]uril: Effects on Its Alkylating Activity, Hydrolysis, and Cytotoxicity

Gustavo Villarroel-Lecourt, Javiera Carrasco-Carvajal, Felipe Andrade-Villalobos, Fresia Solís-Egaña, Ignacio Merino-San Martín, José Robinson-Duggon, and Denis Fuentealba*

Laboratorio de Química Biosupramolecular, Departamento de Química Física, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago 7820436, Chile

Supporting Information

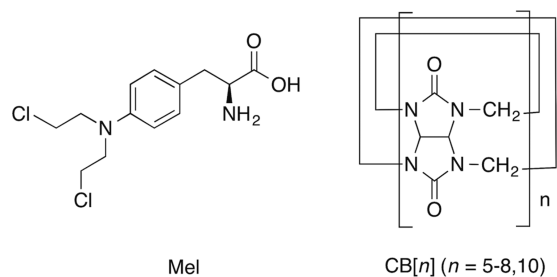
ABSTRACT: The formation of inclusion complexes between drugs and macrocycles has proven to be an effective strategy to increase solubilization and stabilization of the drug, while in several cases improving their biological activity. In this context, we explored the formation of an inclusion complex between chemotherapeutic drug Melphalan (Mel) and cucurbit[7]uril (CB[7]), and studied its effect on Mel alkylating activity, hydrolysis, and cytotoxicity. The formation of the inclusion complex (Mel@CB[7]) was proven by absorption and fluorescence spectroscopy, NMR, docking studies, and molecular dynamics simulations. The binding constant for Mel and CB[7] was fairly high at pH 1 ($(1.7 \pm 0.7) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), whereas no binding was observed at neutral pH. The Mel@CB[7] complex showed a slightly decreased alkylating activity, whereas the cytotoxicity on the HL-60 cell line was maintained. The formation of the complex did not protect Mel from hydrolysis, and this result is discussed based on the simulated structure for the complex.



1. INTRODUCTION

Melphalan (Mel, Scheme 1) is an antineoplastic drug, which is indicated for the treatment of multiple myeloma and other

Scheme 1. Mel and CB[n]s Chemical Structures



types of cancer.^{1,2} Being a drug of the family of nitrogen mustards, its antitumoral effect is related to the alkylation of DNA.^{3–5} Mel is practically insoluble in water at neutral pH, and it rapidly hydrolyzes in biological media, factors that have an impact on its usability. In this context, a supramolecular approach to improving the overall drug performance, such as the use of cyclodextrins,^{6,7} is interesting to explore due to its demonstrated success in pharmaceutical formulations. For example, Evomela is an injectable formulation of Mel that uses a modified β -cyclodextrin (Captisol) to improve its solubility and stability by the formation of an inclusion complex.⁸

Cyclodextrins show in general low binding affinities, which is their main downside as a supramolecular solubilizing agent.⁶ More recently, the family of cucurbit[n]uril macrocycles (CB[n]s, Scheme 1) has emerged as promising candidates for drug delivery applications.^{9–11} Some characteristics that make CB[n]s notable are their low toxicities, solubilizing properties, high thermal stability, high binding affinities, and good solubility in biological fluids.^{6,9,10,12–16}

Previously, a report by Isaacs and collaborators showed that Mel and other alkylating agents can be efficiently solubilized by acyclic CB[n]s,¹⁷ which are very versatile in the binding of several molecules of biomedical relevance. Nevertheless, there is no information regarding how complexation within these macrocycles could affect their stability, alkylating activity, and cytotoxicity. Complexation of drugs by CB[n]s has stimulated much interest over the past decade,^{9,10,12,18,19} and there are several interesting reports of how complexation affects bioactivity and/or biodistribution.^{11,14–16,20,11,14–16,20} Therefore, we were interested in investigating the formation of a supramolecular complex between Mel and CB[n]s and if this process would stabilize it, as it has been shown for several other drugs,²¹ while maintaining its alkylating activity and cytotoxic effects. For this study, we chose cucurbit[7]uril

Received: June 13, 2018

Accepted: July 18, 2018

Published: July 26, 2018

(CB[7]), which has a cavity size comparable to that of β -cyclodextrin, and it has been shown to encapsulate phenylalanine,^{22,23} which is structurally related to Mel.

2. RESULTS AND DISCUSSION

Absorption spectra of Mel in the absence and presence of increasing concentrations of CB[7] show a marked decrease in the absorption band at 260 nm (Figure 1), which is consistent

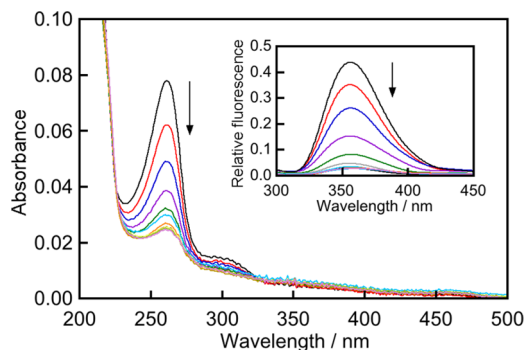


Figure 1. Absorption and fluorescence emission spectra of Mel (16 μM) upon addition of CB[7] (0–45 μM) in 0.1 M HCl. Inset: fluorescence emission spectra of the same samples.

with the encapsulation of the drug. It must be noted that these changes were observed at pH 1 (0.1 M HCl) and no such changes were observed at pH 7 (see Figure S1 in the Supporting Information). These results indicate that the protonation state of Mel is essential for binding. Mel possesses three pK_a for 2-chloroethylamino, α -carboxylic, and α -amino groups of 1.42, 2.75, and 9.17, respectively.²⁴ Because binding was observed only at pH 1, the protonation of the 2-chloroethylamino and α -amino groups seems to be essential for a strong binding to the macrocycle. This observation is consistent with previous reports about the cation–dipole interactions between the guest and CB[n] portals, which are lined with carbonyl groups.^{21,23,25} It is important to note that this interaction with the portals could lead to pK_a shifts when the drug is encapsulated inside CB[n]s,^{26–28} which was not evaluated in this work. The fact that there is no appreciable binding at pH 7 (zwitterionic species) could be related to a destabilization of the complex because of repulsive interactions with the negative charge density of the carbonyl groups at the portals of CB[7].

Fluorescence emission spectra also showed a noticeable decrease in intensity as the concentration of CB[7] in the sample increased (Figure 1, inset), which further supports that the formation of an inclusion complex with CB[7] is taking place.

The binding constant for the Mel@CB[7] complex obtained from the fluorescence titrations was $(1.7 \pm 0.7) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Figure 2). The value for the binding constant with CB[7] is fairly high and falls within the range reported for several benzimidazol-derived drugs.¹² This binding constant (K_{11}) can be related to the solubilizing capacity of the macrocycle by a phase-solubility diagram ([drug] vs [macrocycle]) assuming a 1:1 binding, as depicted by eq 1. S_0 refers to the intrinsic solubility of the drug, whereas the slope is obtained from the linear fit of the data.²⁹

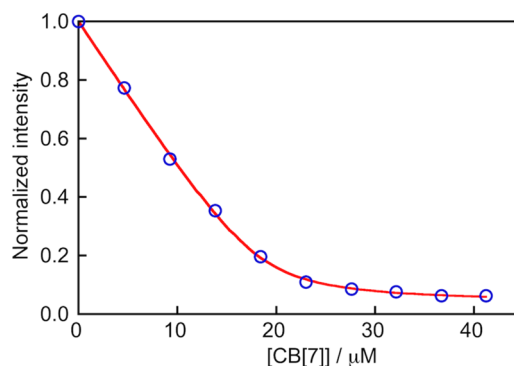


Figure 2. Binding isotherm for Mel (20 μM) with CB[7] (0–45 μM) in 0.1 M HCl at 25 $^{\circ}\text{C}$. The data was fitted to a 1:1 binding model using numerical analysis.^{31,32}

$$K_{11} = \frac{\text{slope}}{S_0(1 - \text{slope})} \quad (1)$$

The solubility of Mel hydrochloride is reported to be 3.11 mg mL^{-1} ;³⁰ thus, considering the K_{11} obtained for CB[7] in this work, the simulated slope would be unity. This means that CB[7] is a very good solubilizing agent for Mel and it is close to the slopes reported for acyclic CB[n]s (0.81–1.2).¹⁷ In comparison, (SBE)_{7m}- β -CD (Captisol), which possesses a binding constant of 142.7 M^{-1} with Mel (from phase-solubility diagram), has a simulated slope of 0.6.³⁰

The inclusion of Mel inside the cavity of CB[7] is further supported by the ^1H NMR spectra (Figure 3), which show strong downfield shifts for Mel aromatic hydrogens, whereas the signals for the α -carbon hydrogen and the 2-chloroethyl protons are not changed (see Figures S2 and S3 in the Supporting Information for the assignment). Residual peaks from the solvent at around 3.2 ppm prevent the observation of the hydrogens of the methylene group; however, it is clear from the spectra that the aromatic ring is placed inside the cavity, whereas the rest of the molecule sits outside of the macrocycle.

This inclusion mode is consistent with molecular docking studies, which show the preferential inclusion of the aromatic portion of the molecule inside CB[7], with the 2-chloroethylamino group and the α -carbon groups sticking out through the portals (Figure 4). The complex shows favorable binding energy ($-5.64 \text{ kcal mol}^{-1}$), which is in line with the high binding constant determined experimentally. It must be emphasized that the value of the binding energy is relative and cannot be correlated directly with the value of the binding constant. However, it is a good indication that the complex is fairly stable. The simulations show that the complex is stabilized by three hydrogen bonds with the carbonyl groups (Figure 4); although hydrophobic interactions and cation–dipole interactions between the protonated amino groups and the portals are certainly contributing to the binding. The docking studies show that the formation of the complex is less favorable at pH 7 than at pH 1 (see Figure S4 in the Supporting Information), but weak interactions in solution cannot be completely ruled out.

Because solvation can largely affect the formation of the complex and its conformation over time, molecular dynamics (MD) simulations were performed for 10 ns to assess the stability of the complex (Figure 5). The results show that Mel remains inside the cavity of CB[7] for the duration of the

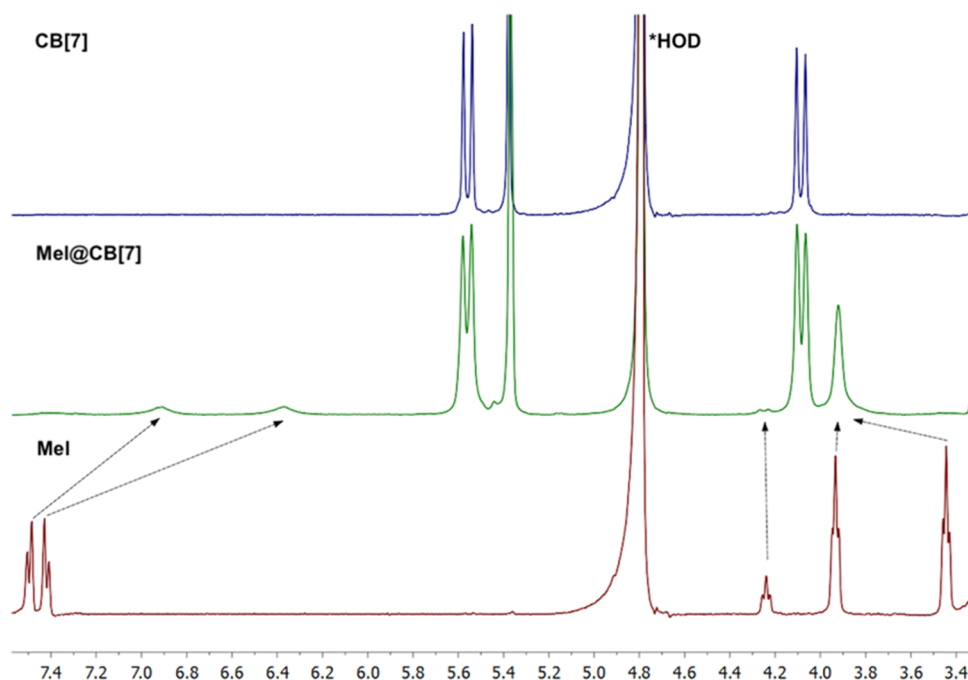


Figure 3. ^1H NMR spectra of Mel, CB[7], and Mel@CB[7] complex (1 equiv of CB[7]) in $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$ (1:20).

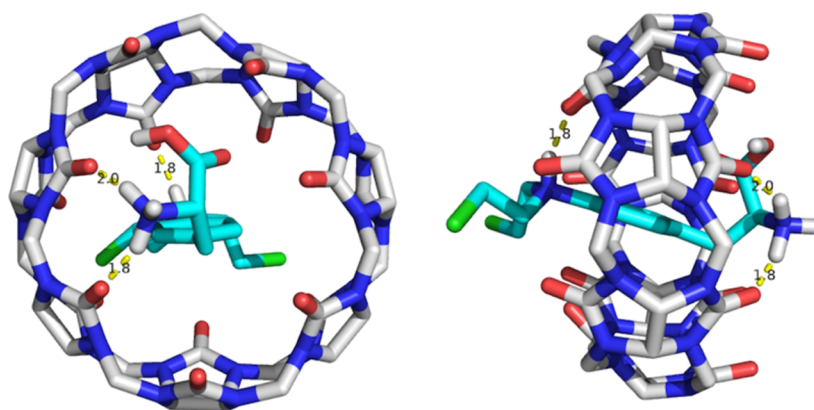


Figure 4. Simulated structure for the Mel@CB[7] complex from docking studies. Color code for Mel atoms: C, cyan; O, red; N, blue; and H, gray. The structure of Mel corresponds to the fully protonated form at pH 1. Hydrogen bonds are indicated in the figure.

simulation and that at least one hydrogen bond is retained throughout the entire time, with sporadic additional hydrogen bonds being formed. It is interesting to note that the conformation of the complex changes very little during the simulation and that the 2-chloroethylamino group is always positioned at the rim of CB[7]. This conformation would maintain the alkylating activity of Mel because this group is responsible for the alkylation of DNA bases.³

Alkylating activity is essential for Mel chemotherapeutic effect. Therefore, we tested if the complexation of Mel by CB[7] altered such property by following the generation of a colored product at 545 nm after reaction with 4-(4-nitrobenzyl)pyridine (NBP), which is based on the alkylation of the pyridine moiety of the reagent giving a chromophore product at basic pH.³³ The results in Figure 6 show that there is a slight decrease in the relative alkylating activity of Mel when included inside the cavity of CB[7]; however, this effect is minor. These results agree with the binding mode discussed above from NMR, docking studies, and MD simulations, where the 2-chloroethylamino group is located on the outside of the

macrocycle, protruding through one of the portals. Therefore, alkylating activity is roughly maintained.

The main problem that Mel has as a drug is its instability in aqueous media due to rapid hydrolysis at neutral pH.^{24,34,35} Evomela is reported to be stable for 1 h after reconstitution at room temperature.^{8,36} To assess if complexation within CB[7] protected the drug from hydrolysis, we performed a series of experiments where Mel was incubated at physiological temperature, and subsequently hydrolysis products were quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) based on previous reports from the literature.^{24,35,37} In the case of the CB[7] complex, before the analysis, Mel was released from CB[7] using adamantylamine (ADA) as a competitor due to its high binding constant ($1.2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$).³⁸ Release from the macrocycle is necessary for quantification because the extinction coefficient of the complex is lower than that for free Mel as shown in Figure 1. In these experiments, it is also important to consider that Mel will hydrolyze somewhat during sample preparation and during the HPLC run. Therefore, control experiments were performed for

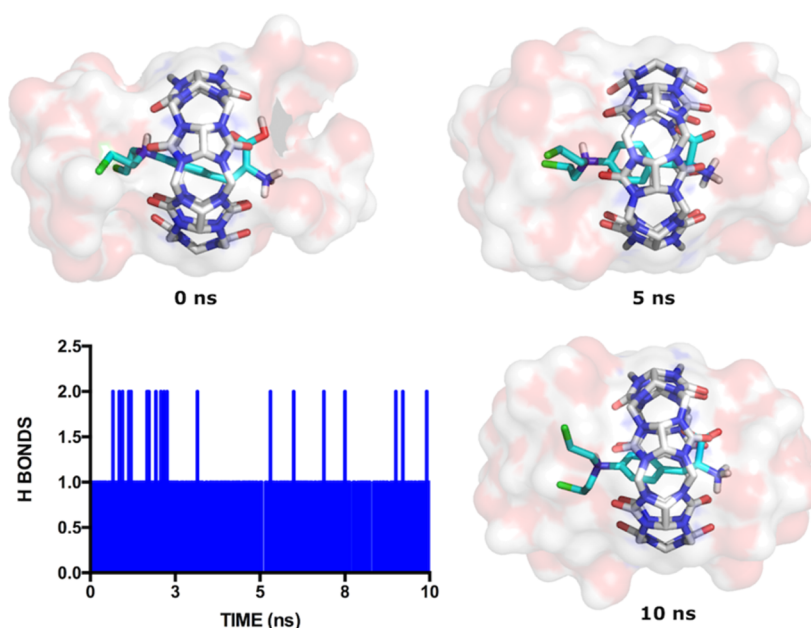


Figure 5. MD simulations for the Mel@CB[7] complex at 0 and 10 ns. Color code for Mel: C, cyan; O, red; N, blue; and H, gray. The structure of Mel corresponds to the fully protonated form at pH 1.

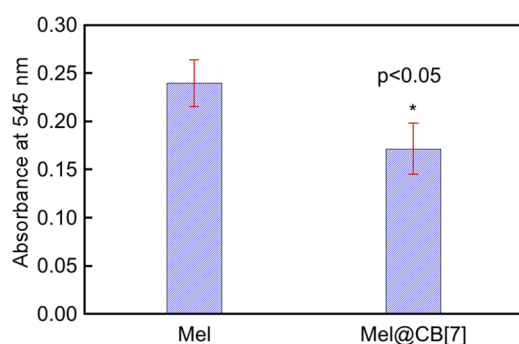


Figure 6. Alkylating activity measured as the absorbance at 545 nm for the NBP assay. Samples corresponded to Mel (200 μ M) in the absence or presence of 1.5 equiv of CB[7].

nonincubated samples and the small amounts of hydrolyzed products detected were subtracted from the incubated samples (see Figures S5 and S6 in the Supporting Information). Loss of the chlorine atoms leads to their replacement by hydroxyl groups. Therefore, there are two main hydrolysis products, the monohydroxy (MOH) and the dihydroxy (DOH) derivatives of Mel,^{24,39} though other products have been identified by mass spectrometry (MS).³⁵ The chromatogram in Figure 7 corresponds to a representative experiment, which shows that Mel incubation produces a single hydrolysis product with a retention time of 3.6 min. This product is the same for Mel or the Mel@CB[7] complex and was attributed to the MOH derivative based on mass spectral analysis (see Figures S7 and S8 in the Supporting Information). Note that the DOH derivative can be detected by MS but at a relatively low abundance, indicating that it is a minor product. Comparisons of the integrated areas of the chromatogram peaks for Mel and MOH yielded a hydrolysis ratio of $15.7 \pm 2.5\%$ for Mel and $11.8 \pm 2.7\%$ for Mel@CB[7]. These two values are the same within error, indicating that CB[7] complexation does not protect Mel from hydrolysis. It is noteworthy that Mel hydrolysis is strongly pH-dependent and higher rates of

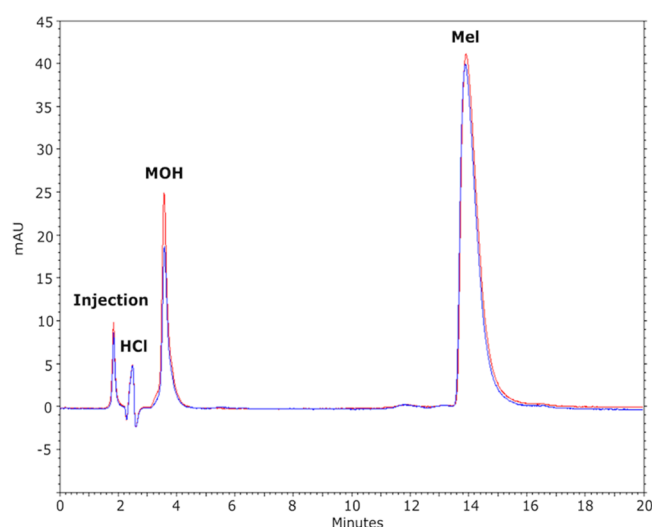


Figure 7. HPLC chromatograms for 100 μ M Mel (red line) and 100 μ M Mel@CB[7] (blue line) incubated for 3 h at 37 $^{\circ}$ C in 0.1 M HCl. Hydrolysis product labeled as MOH.

hydrolysis are observed at neutral or basic pH.^{24,39} This behavior is consistent with the proposed mechanism of hydrolysis, involving a nucleophilic attack of the unprotonated amino group toward one of the chlorine-bearing carbon atoms.^{24,39} The results obtained herein are in line with previous discussions about the binding mode within CB[7]; thus, the exposure of the 2-chloroethylamino group to the solvent does not change its reactivity toward hydrolysis. This is different than previously reported slowing of the rate of hydrolysis by Captisol because in that case the 2-chloroethylamino group is embedded within the hydrophobic cavity of the macrocycle,³⁰ and this is clearly a limitation for the CB[7] complex. Although hydrolysis is not prevented, alkylating activity was almost unmodified, which is still a good antecedent for its therapeutic action.

Finally, the cytotoxicity of Mel and Mel@CB[7] complex was assessed in human leukemia cell line (HL-60) as a model for its therapeutic action. The cytotoxicity assays shown in Figure 8 revealed that there is no significant difference between

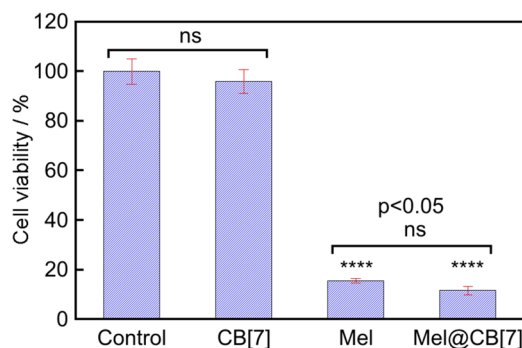


Figure 8. HL-60 cell viability assay with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) after 24 h incubation with either Mel or Mel@CB[7]. Control sample in the absence of Mel and samples containing 200 μ M Mel, 200 μ M CB[7], and 200 μ M Mel@CB[7] complex.

the efficacies of Mel and its CB[7] complex in inducing cancer cell death. Samples in the presence of only CB[7] showed no cytotoxicity, as reported for several cell lines.^{13,18} It is important to emphasize that even when the alkylating activity was slightly decreased and its hydrolysis was not prevented, the Mel@CB[7] complex performs as well as the drug by itself, but CB[7] encapsulation offers enhanced solubility. One can speculate that because the binding of Mel to CB[7] was observed only at acidic pH and not at pH 7, encapsulation could help improve drug delivery for an oral formulation of Mel, as the drug would be released after passing through the stomach.

3. CONCLUSIONS

Mel was effectively encapsulated inside CB[7], which was demonstrated by changes in the absorption and fluorescence spectra, NMR, docking studies, and MD simulations. The binding mode corresponded to the inclusion of the aromatic ring inside the cavity, whereas the α -amino, α -carboxylic, and 2-chloroethylamino groups protruded through the portals. Stabilization of the complex was due to a combination of hydrogen bonding, hydrophobic interactions, and cation–dipole interactions. The protonation state of Mel was fundamental for the binding, being observed experimentally only for the fully protonated form at pH 1. It must be emphasized that Mel hydrochloride is viable for an injectable formulation (Alkeran). Encapsulation of Mel inside CB[7] could hold promise for oral intake, where the complex might be stabilized. The formation of the Mel@CB[7] inclusion complex showed a slight decrease for the alkylation activity, but the cytotoxicity was not affected, as shown for the HL-60 cell line. On the other hand, hydrolysis was not prevented as shown for the encapsulation of Mel in the β -cyclodextrin derivative (Evomela), and this is proposed to be due to the binding mode within the macrocycle. In CB[7], the aromatic ring is inside the cavity of the macrocycle with the 2-chloroethylamino group placed outside of the cavity, whereas for the β -cyclodextrin derivative, this group remains inside the cavity, slowing down hydrolysis.

4. EXPERIMENTAL SECTION

4.1. Chemicals. Melphalan (Mel), cucurbit[7]uril (CB[7]), adamantylamine (ADA), and bis(cyclopentadienyl) cobalt(III) hexafluorophosphate (Cob⁺) were obtained from Sigma and used without further purification. Hydrochloric acid (37%), formic acid (100%), acetic acid (100%), sodium acetate, and sodium phosphate salts were obtained from Merck. 4-(4-Nitrobenzyl)pyridine (NBP) was obtained from Chem-Impex International. Ultrapure water from a Milli-Q water purifying system was used to prepare all of the solutions (resistivity of 18.2 M Ω cm).

4.2. Sample Preparation. Stock solutions of Mel (1 mg mL⁻¹) were prepared by dissolving the drug in ethanol/HCl solution (99:1). Diluted samples were prepared in 0.1 M HCl (pH = 1) or 10 mM phosphate buffer, pH 7 (pH meter Hanna HI2221). Final concentrations were determined by their UV–vis absorption spectra using a molar extinction coefficient of $(4.9 \pm 0.2) \times 10^3$ M⁻¹ cm⁻¹ at 260 nm in 0.1 M HCl, which was determined in this work.

Stock solutions of CB[7] were prepared in water ($\approx$ 1 mM) and titrated against a known concentration of Cob⁺ by UV–vis spectroscopy according to the method reported in the literature.⁴⁰ ADA stock solutions (10 mM) were prepared in water.

4.3. Absorption and Fluorescence Measurements. The association of Mel (16 μ M) to CB[7] (0–50 μ M) was measured by absorption and fluorescence spectroscopy. Absorption was measured on a HP8453 spectrophotometer using 1 cm pathlength cuvettes. Fluorescence emission spectra were obtained by exciting the samples at 260 nm (5 nm bandwidth) using a LS55 PerkinElmer fluorimeter. The temperature was kept at 25 $^{\circ}$ C using a waterbath. Binding isotherms built from the fluorescence data were adjusted using numerical analysis as reported previously.^{31,32}

4.4. NMR Measurements. Mel (2.5 mg) was dissolved in 500 μ L of DCl/D₂O (1:20) with the aid of sonication in the absence or presence of 1 equiv of CB[7]. The NMR spectra were obtained using a Bruker Avance III HD instrument working at 400 MHz.

4.5. Structure Optimization and Molecular Docking. Mel in different protonation states and CB[7] were constructed using Gaussian 03⁴¹ and optimized using the B3LYP method and 6-31G** base set.⁵ The partial charges of the compounds were corrected using ESP methodology. Topology and parameters for all structures were obtained using the SwissParam server.⁴²

Molecular dockings of Mel inside CB[7] were carried out using AutoDock 4.0 suite software.⁴³ The grid maps were calculated using the autogrid4 subprogram and were located in the center of CB[7]. The volumes for the grid maps were 70 $\times$ 70 $\times$ 70 points with a grid-point spacing of 0.375 $\text{\AA}$. The autotors option was used to define the rotating bonds in the ligand. The following parameters were employed in the Lamarckian genetic algorithm dockings: initial population of 1500 random individuals with a population size of 150 individuals; 2.5×10^6 energy evaluations, a maximum number of 27 000 generations, a mutation rate of 0.02, and a cross-over rate of 0.80. The docked complexes were built picking the lowest docked-energy binding positions with a relatively high number of conformations.

4.6. Molecular Dynamics Simulations. Mel@CB[7] complexes in different protonation states were solvated by a

TIP3 water model and submitted for 10 ns MD simulations using an NPT ensemble. The calculations were performed using NAMD 2.6 software.⁴⁴ Periodic boundary conditions were applied to the systems in the three coordinate directions. A pressure of 1 atm and a temperature of 298 K were maintained throughout the simulations.

4.7. Alkylating Activity. The alkylation induced by Mel was measured according to a protocol reported in the literature.³³ Briefly, 5 mL of 200 μ M Mel in 0.2 M acetate buffer, pH 5, were mixed with 1.5 mL of a 10% NBP solution in methanol and the mixture was incubated at 100 °C for 30 min. The same procedure was adopted for a sample containing Mel and 1.5 equiv of CB[7]. Control experiments at pH 1 yielded the same results. After cooling for 15 min, the product was extracted with 3 mL of chloroform, and then 3 mL of 3 M NaOH was added and the sample was vortexed thoroughly. After centrifugation at 1500 rpm, the absorbance of the chloroform layer was measured at 545 nm. The experiments were performed in triplicate.

4.8. Hydrolysis. The measurement of the hydrolysis degree of Mel was adapted from previously reported methods.^{24,35,37} Mel (100 μ M) in 0.1 M HCl was incubated at 37 °C for 3 h in the absence or presence of 1 equiv of CB[7]. After incubation, ADA (200 μ M) was added to the samples containing CB[7] to release Mel from the macrocycle. Hydrolysis products were measured on a Hitachi Elite LaChrom HPLC system using an isocratic mobile phase of acetonitrile and 0.1% formic acid in water (32:68), RP-18 endcapped column (5 μ m, 250 $\times$ 4 mm², Merck), 1 mL min⁻¹ flow, and 260 nm for the detection wavelength (L-2455 diode array detector). Control experiments with nonincubated samples were performed to take into account the hydrolysis of Mel during the analysis (preparation and HPLC column run), and the small amounts of hydrolyzed products detected were subtracted from the incubated samples.

4.9. Cytotoxicity Assay. HL-60 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic/antimycotic in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. Cells were seeded in 96-well plates at a density 3 $\times$ 10⁵ cells/well. Mel or Mel@CB[7] were added at a final concentration of 200 μ M and incubated for 24 h. After the treatment, cell viability was determined by the MTT assay (10% v/v of 5 mg mL⁻¹ MTT solution was added to each well and incubated for 2 h). Then, the formazan crystals formed by the reaction between metabolically active cells and MTT were dissolved by adding a solution of 10% sodium dodecyl sulfate in 0.01 M HCl into each well. The plate was left overnight in an incubator to finally read its absorbance at 570 nm using a Biotek Synergy HT microplate reader.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsomega.8b01335.

Absorption spectra, NMR spectra, docking studies at pH 7, HPLC chromatograms, and mass spectra (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: dlffuente@uc.cl.

ORCID

Denis Fuentealba: 0000-0003-4798-7204

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank CONICYT for the financial support through their FONDECYT research program (grant no. 1160443). Also, we would like to thank FONDECYT grant no. 1161375 that supported the computational calculations. J.R.-D. thanks CONICYT-PCHA/Doctorado Nacional/2015-21150894. We thank Prof. Verónica Arancibia for her kind access to their HPLC instrumentation. We also thank Pablo Barrias and CONICYT FONDEQUIP/UHPLC MS/MS EQM 120065 for mass spectrometry analysis.

■ REFERENCES

- (1) Falco, P.; Bringham, S.; Avonto, I.; Gay, F.; Morabito, F.; Boccadoro, M.; Palumbo, A. Melphalan and its role in the management of patients with multiple myeloma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2007**, *7*, 945–957.
- (2) Samuels, B. L.; Bitran, J. D. High-dose intravenous melphalan - A review. *J. Clin. Oncol.* **1995**, *13*, 1786–1799.
- (3) Kohn, K. W.; Hartley, J. A.; Mattes, W. B. Mechanisms of DNA-sequence selective alkylation of guanine-N7 positions by nitrogen mustards. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 1799–1800.
- (4) Hartley, J. A.; Bingham, J. P.; Souhami, R. L. DNA-Sequence Selectivity of guanine-N7 alkylation by nitrogen mustards is preserved in intact cells. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3175–3178.
- (5) Polavarapu, A.; Stillabower, J. A.; Stubblefield, S. G. W.; Taylor, W. M.; Baik, M. H. The mechanism of guanine alkylation by nitrogen mustards: a computational study. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, S914–S921.
- (6) Schneider, H.-J. *Supramolecular Systems in Biomedical Fields*; Royal Society of Chemistry, 2013.
- (7) Zhang, J.; Ma, P. X. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 1215–1233.
- (8) Spectrum Pharmaceuticals, Inc. EVOMELA (accessed May 23).
- (9) Saleh, N.; Ghosh, I.; Nau, W. M. Cucurbiturils in Drug Delivery and for Biomedical Applications. In *Supramolecular Systems in Biomedical Fields*; Schneider, H.-J., Ed.; Royal Society of Chemistry, 2013; pp 164–212.
- (10) Walker, S.; Oun, R.; McInnes, F. J.; Wheate, N. J. The potential of cucurbit[n]urils in drug delivery. *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 616–624.
- (11) Yin, H.; Wang, R. B. Applications of cucurbit[n]urils ($n = 7$ or 8) in pharmaceutical sciences and complexation of biomolecules. *Isr. J. Chem.* **2018**, *58*, 188–198.
- (12) Macartney, D. H. Encapsulation of drug molecules by cucurbiturils: effects on their chemical properties in aqueous solution. *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 600–615.
- (13) Uzunova, V. D.; Cullinane, C.; Brix, K.; Nau, W. M.; Day, A. I. Toxicity of cucurbit[7]uril and cucurbit[8]uril: an exploratory in vitro and in vivo study. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2037–2042.
- (14) Oun, R.; Floriano, R. S.; Isaacs, L.; Rowan, E. G.; Wheate, N. J. The ex vivo neurotoxic, myotoxic and cardiotoxic activity of cucurbituril-based macrocyclic drug delivery vehicles. *Toxicol. Res.* **2014**, *3*, 447–455.
- (15) Chen, H.; Chan, J. Y. W.; Yang, X.; Wyman, I. W.; Bardelang, D.; Macartney, D. H.; Lee, S. M. Y.; Wang, R. Developmental and organ-specific toxicity of cucurbit[7]uril: in vivo study on zebrafish models. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 30067–30074.

- (16) Zhang, X.; Xu, X.; Li, S.; Wang, L.-H.; Zhang, J.; Wang, R. A systematic evaluation of the biocompatibility of cucurbit[7]uril in mice. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, No. 8819.
- (17) Zhang, B.; Isaacs, L. Acyclic cucurbit[n]uril-type molecular containers: influence of aromatic walls on their function as solubilizing excipients for insoluble drugs. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9554–9563.
- (18) Hettiarachchi, G.; Nguyen, D.; Wu, J.; Lucas, D.; Ma, D.; Isaacs, L.; Briken, V. Toxicology and drug delivery by cucurbit[n]uril type molecular containers. *PLoS One* **2010**, *5*, No. e10514.
- (19) Plumb, J. A.; Venugopal, B.; Oun, R.; Gomez-Roman, N.; Kawazoe, Y.; Venkataramanan, N. S.; Wheate, N. J. Cucurbit[7]uril encapsulated cisplatin overcomes cisplatin resistance via a pharmacokinetic effect. *Metallomics* **2012**, *4*, 561–567.
- (20) Li, F.; Gorle, A. K.; Ranson, M.; Vine, K. L.; Kinobe, R.; Feterl, M.; Warner, J. M.; Keene, F. R.; Collins, J. G.; Day, A. I. Probing the pharmacokinetics of cucurbit[7, 8 and 10]uril: and a dinuclear ruthenium antimicrobial complex encapsulated in cucurbit[10]uril. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 4172–4179.
- (21) Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L. The cucurbit[n]uril family. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844–4870.
- (22) Rekharsky, M. V.; Mori, T.; Yang, C.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; Kim, H.; Sobransingh, D.; Kaifer, A. E.; Liu, S. M.; Isaacs, L.; Chen, W.; Moghaddam, S.; Gilson, M. K.; Kim, K. M.; Inoue, Y. A synthetic host-guest system achieves avidin-biotin affinity by overcoming enthalpy-entropy compensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 20737–20742.
- (23) Liu, S. M.; Ruspic, C.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Zavalij, P. Y.; Isaacs, L. The cucurbit[n]uril family: prime components for self-sorting systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15959–15967.
- (24) Stout, S. A.; Riley, C. M. The hydrolysis of L-phenylalanine mustard (melphalan). *Int. J. Pharm.* **1985**, *24*, 193–208.
- (25) Assaf, K. I.; Nau, W. M. Cucurbiturils: from synthesis to high-affinity binding and catalysis. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 394–418.
- (26) Mohanty, J.; Bhasikuttan, A. C.; Nau, W. M.; Pal, H. Host-guest complexation of neutral red with macrocyclic host molecules: contrasting pK_a shifts and binding affinities for cucurbit[7]uril and beta-cyclodextrin. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 5132–5138.
- (27) Koner, A. L.; Nau, W. M. Cucurbituril encapsulation of fluorescent dyes. *Supramol. Chem.* **2007**, *19*, 55–66.
- (28) Saleh, N.; Koner, A. L.; Nau, W. M. Activation and stabilization of drugs by supramolecular pK_a shifts: drug-delivery applications tailored for cucurbiturils. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 5398–5401.
- (29) Higuchi, T.; Connors, K. A. *Phase-Solubility Techniques*; Wiley-Interscience: New York, 1965; Vol. 4.
- (30) Ma, D. Q.; Rajewski, R. A.; Velde, D. V.; Stella, V. J. Comparative effects of (SBE) $_{7m}$ - β -CD and HP- β -CD on the stability of two anti-neoplastic agents, melphalan and carmustine. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 275–287.
- (31) Tang, H.; Fuentealba, D.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; Kim, K.; Bohne, C. Guest binding dynamics with cucurbit[7]uril in the presence of cations. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20623–20633.
- (32) Scholtbach, K.; Venegas, I.; Bohne, C.; Fuentealba, D. Time-resolved fluorescence anisotropy as a tool to study guest-cucurbit[n]uril-protein ternary supramolecular interactions. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 842–852.
- (33) Dierickx, K. M. E.; Journe, F.; Gerbaux, P.; Morandini, R.; Kauffmann, J.-M.; Ghanem, G. E. Improving the spectrophotometric determination of the alkylating activity of anticancer agents: a new insight into the mechanism of the NBP method. *Talanta* **2009**, *77*, 1370–1375.
- (34) De Boeck, G.; Van Cauwenberghe, K.; Eggermont, A. M. M.; Van Oosterom, A. T.; de Bruijn, E. A. Determination of melphalan and hydrolysis products in body fluids by GC-MS. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1997**, *20*, 697–700.
- (35) Boschmans, J.; de Bruijn, E.; Van Schil, P.; Lemièr, F. Analysis of novel melphalan hydrolysis products formed under isolated lung perfusion conditions using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 835–841.
- (36) Singh, R.; Chen, J.; Miller, T.; Bergren, M.; Mallik, R. Solution stability of Captisol-stabilized melphalan (Evomela) versus propylene glycol-based melphalan hydrochloride injection. *Pharm. Dev. Technol.* **2016**, 1–6.
- (37) Pinguet, F.; Joulia, J. M.; Martel, P.; Grosse, P. Y.; Astre, C.; Bressolle, F. High-performance liquid chromatographic assay for melphalan in human plasma - application to pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **1996**, *686*, 43–49.
- (38) Vázquez, J.; Remón, P.; Dsouza, R. N.; Lazar, A. I.; Arteaga, J. F.; Nau, W. M.; Pischel, U. A simple assay for quality binders to cucurbiturils. *Chem. – Eur. J.* **2014**, *20*, 9897–9901.
- (39) Stout, S. A.; Riley, C. M. Hydrolysis of L-phenylalanine mustard (melphalan). 2. Further observations on the effects of pH, chloride ions and buffers on the rate of reaction. *Int. J. Pharm.* **1987**, *37*, 257–264.
- (40) Yi, S.; Kaifer, A. E. Determination of the purity of cucurbit[n]uril ($n = 7, 8$) Host Samples. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 10275–10278.
- (41) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, Revision C.02; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.
- (42) Zoete, V.; Cuendet, M. A.; Grosdidier, A.; Michielin, O. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 2359–2368.
- (43) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- (44) Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kale, L.; Schulten, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781–1802.