

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Complejos de Ru(II) con 2,2'-biimidazol para sensores
químicos luminiscentes y fotosensibilización de especies
reactivas de oxígeno (ROS)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Quílez Alburquerque

Directores

Guillermo Orellana Moraleda
Ana Belén Descalzo López

Madrid

© José Quílez Alburquerque, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica



TESIS DOCTORAL

**Complejos de Ru(II) con 2,2'-biimidazol para sensores
químicos luminiscentes y fotosensibilización de especies
reactivas de oxígeno (ROS)**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

José Quílez Alburquerque

Directores

Guillermo Orellana Moraleda

Ana Belén Descalzo López

Madrid, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica



**Complejos de Ru(II) con 2,2'-biimidazol para sensores
químicos luminiscentes y fotosensibilización de especies
reactivas de oxígeno (ROS)**

TESIS DOCTORAL QUE PRESENTA

José Quílez Alburquerque

Directores

Guillermo Orellana Moraleda

Ana Belén Descalzo López

Madrid, 2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, el Prof. Guillermo Orellana y la Prof. Ana Belén Descalzo. Gracias a los dos por haber confiado en mí desde el primer momento, por valorarme y haberme dedicado vuestro tiempo. Gracias por todas las discusiones sobre ciencia que hemos tenido, por despertar mi lado crítico, por empujarme a buscar explicación y soluciones a cualquier problema que pueda encontrarme. Siempre me he sentido muy respaldado por ambos, y eso me ha hecho crecer exponencialmente desde el punto de vista personal y científico. Me siento muy afortunado de haber realizado mi tesis doctoral en el Grupo de Sensores Químicos Ópticos y Fotoquímica Aplicada (GSOLFA).

Me gustaría agradecer a cada uno de los miembros que forman y que han formado parte del GSOLFA. En primer lugar, agradecer a las profesoras María del Cruz Moreno Bondi y Elena Benito Peña por su acogida y su apoyo incondicional. También al Prof. Francisco Amaro Torres por la intensa estancia en su laboratorio, gracias por ayudarme en esta última etapa, por darme apoyo y enseñarme una pequeña parte del mundo de la microbiología. Agradecer también la enorme labor de Nuria Martín y Beatriz Bedoya, siempre dispuestas a ayudar en todo lo que se pueda con una gran sonrisa.

Siguiendo el orden cronológico de mi tesis, me gustaría agradecer a cada uno de los compañeros de laboratorio, o mejor dicho amigos, que forman o han formado parte del grupo. Primero a los doctores Idoia Urriza Arsuaga y José Ángel de la Torre (PQM), vosotros habéis sido la base de mis primeros años de doctorado. Gracias por ayudarme tanto a establecerme en el grupo, por cada una de las sonrisas, cantes o bailes en el laboratorio, por las cervezas de los viernes o por animarme como nadie sabe cuando algo sale mal. Siempre recordaré esos momentos en el laboratorio como los mejores de mi tesis. Pero ellos no caminaban solos... gracias a la Dra. Lidia Nazaret por tu alegría y buena vibra. Agradecer también a la parte analítica del grupo, la Dra. Riikka Peltomaa, Dr. Alberto Rico Yuste, Bettina Glahn, Fernando Pradanas y Álvaro Luque Uría, gracias por resolverme todas mis dudas analíticas con gran eficacia. De este pequeño grupo, me gustaría destacar a mi análogo de beca FPI (Álvaro). Creo que hemos crecido mucho como personas durante estos años de contrato, hemos sabido escucharnos, entendernos y apoyarnos en todo momento. Me gusta la idea de haber empezado y terminado al mismo tiempo. También me gustaría agradecer la ayuda y el apoyo de Mar Darder durante todo este tiempo. Otra etapa muy importante dentro del grupo fue cuando David Martín, Dra. Cristina Serrano y Luis Calahorra llegaron y me rescataron de las tinieblas (vosotros ya sabéis...). Gracias a David, por todas las risas que hemos pasado, por las mil y una anécdotas que tenemos o por haberme ayudado tanto cuando estaba inválido en casa. Gracias a Cristina por todas las conversaciones que hemos mantenido en la cuarta (acumulando mal karma), por

ayudarme siempre, sin dudar, y por ser transparente en todo momento. Gracias a Luis por traer frescura al grupo, por las cervezas y bravas de los viernes, por los cafés de la conspiración y por siempre seguirme las bromas. A mediados de esta segunda etapa se incorporó también una de las personas más naturales y espontáneas que he conocido, mi hermana Tamara Moya. Gracias Tamara por entenderme a la perfección, por comunicarnos sin necesidad de hablar, por los bailes improvisados, por seguir mis locuras y yo seguir las tuyas. Te mereces todo lo bueno que pueda pasar y yo espero estar ahí para celebrar tus logros! Para finalizar la segunda etapa de mi tesis, me gustaría agradecer a Inés López Martínez, Elisa Monedero y Juanjo. Gracias Inés por ser una estudiante ejemplar (la niña rata original), siento orgullo de todo lo que has conseguido y de haber podido formar parte de tu camino. Gracias a Elisa por ser mi confidente y siempre poder entablar una conversación profunda y amena. Agradecer a Juanjo por aportar su punto de vista al grupo, siempre nos unirá la RAFT. En la última etapa, se han incorporado un grupo de personas con un aura muy positiva, Dra. María Ariza Avidad, Ya Jie Knöbl y Andrea Montón Vicente. Gracias a las tres por estar siempre dispuestas a todo, con vosotras todo es mucho más fácil. Agradecer a María su trato tan personal (me hace sentir como si fuera su hermano pequeño), su gran capacidad para cuidarte y hacerte sentir cómodo en todo momento. Espero compartir contigo muchas memorias y momentos poéticos y random. A Ya Jie por traer un poco de locura y hacernos practicar inglés. A Andrea por entendernos a base de stickers, por siempre hacerme reír, ya sea rellenando globos felices en el hidrogenador, odiando a Yobin, o por las veces que se te caen los bolis en el laboratorio, siempre recordaré cada anécdota de aquí a Paraguay. Por último, también agradecer a otros miembros del grupo como Miriam Guadaño y Noelia Pérez.

Agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación por la concesión de la ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores (BES-2016-079113) que forma parte del proyecto (CTQ2015-69278-C2-2-R). Así como la ayuda percibida para la realización de estancias breves en centros I+D españoles y extranjeros (BES-C-2016-0013) con el fin de obtener la Mención de Doctor Internacional.

Asimismo, me gustaría agradecer la excelente acogida en tiempos difíciles en el grupo de la Prof. Tayyaba Hasan (Wellman Center for Photomedicine, Harvard Medical School) donde tuve la oportunidad de realizar una estancia predoctoral de 6 meses. Gracias al Dr. Mohammad A. Saad por creer en mí desde el primer minuto y enseñarme en tan pocos meses como funciona el mundo de la terapia fotodinámica.

Agradecer también a los centros de asistencia de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico y Espectrometría de Masas, así como todos los integrantes del departamento de Química Orgánica de la Universidad Complutense de Madrid (Matías Alonso, Marcos Martínez,

Sergio Serrano, Paloma García, Daniel Toledo, Jorge Santos). Con especial mención a la Dra. Paloma García. Gracias Paloma por seguir formando parte de este viaje. Desde que nos conocimos en primero de carrera han pasado unos cuantos años... y después de bajadas y subidas, siento el orgullo de tenerte siempre a mi lado. Me encanta poder hablar contigo de todo, ya sea de nuestras batallitas o de cosas más serias. También agradecer a Sergio por haber sido un gran apoyo durante estos últimos años. Pienso que eres una de las personas más transparentes y con menos maldad que conozco, gracias por ser como eres. Agradecer a Dani su gran disposición a ayudarte y su buen rollo. Por último, agradecer también al servicio de limpieza de la Universidad Complutense de Madrid, con especial mención a Carmen, gracias por tratarme como si fuera uno de tus hijos durante todos estos años.

Agradecer también a mi grupo de amigos de siempre (Mario, Sandra, Alex y Sergio, Víctor y Nuria). Aunque en estos últimos años nos hayamos visto mucho menos, se que siempre estaréis ahí para cualquier cosa que necesite. Me gustaría dar las gracias a mi grupo de amigos de la universidad (Hugo, Sonia, Cobian, Ingrid, Sara, Gema y Alvarito). Hugo y Sonia, siempre he creído que el tiempo pasaba, pero nuestra amistad siempre perduraría, gracias por cada momento a vuestro lado, desde nuestro viaje criminal a Rumanía, pasando por la compra masiva de margaritas en los Ángeles, o los riesgos de quedarnos sin gasolina por Arizona. Todos nuestros viajes siempre estarán conmigo. Gracias Cobian (por correspondencia también agradecer a mi Eli) por siempre seguirme las bromas y por esa complicidad que no se puede explicar. A ti Ingrid por ser siempre mi comodín especial en cualquier plan, me encanta que siempre nos busquemos y apoyemos en todo. Gracias por siempre estar ahí en todo momento, por poder mantener conversaciones sin prejuicios ya sea en los bares de tu “barrio” o en cualquier bar del mundo. A la señorita Sara, por siempre aportar la calma, la razón y por nunca enfadarte. Gracias por abrir esta nueva etapa de gran crecimiento personal para ambos, en la cual siento que puedo apoyarme en ti para cualquier problema que surja. A Gema, por cada uno de tus gritos, por las risas que generamos juntos y por tu tomate del mercadona. A las amistades que hice durante mi estancia en Boston, gracias Sofía por ser una gran roommate, por tu manera de ver la vida siempre alegre y alocada. Gracias también a Paula por ser un gran apoyo allí durante la cuarentena, nunca olvidaré nuestros paseos por el Charles River Esplanade. Y no puedo terminar mis agradecimientos sin mencionar a Roberto, mi gran pilar y mi refugio. Gracias por creer en mí cuando ni yo mismo creía, por siempre sacarme una sonrisa, por aportar equilibrio y hacer de mi tesis un camino más sencillo.

Por último, todo esto no habría sido posible sin el apoyo incondicional de mi familia (mis padres, mi hermano y mi abuela). Gracias por siempre creer en mí, por apoyarme en cada uno de mis pasos, por ayudarme a elegir el camino correcto, por aguantarme y por aportarme los valores que hoy componen esta tesis, esfuerzo y sacrificio. También agradecer a Simba, por ser

el que más ha estado conmigo mientras escribía la tesis, las horas muertas se pasaba a mi lado...
y por supuesto a mi bisabuela Paula, allá donde estés se que estas muy orgullosa de mí.



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	1
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	9
SUMMARY	17
RESUMEN	23
INTRODUCCIÓN	29
1. La fotoquímica y los avances en tecnologías basadas en el empleo de la luz	31
2. Complejos de Ru(II) con ligandos poliazaaromáticos quelantes	32
2.1 Propiedades estructurales y fisicoquímicas	32
2.2 Niveles de energía electrónica	33
2.3 Transiciones electrónicas y estados excitados.....	34
2.3.1 <i>Absorción</i>	34
2.3.2 <i>Luminiscencia</i>	35
2.4 Propiedades electroquímicas	38
2.5 Fotoquímica de los complejos de Ru(II) con el oxígeno molecular	39
2.5.1 <i>Oxígeno singlete</i>	39
2.5.2 <i>Anión superóxido</i>	43
3. Aplicaciones fotoquímicas de los complejos de Ru(II)	46
3.1. Sensores (opto)químicos y polímeros biomiméticos.....	47
3.1.1 <i>Sensores químicos: definición y características</i>	47
3.1.2 <i>Luminiscencia como método de transducción en sensores químicos ópticos</i>	48
3.1.3 <i>Polímeros de impronta molecular (MIPs) como elementos de reconocimiento biomimético en sensores químicos</i>	50
3.1.3.1 <i>Concepto y propiedades</i>	50
3.1.3.2 <i>Formatos físicos de los MIPs</i>	53
3.1.3.3 <i>Aplicaciones de los MIPs</i>	55
3.1.4 <i>Analitos diana: micotoxinas en alimentos</i>	61
3.1.4.1 <i>Ácido tenuazónico (TeA)</i>	64
3.1.4.2 <i>Abundancia y toxicidad del TeA</i>	64
3.1.4.3 <i>Métodos analíticos para la detección del TeA</i>	65
3.1.4.4 <i>MIPs luminiscentes para la detección de TeA: estrategias de diseño</i>	69
3.2 Fotosensibilizadores para la generación de especies reactivas de oxígeno. Oxígeno singlete (1O_2) y anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	70
3.2.1 <i>Aplicaciones del 1O_2 y $O_2^{\cdot-}$ en el ámbito de las terapias fotodinámicas</i>	70
3.2.2 <i>Aplicaciones del 1O_2 en métodos bioanalíticos de detección óptica con amplificación fotoquímica</i>	76
AIM OF RESEARCH	77
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	81
1. Interaction of a 1,3-Dicarbonyl Toxin with Ru(II)-biimidazole Complexes for Luminescence Sensing: a Spectroscopic and Photochemical Experimental Study Rationalized by TD-DFT Calculations	85
2. Luminescent Molecularly Imprinted Polymer Nanocomposites for Emission Intensity and Lifetime Rapid Sensing of Tenuazonic Acid Mycotoxin	125
3. Hyaluronic Acid–Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles with a Ruthenium Photosensitizer Cargo for Photodynamic Therapy of Oral Cancer Cells	159

DISCUSIÓN INTEGRADORA	193
1. Nuevos quelatocomplejos de Ru(II) con 2,2'-biimidazol	195
1.1 Síntesis, purificación y caracterización estructural	195
2. Complejos de Ru(II) como sondas moleculares para el reconocimiento de aniones 1,3-dicetonato	198
2.1 Diseño y síntesis.....	198
2.2 Caracterización espectroscópica	200
2.3 Interacción del ligando 2,2'-biimidazol con el anión tenuazonato	203
3. Desarrollo de MIPs luminiscentes selectivos al TeA basados en complejos de Ru(II)-bim polimerizables	209
3.1 Diseño y síntesis de complejos de Ru(II)-bim polimerizables	209
3.2 Caracterización espectroscópica	212
3.3 Síntesis de MIPs luminiscentes y evaluación de su respuesta al TeA	213
4. Complejos de Ru(II) como fotosensibilizadores para generación de especies reactivas de oxígeno.....	225
4.1 Diseño y síntesis.....	225
4.2 Caracterización espectroscópica	227
4.3. Rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$	230
4.4. Aplicación en terapia fotodinámica.....	243
CONCLUSIONS	253
BIBLIOGRAFÍA	259

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS



FIGURAS

Figura 1. Estructura (pseudo)octaédrica del complejo [bis(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(2,2-biimidazol)]rutenio(II), $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$.	32
Figura 2. Estereoisómeros fac y mer del tris[2-(2-piridil)imidazol]rutenio(II).	33
Figura 3. Esquema simplificado de los orbitales moleculares de un complejo homoléptico de Ru(II) con simetría octaédrica y ligandos de campo fuerte.	34
Figura 4. a) Diagrama simplificado de orbitales moleculares de un complejo homoléptico de Ru(II) donde las flechas representan las transiciones electrónicas de menor energía. b) Espectro de absorción de un complejo de Ru(II) mostrando las bandas de absorción más características.	35
Figura 5. Diagrama de Jablonski de los estados de energía para complejos de Ru(II) con ligandos poliazaaromáticos. Las flechas discontinuas hacen referencia a procesos de desactivación no radiantes.	36
Figura 6. Esquema general de los procesos rédox que tienen lugar en el estado fundamental y en el estado excitado de un complejo homoléptico de Ru(II) con ligandos de campo fuerte.	38
Figura 7. Mecanismo de generación de especies reactivas de oxígeno mediante fotosensibilización promovida por un complejo de rutenio(II).	39
Figura 8. Diagrama de orbitales moleculares del oxígeno molecular en estado fundamental ($^3\text{O}_2$) y del oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$).	40
Figura 9. Diferentes sondas químicas para la detección de $^1\text{O}_2$ (a) 1,3-difenilisobenzofurano o (b) Singlet Oxygen Sensor Green.	43
Figura 10. Diagrama de orbitales moleculares del estado fundamental del oxígeno molecular ($^3\text{O}_2$) y del anión superóxido (O_2^-).	44
Figura 11. Dihidroetidio como sonda específica para la detección del anión superóxido (O_2^-).	44
Figura 12. Componentes de un sensor químico.	47
Figura 13. Esquema general de la preparación de un polímero de impronta molecular (MIP) y las interacciones más características que rigen el tipo de impronta: a) no covalente (fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno, apilamiento π - π); b) no covalente por interacciones electrostáticas; c) (semi)covalente; d) mediada por metales. Pueden darse simultáneamente varias de ellas en la síntesis de un determinado MIP.	51
Figura 14. a) Micrografía SEM de partículas esféricas porosas sintetizadas utilizando un molde sacrificable de sílice. b) Micrografía TEM de partículas núcleo (SiO_2)-coraza(MIP).	55
Figura 15. Principales aplicaciones de los polímeros de impronta molecular (MIPs).	56
Figura 16. Componentes de un monómero trifuncional para la síntesis de un MIP fluorescente. El código de colores (rojo, unidad fluorescente; verde, unidad polimerizable y azul: unidad de reconocimiento) se mantendrá a lo largo de la memoria de tesis.	57
Figura 17. Representación esquemática (no a escala) de la detección de un analito utilizando MIP-QDs donde los QDs son el material de soporte (a) o están incorporados en un núcleo de SiO_2 (b).	58

Figura 18. Estructura química de la micotoxina ácido tenuazónico producida por el hongo <i>Alternaria Alternata</i>	64
Figura 19. Urea y biimidazol como grupos de reconocimientos de oxoaniones (ej. acetato)....	69
Figura 20. a) Mecanismo de la fotosensibilización de O ₂ para la generación de especies reactivas de oxígeno a partir de la activación de un colorante (fotosensibilizador) por absorción de luz de una longitud de onda específica. b) Representación esquemática de las reacciones fotoquímicas más importantes durante la TFD (Sub = substrato biológico; SOD = superóxido dismutasa).	71
Figura 21. Representación esquemática del proceso clínico de la TFD así como la profundidad de penetración de la luz de diferentes longitudes de onda a través de la piel.	72
Figura 22. Estructura química del fotosensibilizador TLD1433 preparado por el grupo de McFarland que actualmente se encuentra en fase clínica para el tratamiento fotodinámico del cáncer de vejiga.....	74
Figura 23. Esquema de la amplificación fotoquímica mediante el empleo de ¹ O ₂ en un bioensayo de proximidad.	76
Figura 24. Esquema general de la síntesis de complejos de Ru(II) heterolépticos con ligandos auxiliares tipo 1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina y como ligando común el 2,2'-biimidazol.	196
Figura 25. Estructura química del ligando libre 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (dmb) y estructura química y tridimensional del complejo heteroléptico [Ru(dmb) ₂ (bim)] ²⁺ (modelizado por ChemBio3D ultra 13.0).....	197
Figura 26. 2,2'-Biimidazol como unidad reconocedora de β-dicetonatos dentro de la esfera de coordinación de los complejos de Ru(II).	199
Figura 27. Estructura química de los complejos de Ru(II) luminiscentes propuestos para el reconocimiento del anión tenuazonato.....	200
Figura 28. Preparación del ácido tenuazónico sintético (como mezcla 81:19 de los epímeros 5S y 5R).....	200
Figura 29. Espectros (normalizados) de absorción UV-Vis y de luminiscencia de los complejos [Ru(phen) ₂ (bim)] ²⁺ (negro, λ _{exc} = 490 nm), [Ru(dcb) ₂ (bim)] ²⁺ (azul, λ _{exc} = 520 nm), [Ru(dab) ₂ (bim)] ²⁺ (naranja, λ _{exc} = 500 nm) y [Ru(s2b) ₂ (bim)] ²⁺ (verde, λ _{exc} = 510 nm) en DMSO. Los espectros de emisión se encuentran corregidos por la respuesta del instrumento.	201
Figura 30. Esquema general de las reacciones de transferencia de protón de un complejo Ru(II)-bim con una especie básica en el estado fundamental y en el excitado.	203
Figura 31. Cambios en a) la absorción en el visible y b) el espectro de luminiscencia (λ _{exc} = 530 nm) para [Ru(dcb) ₂ (bim)] ²⁺ (10.0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹) en DMSO al añadir cantidades crecientes del TeA ⁻ (como sal de TBA).....	204
Figura 32. Esquema de los cambios producidos en la energía de los orbitales moleculares de los complejos de Ru(II) con un ligando bim en su esfera de coordinación, tras la formación del aducto [Ru(NN) ₂ (bim)]-TeA ⁻	204
Figura 33. Espectro de absorción calculado en DMSO para el complejo [Ru(dcb) ₂ (bim)] ²⁺ en ausencia de TeA ⁻ y en presencia de TeA ⁻ considerando o no la transferencia de protón al complejo de Ru(II).	206

- Figura 34.** a) Extinción de la luminiscencia del complejo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ libre (puntos negros) y tras la adición de cantidades crecientes de TeA^- en DMSO ($\lambda_{\text{exc}} = 463 \text{ nm}$; disoluciones equilibradas al aire). b) Contribución relativa de las amplitudes de los términos exponenciales resultantes del ajuste biexponencial de las emisiones en (a) tras la adición de cantidades crecientes de TeA^- ($\tau_1 = 164 \text{ ns}$; $\tau_2 = 68 \text{ ns}$). 207
- Figura 35.** Esquema de síntesis para la preparación de ligandos derivados de la 2,2'-bipiridina con unidades polimerizables tipo alilo (alb) y acrilato (dab). 210
- Figura 36.** Estructura química de los complejos de Ru(II) preparados como monómeros trifuncionales (el ligando bim como unidad de reconocimiento, grupos alílicos o acrilato como unidades polimerizables y el complejo de Ru(II) como sonda luminiscente señalizadora del reconocimiento) para el desarrollo de polímeros de impronta molecular luminiscentes selectivos al ácido tenuazónico. 211
- Figura 37.** Espectro de ^1H -RMN de $[\text{Ru}(\text{alb})_2(\text{bim})]^{2+}$ en CD_3CN (500 MHz). 211
- Figura 38.** Espectros (normalizados) de absorción UV-Vis y de luminiscencia de los complejos $[\text{Ru}(\text{alb})_2(\text{bim})]^{2+}$ (azul, $\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$) y $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ (naranja, $\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) en MeCN. Los espectros de emisión se encuentran corregidos por la respuesta del instrumento. 212
- Figura 39.** Esquema de síntesis de un MIP para TeA empleando el método de impronta no covalente. El monómero funcional utilizado es un complejo de Ru(II) luminiscente con unidades polimerizables y un ligando bim como unidad de reconocimiento. 214
- Figura 40.** Espectro de ^1H -RMN de $[\text{Ru}(\text{alb})_2(\text{bim})]^{2+}$ en CD_3CN (5.7 mmol L^{-1}) tras la adición de sucesivas alícuotas de TeA^- ($0 - 35 \text{ mmol L}^{-1}$). 215
- Figura 41.** Micrografías de SEM de micropartículas porosas de Ru-MIP (a) y Ru-NIP (b). 216
- Figura 42.** Variación de la luminiscencia de las micropartículas porosas MIP (a) y NIP (b) en MeCN (4 mg mL^{-1} , $\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$) tras la adición de tenuazonato (como sal de TBA). c) Cambio de color producido por la interacción entre el complejo de Ru(II) y el TeA en el MIP. 216
- Figura 43.** Micrografías SEM de las nanopartículas de SiO_2 preparadas por el método Stöber. 218
- Figura 44.** Esquema de inmovilización del agente RAFT de polimerización en la superficie de nanopartículas de sílice, previa reacción de silanización. 219
- Figura 45.** Micrografías TEM de las partículas $\text{SiO}_2@$ NIP preparadas en ausencia (a, b) y en presencia de metacrilamida (c, d). 220
- Figura 46.** Micrografías TEM de las partículas $\text{SiO}_2@$ Ru-MIP preparadas con $2.5 \mu\text{moles}$ (a) y $5.0 \mu\text{moles}$ (b) de $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ 221
- Figura 47.** Área bajo la curva de emisión (normalizado con el valor en ausencia de TeA^-) en función de la concentración del TeA^- ; los cuadrados negros corresponden a un $\text{SiO}_2@$ Ru-MIP reutilizado tras un calibrado previo con posterior extracción de la plantilla y los triángulos rojos corresponden al $\text{SiO}_2@$ Ru-NIP, ambos en MeCN- H_2O (95:5 v/v). 222
- Figura 48.** Cambios en el espectro de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) de una suspensión de 1.12 mg mL^{-1} en MeCN- H_2O (95:5 v/v) de $\text{SiO}_2@$ Ru-MIP (a) o de $\text{SiO}_2@$ Ru-NIP (b) tras la adición de concentraciones crecientes de TeA natural. 223

- Figura 49.** Estructura química de los complejos de Ru(II) luminiscentes propuestos como fotosensibilizadores de especies reactivas de oxígeno. 226
- Figura 50.** Estructura química de los complejos de Ru(II) hidrofóbicos propuestos como fotosensibilizadores de especies reactivas de oxígeno. 227
- Figura 51.** Espectros (normalizados) de absorción UV-Vis y de luminiscencia ($\lambda_{exc} = 490$ nm) de los complejos $[\text{Ru}(\text{dmob})_2(\text{bim})]^{2+}$ (negro), $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{bim})]^{2+}$ (azul), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (naranja) y $[\text{Ru}(\text{Cl-bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (verde). Los espectros de emisión se han corregidos por la respuesta del instrumento. 228
- Figura 52.** Espectros (normalizados) de absorción UV-Vis y de luminiscencia de los complejos $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ (gris, $\lambda_{exc} = 480$ nm) y $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bim})]^{2+}$ (azul, $\lambda_{exc} = 490$ nm). Los espectros de emisión se han corregido por la respuesta del instrumento. 230
- Figura 53.** a) Cinética de emisión a 1270 nm tras excitación con un láser de Nd:YAG pulsado (3 ns cada pulso a 355 nm; las cinéticas en la figura son la suma de 40 pulsos). El rendimiento cuántico de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) se ha medido empleando como referencia el $[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}$ en MeCN (a) ($\Phi_{\Delta} = 0.94 \pm 0.07$) o el $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_3]^{4-}$ en D_2O (b) ($\Phi_{\Delta} = 0.43 \pm 0.04$). En todos los casos la absorbancia a 355 nm de las disoluciones equilibradas al aire de los complejos de Ru(II) se ajustó a 0.25. 233
- Figura 54.** a) DPBF como sonda específica para la determinación de $^1\text{O}_2$. Espectro de emisión del DPBF en MeCN ($8.0 \mu\text{mol L}^{-1}$; $\lambda_{exc} = 375$ nm; $\lambda_{em}^{max} = 458$ nm) tras ser irradiado durante diferentes tiempos (0 – 2 min) con un LED de 468 nm en presencia de $[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}$ (b), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (c), $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{bim})]^{2+}$ (d), $[\text{Ru}(\text{dmob})_2(\text{bim})]^{2+}$ (e), $[\text{Ru}(\text{Cl-bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (f) y en ausencia de fotosensibilizador (g). La absorbancia de los complejos a 468 nm se ajustó a 0.03. 234
- Figura 55.** a) ABDA como sonda específica para la determinación de $^1\text{O}_2$. Espectro de emisión del ABDA en H_2O ($5.9 \mu\text{mol L}^{-1}$; $\lambda_{exc} = 375$ nm; $\lambda_{em}^{max} = 405$ nm) tras ser irradiado diferentes tiempos (0 – 7 min) con un láser diodo a 450 nm en presencia de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (b), $[\text{Ru}(\text{dmob})_2(\text{bim})]^{2+}$ (c), $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{bim})]^{2+}$ (d), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (e), $[\text{Ru}(\text{Cl-bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (f) y en ausencia de fotosensibilizador (g). La absorbancia de los complejos a 450 nm se ajustó a 0.07. 235
- Figura 56.** Voltamperometría cíclica de los complejos $[\text{Ru}(\text{dmob})_2(\text{bim})]^{2+}$ (a), $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{bim})]^{2+}$ (b), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (c) y $[\text{Ru}(\text{Cl-bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (d) en MeCN anhidro registrado con una velocidad de scan de 50 mV s^{-1} en disoluciones purgadas con N_2 (electrodo de referencia Ag/AgCl; V vs. NHE). 238
- Figura 57.** Evolución de la intensidad de fluorescencia del OHE^+ a 604 nm ($\lambda_{exc} = 520$ nm) después de irradiar con un láser de diodo (25 mW, 405-nm) la disolución de DHE ($50.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) en agua en presencia de los diferentes complejos de Ru(II). La irradiación directa del DHE produce una pequeña cantidad de OHE^+ .²⁰⁴ 240
- Figura 58.** Toxicidad del complejo $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($0.25 \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre diferentes líneas celulares: a) TR146, b) CAL27 y c) CHO tras iluminación con diferentes fluencias del LED (470 nm). La viabilidad celular se evaluó con el ensayo MTT 24 h después de la irradiación ($n = 3$; ****P < 0.0001; análisis de varianza unidireccional). 244
- Figura 59.** Esquema de la síntesis de los hidrogeles de HA que contienen el complejo $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ en su interior. Parte inferior: fotografías representativas de los geles preparados en ausencia y en presencia del complejo de Ru(II). 245

- Figura 60.** Análisis de la localización subcelular de $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ -HA-PLGA NPs ($1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de complejo de Ru(II) embebido en las NPs) en células TR146 bajo las siguientes condiciones: a) mitocondria teñida con MitoTracker® Red (en verde); b) lisosomas teñidos con LysoTracker® (en verde). La luminiscencia roja proviene del complejo de Ru(II). Tiempo de incubación, 24 h; escala, $20 \mu\text{m}$ 247
- Figura 61.** Esquema del protocolo seguido para evaluar la fototoxicidad de los complejos de Ru(II)-bim preparados. 248
- Figura 62.** Evaluación de la fototoxicidad los complejos $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ y $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bim})]^{2+}$ sobre *E. coli* (a-b) o *S. aureus* (c-d). Las barras representan las unidades formadoras de colonias (CFUs) que permanecen tras iluminación durante 30 min con un LED de 470 nm ($62 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en presencia de cada uno de los complejos o en la oscuridad. 249
- Figura 63.** Fototoxicidad del complejo $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ sobre a) *E. coli* ($[\text{FS}] = 10.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) o b) *S. aureus* ($[\text{FS}] = 2.5 \mu\text{mol L}^{-1}$) a diferentes tiempos de irradiación con una placa iluminadora de LEDs de 470 nm ($62 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por LED). 250
- Figura 64.** Evaluación de la fototoxicidad de los complejos $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ y $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bim})]^{2+}$ tras irradiación durante 30 min con una placa iluminadora de LEDs de 470 nm ($62 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por LED) sobre a-b) *S. epidermidis* y *E. faecalis* ($[\text{FS-tmp}] = 2.5 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{FS-dip}] = 5.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) o c-d) *B. cepacia* y *P. aeruginosa* ($[\text{FS-tmp}] = 10.0 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{FS-dip}] = 50.0 \mu\text{mol L}^{-1}$). 251

TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de polímeros de impronta molecular fluorescentes (FMIPs) según la clasificación previamente establecida. El código de colores de los monómeros trifuncionales es acorde con la Figura 16 , donde en rojo se señala la unidad fluorescente, en azul la unidad de reconocimiento y en verde la unidad polimerizable.....	59
Tabla 2. Principales micotoxinas presentes en alimentos, género del hongo que las produce e intervalo del contenido máximo permitido por la Unión Europea para distintos productos alimenticios. ^{94,101}	63
Tabla 3. Métodos analíticos descritos en bibliografía para la determinación del ácido tenuazónico.	67
Tabla 4. Perspectiva general de los fotosensibilizadores aprobados clínicamente para TFD. ...	73
Tabla 5. Desplazamientos químicos (δ /ppm) de los protones del ligando libre 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (dmb) y del complejo heteroléptico $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{bim})]^{2+}$ en CD_3CN (300 MHz).	197
Tabla 6. Parámetros espectroscópicos de las sondas luminiscentes Ru(II)-bim en DMSO equilibrado al aire.	201
Tabla 7. Parámetros espectroscópicos de los monómeros trifuncionales en MeCN equilibrado al aire.	212
Tabla 8. Desplazamientos químicos de los protones de los complejos heterolépticos $[\text{Ru}(\text{dmob})_2(\text{bim})]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{bim})]^{2+}$ y $[\text{Ru}(\text{Cl-bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ en CD_3CN (la notación sigue la indicada en la Figura 25).	227
Tabla 9. Parámetros espectroscópicos de las fotosensibilizadores en MeCN equilibrado al aire.	228
Tabla 10. Parámetros espectroscópicos de los fotosensibilizadores hidrofóbicos en MeCN equilibrado al aire.	229
Tabla 11. Tiempos de vida de luminiscencia y constantes de desactivación bimolecular con oxígeno de los complejos de Ru(II) en MeCN.	231
Tabla 12. Rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete de los complejos de Ru(II) investigados, determinados mediante el método directo o indirecto (ver texto).	233
Tabla 13. Rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$, fracción de estados excitados $^3\text{MLCT}^*$ desactivados por el oxígeno molecular ($P_{\text{O}_2}^T$) y fracción de estados excitados $^3\text{MLCT}^*$ desactivados por el oxígeno molecular que dan lugar a $^1\text{O}_2$ (f_{Δ}^T) en acetonitrilo.	237
Tabla 14. Potenciales rédox del estado fundamental y el estado excitado de los complejos de Ru(II) estudiados en MeCN.	239
Tabla 15. Tiempos de vida de luminiscencia (τ), constantes de desactivación bimolecular con O_2 (k_q), rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_{Δ}), fracción de estados excitados $^3\text{MLCT}^*$ desactivados por el O_2 ($P_{\text{O}_2}^T$) y fracción de estados excitados $^3\text{MLCT}^*$ desactivados por el O_2 que dan lugar a $^1\text{O}_2$ (f_{Δ}^T) de los complejos $[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{tmp})_3]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bim})]^{2+}$ y $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ en MeCN anhidro.	241
Tabla 16. Potenciales rédox del estado fundamental y el estado excitado de los complejos de Ru(II) hidrofóbicos estudiados en MeCN.	242



ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviaturas

A	Absorbancia
ABDA	Ácido antraceno-9,10-diil-bis(metilen)dimalónico
AcO ⁻	Ion acetato
AOH	Alternariol
alb	<i>N,N'</i> -dialil-(2,2'-bipiridina)-4,4'-dicarboxamida
ALT	Altenueno
AME	Alternariol monometil éter
bim	2,2'-biimidazol
bpy	2,2'-bipiridina
CDs	<i>Carbon dots</i> (puntos de carbono)
CIP	<i>Control imprinted polymer</i> (polímero control con impronta molecular)
Cl-bpy	4,4'-dicloro-2,2'-bipiridina
CI	Conversión interna
CIS	Cruce intersistemas
CL	<i>Crosslinker</i> (monómero entrecruzante)
CPA	Ácido ciclopiazónico
dab	Diacrilato de 2,2'-bipiridin-4,4'-diilmetilo
dcb	Ácido 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxílico
DHE	Dihidroetidio
dip	4,7-difenil-1,10-fenantrolina
DIPEA	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
dmb	4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina
dmob	4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina
DMPO	<i>N</i> -óxido de 5,5'-dimetil-1-pirrolina
DPBF	1,3-difenilisobenzofurano
EDMA	Dimetacrilato de etilenglicol
ESI	Ionización por electrospray

Abreviaturas y símbolos

EPR	Permeabilidad y retención acumulada
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster
FS	Fotosensibilizador
HA	Ácido hialurónico
HATU	Hexafluorofosfato de azabenzotriazolotetrametiluronio
HOMO	<i>Highest occupied molecular orbital</i> (orbital molecular ocupado de mayor energía)
IEB	Inmunoensayo enzimático bioluminiscente
I_L	Intensidad de luminiscencia
IEQ	Inmunoensayo enzimático quimioluminiscente
LC	<i>Ligand-centered transition</i> (transición electrónica intraligando)
LMCT	<i>Ligand-to-metal charge transfer</i> (transferencia de carga del ligando al metal)
LFIA	Inmunoensayo de flujo lateral
LOD	Limit of detection
LUMO	<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i> (orbital molecular vacío de menor energía)
MAM	Metacrilamida
MC	<i>Metal-centered transition</i> (transición electrónica centrada en el metal)
MD	Monómero diluyente
MF	Monómero funcional
MLCT	<i>Metal-to-ligand charge transfer</i> (transferencia de carga del metal al ligando)
MIP	<i>Molecularly imprinted polymer</i> (polímero de impronta molecular)
MISPE	<i>Molecularly imprinted solid phase extraction</i> (extracción en fase sólida mediante polímeros de impronta molecular)
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NIP	<i>Non-imprinted polymers</i> (polímero sin impronta molecular)
NN	Ligandos auxiliares polipiridílicos
NPs	Nanopartículas
$^1\text{O}_2$	Oxígeno (molecular) singlete
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Anión superóxido
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo
OHE^+	Catión 2-hidroxietidio
PET	<i>Photoinduced electron transfer</i> (transferencia electrónica fotoinducida)
PEG	Polietilenglicol
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
phen	1,10-fenantrolina
Q	<i>Quencher</i> (molécula desactivadora)
QDs	<i>Quantum dots</i> (puntos cuánticos)
RAFT	Transferencia de cadena con adición-fragmentación reversible
REE	Resonancia de espín electrónico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (especies reactivas de oxígeno)
S_0	Estado fundamental singlete
S_1	Primer estado excitado singlete
s2b	2,2'-bipiridina-4,4'-disulfonato
s2d	1,10-fenantrolina-4,7-bis(fenil-4-sulfonato) (<i>componente mayoritario en el reactivo comercial</i>)
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SOD	Superóxido dismutasa
SOSG	<i>Singlet Oxygen Sensor Green</i>
SPT	<i>Single-photon timing</i> (cronometraje de fotones individuales)
TeA	Ácido tenuazónico
TBA	Tetrabutilamonio
TEM	Microscopía electrónica de transmisión

Abreviaturas y símbolos

TFD	Terapia fotodinámica
tmp	3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina
UCNPs	<i>Upconverting nanoparticles</i>
UV-Vis	Ultravioleta-visible
ZON	Zearalenona

Símbolos

λ	Longitud de onda
ε	Coefficiente de absorción molar
E^0	Potencial rédox estándar
Φ_{Δ}	Rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete
Φ_{em}	Rendimiento cuántico de emisión
Φ_{CIS}	Rendimiento cuántico de cruce intersistemas
$P_{O_2}^T$	Fracción de moléculas en el estado excitado triplete desactivadas por el oxígeno (molecular)
f_{Δ}^T	Fracción de moléculas en el estado excitado triplete desactivadas por el oxígeno (molecular) que producen oxígeno singlete
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
k_r	Constante de desactivación bimolecular radiante
k_{nr}	Constante de desactivación bimolecular no radiante
k_q	Constante de desactivación bimolecular (<i>quenching</i>)
τ	Tiempo de vida de la luminiscencia (= del estado excitado emisor)
τ_0	Tiempo de vida de la luminiscencia en ausencia de desactivador
τ_m	Tiempo de vida promedio con pesada preexponencial



SUMMARY

Ru(II) COMPLEXES WITH 2,2'-BIIMIDAZOL FOR LUMINESCENT CHEMICAL SENSORS AND PHOTOSENSITIZATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS)

Ru(II) complexes with polyazaheteroaromatic ligands have been widely investigated since 1959, when the first Ru(II) complex, tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, was described. These metallo-complexes exhibit unique photophysical and photochemical features that make them suitable for multiple applications in different fields. Their intense luminescence in solution, μs -long luminescence lifetimes, high photostability and their ability to generate reactive oxygen species, make these compounds ideal candidates for the development of **optical chemical sensors** and **photosensitization** (photodynamic therapies, photodisinfection...). Furthermore, their chemical versatility allows the development of photoactive compounds “on demand” for a particular application by judicious selection of their metal-chelating ligands.

Over the past few years, the **optical chemical sensors and biosensors** technology has notably developed with the aim of improving the population's quality of life. In particular, food safety has become a major concern for the agricultural sector and the human public health. The presence of contaminants such as microorganisms, pesticides, antibiotics, microplastics or mycotoxins in a large fraction of the food we consume daily is alarming. Hence the European Union efforts to establish maximum residue limits for those contaminants in food and feed. In this regard, food contamination by mycotoxins, secondary metabolites produced by different species of fungi, is a global concern. Exposure to mycotoxins may induce adverse effects on human and animal health, ranging from gastrointestinal and kidney disorders to immune deficiency and cancer. Therefore it is particularly interesting the development of sensitive, selective, straightforward analytical methods for its rapid detection and quantification *in situ*, without transporting the sample to the laboratory, where expensive techniques such as LC-MS/MS are currently applied for toxin identification and determination.

When aiming to develop new sensing platforms, luminescent chemosensors are one of the best choices because of their high sensitivity, good selectivity, ease of miniaturization and field deployment. In this context, we have devoted significant efforts to the molecular engineering, preparation and photochemical characterization of luminescent polypyridyl Ru(II) complexes. The combination of the (long-lived) luminescence properties of Ru(II) complexes with molecularly imprinted polymers (MIPs) as the recognition element becomes a powerful approach for chemosensor development. MIPs are biomimetic materials synthesized in the presence of a template molecule, normally the target analyte. After polymerization, the template is removed leaving behind empty cavities in a highly cross-linked polymer matrix, which are complementary in shape, size and functional groups to the template (analyte). In addition to

their high selectivity, these materials stand out for their chemical stability, low cost and the possibility of working in both organic and aqueous media. Moreover, the high versatility of their synthesis allows us to prepare MIPs in different physical formats and in very different approaches depending on their application.

On the other hand, the efficient formation of the triplet excited state manifold ($^3\text{MLCT}$) after a fast intersystem crossing promoted by the presence of the heavy ruthenium atom, allows us the use of these transition metal complexes also as photosensitizing dyes in photodynamic therapy (PDT) applications. PDT relies on the ability of a photosensitizer (PS) to produce reactive oxygen species (ROS) upon activation with light of a specific wavelength in the presence of nearby $^3\text{O}_2$, leading to significant oxidative damage to the target cells. As PSs, Ru(II)-polypyridyl complexes exhibit unique photophysical and photochemical features owing to their high photostability, relatively long-lived (μs) triplet excited state, near diffusion-controlled quenching rate constants with $^3\text{O}_2$, and their ability to undergo either ‘type I’ or ‘type II’ photochemical reactions.

This PhD thesis work has as a common link in the design and synthesis of a family of Ru(II) complexes that incorporate a 2,2'-biimidazol (bim) ligand. Such novel species have been applied i) to the development of **luminescent sensors** for tenuazonic acid (TeA), a food mycotoxin produced by fungi of the *Alternaria* species, and ii) as **photosensitizing** agents for ROS generation (photodynamic therapies, photodisinfection...). The dissertation is structured along three scientific publications where the candidate has been the first author:

The **first paper** (*Inorganic Chemistry* **2021**, ASAP article 19/12/2021, DOI: 10.1021/acs.inorgchem.1c02887) describes the molecular engineering and preparation of a family of Ru(II) complexes with one 2,2'-biimidazole (bim) ligand as the recognition moiety for 1,3-dicarbonyl enolates, including the tenuazonic acid (TeA) mycotoxin. The chelating and hydrogen donor features of bim allow simultaneous binding to the metal core and to the target β -diketonate delocalized anion (TeA^-) in an ideal geometry arrangement. In this regard, we have discerned between hydrogen bonding interaction and deprotonation of the Ru(II)-bim complexes by evaluating the spectroscopic response towards tenuazonate and other anions such as acetate or fluoride. The experimental results are further confirmed by computational calculations. Our thorough experimental and computational work sheds light on the geometry and proton-transfer quenching of the hydrogen-bonded adduct ($[\text{Ru}(\text{NN})(\text{bim})-\text{TeA}]$). Theoretical calculations allow assignment of the electronic transitions and molecular orbitals involved in the spectroscopic response of the probe.

The **second paper** (*Polymer* **2021**, 230, 124041) reports the design, preparation photochemical and analytical characterization of molecularly imprinted polymers (MIPs) made

of a *trifunctional* Ru(II)-polypyridyl monomer (red-luminescent, polymerizable, and TeA-sensitive). The MIP was grown as a 9-nm thick layer onto 200-nm SiO₂ nanobeads to achieve a fast diffusion of the analyte to the binding sites. Even in partially aqueous media, the peripheral biimidazole N–H moieties recognize the TeA[−] anion. The latter induces a significant change in the luminescence intensity (LOD of 324 nmol L^{−1}) and lifetime (LOD of 382 nmol L^{−1}) of the Ru(II)-doped material. Therefore, the presence of the toxin can be monitored by following changes both in the emission intensity and in the emission lifetime caused by the TeA binding. The material is selective for TeA, since other mycotoxins tested—also with a β-diketonate (or a similar one) structure—do not induce any sensor response or just a very small one. The latter shows the relevance of the additional selectivity provided by the MIP binding sites.

The **third manuscript** (*submitted*) was developed during a six month predoctoral secondment in Prof. Tayyaba Hasan group at the *Wellman Center for Photomedicine* of the *Harvard Medical School (Massachusetts General Hospital, MA, US)*. In this manuscript, a novel family of Ru(II) complexes with a 2,2'-biimidazole (bim) ligand and two ancillary polypyridyl ligands (functionalized with electron-withdrawing or electron-donating groups) is described. The ancillary ligands introduced in the pseudo-octahedral Ru(II) coordination sphere are varied in order to fine tune the photophysical and photochemical properties of the complexes. The work discusses the ability of the synthesized heteroleptic Ru(II)-bim complexes to sensitize the production of superoxide anion (O₂^{•−}) and singlet oxygen (¹O₂) upon irradiation with blue-green light and its effect on oral cancer cells. The metallo-sensitizers described herein display unique photochemical features in solution being the complex with two hydrophobic 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline ancillary ligands ([Ru(tmp)₂(bim)]²⁺) the most phototoxic of the family. However, there are several handicaps for its application in biological media such as its low solubility in an aqueous environment, non-specific cellular accumulation, and poor bioavailability that we tried to circumvent by encapsulating the Ru(II)-PS in a sustained release formulation. In this way, [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ was successfully loaded into self-assembled hyaluronic acid–poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles and its phototoxicity was evaluated in an oral cancer cell line (TR146 buccal mucosa carcinoma). We could finally demonstrate the potential application of the photosensitizer-loaded tumor-targeted nanoparticle formulation in the treatment of hypoxic solid oral tumor tissues.



RESUMEN

COMPLEJOS DE Ru(II) CON 2,2'-BIIMIDAZOL PARA SENSORES QUÍMICOS LUMINISCENTES Y FOTOSENSIBILIZACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Los complejos de Ru(II) con ligandos poliazaheteroaromáticos se han investigado ampliamente debido a sus interesantes propiedades fotofísicas y fotoquímicas. Desde que en 1959 se describiera el primer complejo de Ru(II), el tris(2,2'-bipiridina)rutenio(II) $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, estos compuestos de coordinación han sido objeto de numerosas aplicaciones en campos muy diversos. Su intensa luminiscencia en disolución, sus largos tiempos de vida de emisión (μs), su gran estabilidad química o su capacidad para generar especies reactivas, les convierte en candidatos ideales para el desarrollo de **sensores químicos ópticos** o **fotosensibilizadores** (de importante aplicación en terapias fotodinámicas, fotodesinfección...). Estos complejos poseen, además, una gran versatilidad química que permite una minuciosa selección de los ligandos alrededor del núcleo metálico de Ru(II), facilitando así el desarrollo de compuestos “*a medida*” para cada aplicación concreta.

La tecnología de los **sensores y biosensores químicos ópticos** ha experimentado una gran expansión en los últimos años con el fin de mejorar la calidad de vida de la población. En particular, la seguridad alimentaria se ha convertido en un tema de interés para el sector agrícola y para el conjunto de la sociedad. La presencia de contaminantes como microorganismos, pesticidas, antibióticos, microplásticos o micotoxinas en los alimentos que consumimos a diario es preocupante. Por ello, la Unión Europea intenta establecer los límites máximos de estos contaminantes en alimentos para humanos y animales. En este contexto, resulta especialmente preocupante la contaminación por micotoxinas—metabolitos secundarios producidos por diferentes especies de hongos—, ya que un consumo continuado de las mismas puede tener efectos nocivos sobre la salud, desde problemas gastrointestinales y de riñón a deficiencia inmune y cáncer. A este respecto, es necesario el desarrollo de nuevas metodologías analíticas asequibles, sensibles y selectivas que hagan factible una rápida detección y cuantificación de los contaminantes *in situ*, evitando así el transporte de la muestra al laboratorio, donde se procede a su análisis con técnicas sofisticadas y costosas como LC-MS/MS, estándar empleado actualmente para el análisis de micotoxinas.

A la hora de desarrollar nuevas plataformas de detección, los sensores químicos luminiscentes son una de las mejores opciones debido a su gran sensibilidad y portabilidad. En este contexto, los complejos de Ru(II) con ligandos poliazaaromáticos ocupan un lugar muy destacable por las propiedades mencionadas anteriormente. Adicionalmente, la combinación de dichas sondas químicas moleculares con materiales de reconocimiento como los polímeros de impronta molecular (MIPs) puede resultar muy ventajosa. Los MIPs son materiales sintéticos

biomiméticos capaces de reconocer un determinado analito en presencia de otras especies. Dichos polímeros emulan el comportamiento de elementos biológicos de reconocimiento como los anticuerpos, ya que poseen cavidades selectivas de reconocimiento molecular que se generan durante el proceso de polimerización empleando una plantilla—que suele ser el propio analito o un análogo molecular—que se extrae una vez formada la red polimérica. Además, estos materiales destacan por su alta estabilidad química, su bajo coste de producción y la posibilidad de trabajar tanto en medio orgánico como en medio acuoso. La versatilidad de su síntesis permite además la preparación de MIPs en diferentes formatos físicos y para analitos muy diversos.

Los complejos de Ru(II) también se conocen por su capacidad para actuar como **fotosensibilizadores**. Estos compuestos suelen presentar una elevada eficiencia de formación de estado excitado triplete del tipo transferencia de carga del metal al ligando ($^3\text{MLCT}$), ya que la presencia del átomo pesado de rutenio favorece un rápido cruce intersistemas. Los complejos de Ru(II) en el estado excitado triplete son capaces de transferir su energía o un electrón a la molécula de $^3\text{O}_2$ (oxígeno molecular en su estado fundamental triplete), generando especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden producir un importante daño celular. Como fotosensibilizadores, los complejos polipiridínicos de Ru(II) muestran características fotofísicas y fotoquímicas únicas para su aplicación en terapias fotodinámicas y procesos relacionados: elevada fotoestabilidad, estado excitado triplete de relativamente largo tiempo de vida (μs), constantes de velocidad de desactivación por el $^3\text{O}_2$ próximas al control por la difusión y capacidad de experimentar reacciones de ‘tipo I’ o ‘tipo II’ con este desactivador.

El trabajo de esta tesis doctoral tiene como nexo común el diseño y preparación de una familia de complejos de Ru(II) que incorporan un ligando 2,2'-biimidazol (bim) para i) su aplicación como **sensores luminiscentes** para detección del ácido tenuazónico (TeA), una micotoxina alimentaria producida por hongos del género *Alternaria*, y ii) como **fotosensibilizadores** para la generación de ROS para aplicaciones en terapias fotodinámicas, fotodesinfección, etc. La tesis doctoral se estructura alrededor de tres publicaciones científicas en las que el candidato es el primer co-autor:

El **primer artículo** (*Inorganic Chemistry* **2021**, ASAP article 19/12/2021, DOI: 10.1021/acs.inorgchem.1c02887) describe la preparación de una familia de complejos de Ru(II) que contiene el ligando 2,2'-biimidazol como elemento común para el reconocimiento de la micotoxina TeA. En este trabajo se asientan las bases para elucidar la interacción que se establece entre el ligando bim y una serie de aniones. La doble funcionalidad del ligando bim permite por un lado la formación de un quelato con el centro metálico de Ru(II) y, por otro, un aducto con aniones β -dicetonato (incluido el TeA^-) mediante una doble interacción por enlace

de hidrógeno a través de sus grupos N-H. El artículo evalúa cómo afecta la presencia de los aniones tenuazonato, acetato y fluoruro sobre las propiedades espectroscópicas de dichos complejos luminiscentes en medio orgánico, experimentalmente y mediante el empleo de química computacional. La modelización teórica corrobora los resultados experimentales obtenidos, permite asignar las transiciones electrónicas implicadas en la respuesta espectral, sugiere una geometría para el aducto [Ru(NN)(bim)-TeA] formado mediante enlaces de hidrógeno y contribuye a elucidar el mecanismo de desactivación de luminiscencia, que se atribuye a una transferencia protónica del ligando bim al anión TeA⁻.

El **segundo artículo** (*Polymer* **2021**, 230, 124041) describe el diseño, síntesis y caracterización analítica y fotoquímica de polímeros de impronta molecular (MIPs) luminiscentes dopados con un monómero *trifuncional* de Ru(II) para la detección de la micotoxina ácido tenuazónico. Dicho monómero luminiscente de Ru(II) incorpora un ligando 2,2'-biimidazol para el reconocimiento de aniones y un grupo polimerizable tipo acrilato para su incorporación en el esqueleto del MIP. La co-polimerización de la sonda luminiscente con el resto de monómeros que integran el polímero (dimetacrilato de etilenglicol como entrecruzante y metacrilamida como monómero diluyente) en presencia de TeA sintético como plantilla molecular, permite la obtención de un MIP para la detección selectiva de TeA. Dicho MIP consiste en una capa de 9 nm de espesor que se crece sobre núcleos de sílice (200 nm de diámetro), lo que permite una rápida difusión del analito a las cavidades selectivas del material y una respuesta inmediata del sensor. Las unidades N-H del ligando bim son capaces de reconocer al tenuazonato mediante interacciones electrostáticas y por enlace de hidrógeno incluso en un medio parcialmente acuoso, debido a la protección que ofrecen las cavidades hidrófobas del MIP. La presencia de anión tenuazonato se detecta por una disminución de la intensidad de luminiscencia (LOD = 324 nmol L⁻¹) y del tiempo de vida de emisión (LOD = 382 nmol L⁻¹), lo que permite la realización bimodal de medidas basadas en cambios de intensidad y/o tiempo de vida de luminiscencia. El material ofrece además una respuesta selectiva a TeA⁻, ya que otras micotoxinas con estructura similar tipo β-dicetona (ácido ciclopiazónico, zearalenol y alternariol) presentan escasa o nula respuesta, poniendo de manifiesto la importancia de la selectividad adicional que imparten las cavidades del MIP.

Por último, el **tercer artículo** (*enviado*) recoge el trabajo realizado durante una estancia predoctoral en el grupo de la Prof. Tayyaba Hasan en el *Wellman Center for Photomedicine* de la *Harvard Medical School (Massachusetts General Hospital; MA, US)*. Este trabajo describe el diseño y síntesis de fotosensibilizadores para generación de ROS basados en la estructura de complejos Ru(II)-bim con dos ligandos auxiliares polipiridínicos funcionalizados con sustituyentes electroattractores o electrodonadores. Los complejos Ru(II)-bim son capaces de

generar anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y oxígeno singlete (1O_2) tras ser irradiados con luz azul-verde, presentando una elevada toxicidad en células de cáncer oral (línea celular TR146). El complejo que posee dos ligandos auxiliares hidrofóbicos, 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina ($[Ru(tmp)_2(bim)]^{2+}$), es el más fototóxico de la familia, probablemente por su mayor captación celular. Sin embargo, presenta ciertas limitaciones para su empleo debido a su baja solubilidad en medio acuoso, una acumulación celular no específica y una baja biodisponibilidad. Con el objetivo de minimizar o sobrepasar dichas limitaciones, el complejo $[Ru(tmp)_2(bim)]^{2+}$ se encapsuló en nanopartículas de ácido hialurónico-ácido poli(láctico-co-glicólico) (HA-PLGA). Los estudios de liberación controlada del complejo de Ru(II) en disolución, de toxicidad en ausencia de luz y de fototoxicidad en células de cáncer oral confirman el potencial de dichos materiales para su aplicación en TFDs.



INTRODUCCIÓN

1. La fotoquímica y los avances en tecnologías basadas en el empleo de la luz

La luz es una fuente de energía no destructiva, barata y renovable que puede inducir numerosas transformaciones químicas en (bio)moléculas. Concretamente, la fotoquímica estudia los cambios químicos que surgen en las moléculas tras la absorción de fotones de luz. El vínculo que tenemos con la luz ha existido desde el mismo origen de la vida en la Tierra, que no habría sido posible sin las reacciones fotoquímicas de alta energía que convirtieron la materia inorgánica del planeta y su atmósfera en los constituyentes fundamentales de los organismos vivos: aminoácidos, azúcares, nucleótidos... También es destacable la importancia de la luz en la naturaleza, siendo esencial en la transformación del CO_2 en O_2 por las plantas (fotosíntesis), o en la comunicación no verbal entre animales o insectos a través de la quimioluminiscencia. La amplitud de la fotoquímica ha persuadido a químicos, físicos, biólogos y otros científicos para emplear la luz en múltiples aplicaciones, desde el uso de la luz natural como fuente de energía renovable (fotovoltaica) o como catalizador de reacciones químicas (fotocatálisis), al desarrollo de aplicaciones analíticas para la monitorización de especies químicas en aguas, alimentos o en los procesos industriales (sensores ópticos) o a su empleo en el campo de la química medicinal para el tratamiento y diagnóstico de ciertas enfermedades. Es tanta la importancia de la luz, que la asamblea general de la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) decidió declarar 2015 como el año de la luz y de las tecnologías basadas en ella (tecnologías fotónicas).

Para el desarrollo de las tecnologías fotónicas, además de la intervención de la radiación electromagnética de una determinada frecuencia, se requiere el empleo de moléculas o materiales fotoactivos cuyas propiedades se vean alteradas tras la absorción eficiente de un fotón. Una familia de moléculas fotoactivas de especial relevancia debido a su gran versatilidad y a sus propiedades espectroscópicas únicas, son los complejos poliazaaromáticos de rutenio(II). El interés por estos compuestos de coordinación se vio estimulado en la década de los 70 por su capacidad para actuar como agentes fotorreductores de transferencia de electrones o en su potencial uso como dispositivos para la conversión química y el almacenamiento de la energía solar mediante la descomposición fotocatalítica del agua.¹ Aunque estudios *a posteriori* pusieron de manifiesto algunas limitaciones de dichas especies, la investigación sobre complejos de Ru(II) con ligandos poliazaaromáticos sigue siendo un campo muy actual y con desarrollo potencial. Hasta la fecha, estos complejos metálicos se han aplicado como catalizadores de reacciones químicas,² en química supramolecular en diferentes procesos biológicos³ o como fotosensibilizadores para la producción de especies reactivas de oxígeno.⁴ Una de las aplicaciones más sobresalientes hasta la fecha ha sido su empleo como sondas luminiscentes para el desarrollo de **sensores** (opto)químicos.¹ Su gran estabilidad fotoquímica,

sus largas cinéticas de desactivación de luminiscencia (típicamente de 0.1 a 7 μ s) y, especialmente, la capacidad de modular sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas mediante la elección de sus ligandos, ha permitido su empleo como sensores fotoquímicos luminiscentes para analitos muy diversos (e.g. pH,⁵ temperatura,⁶ humedad,⁷ O₂⁸ o CO₂⁹). En los siguientes apartados se describirán con detalle las propiedades espectroscópicas y fotoquímicas de estos compuestos de coordinación y sus principales ventajas en el desarrollo de sensores ópticos y como fotosensibilizadores (para terapias fotodinámicas, fotodesinfección...).

2. Complejos de Ru(II) con ligandos poliazaaromáticos quelantes

2.1 Propiedades estructurales y fisicoquímicas

Los compuestos de coordinación de Ru(II) formados por ligandos bidentados presentan una estructura (pseudo)octaédrica (**Figura 1**). En función del número de ligandos iguales en la esfera de coordinación del metal, los complejos de Ru(II) pueden ser *homolépticos* (todos sus ligandos son iguales, [Ru(NN)₃]), o *heterolépticos* (cuando al menos un ligando es diferente, [Ru(NN)₂(N'N')], **Figura 1**).

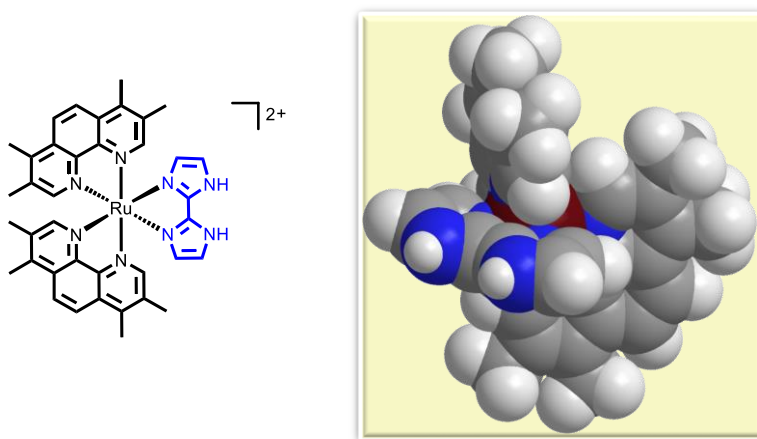


Figura 1. Estructura (pseudo)octaédrica del complejo [bis(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(2,2-biimidazol)rutenio(II)], [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺.

Los complejos de Ru(II) homolépticos con ligandos quelantes asimétricos (NN') presentan, a su vez, dos diastereoisómeros denominados facial (*fac*) y meridional (*mer*), en función de si las tres mitades iguales de los ligandos NN' ocupan una misma cara del octaedro (*fac*) o si se sitúan en un mismo plano bisector (*mer*) (**Figura 2**).

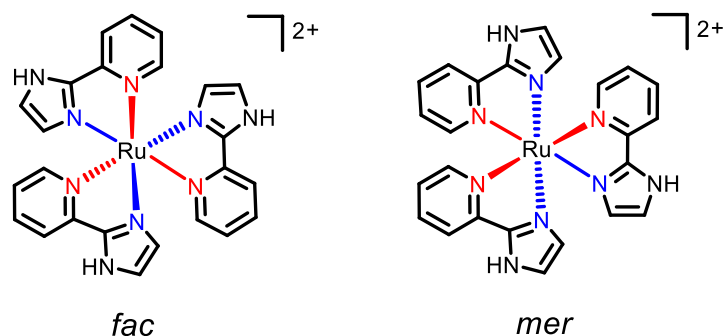


Figura 2. Estereoisómeros *fac* y *mer* del tris[2-(2-piridil)imidazol]rutenio(II).

En cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, los complejos de Ru(II) son sólidos química y térmicamente estables que, si tienen carga neta, se aíslan en forma de sal con distintos contraiones (típicamente, Na^+ , Cl^- , PF_6^- , BF_4^- o ClO_4^-). La elección del contraión del complejo de Ru(II) determinará su solubilidad en medio acuoso u orgánico. El empleo de contraiones voluminosos como el PF_6^- disminuye la solubilidad de los complejos de Ru(II) en agua, favoreciendo su disolución en disolventes orgánicos polares como el acetonitrilo, el dimetilsulfóxido o el metanol. En cambio, la elección de contraiones más pequeños como el Na^+ o el Cl^- aumenta su solubilidad en medio acuoso por la gran capacidad de solvatación de éstos.

2.2 Niveles de energía electrónica

Las propiedades luminiscentes y fotorédox de los complejos de Ru(II) dependen en gran medida de la disposición de sus estados excitados con respecto al estado fundamental, así como de la naturaleza de los orbitales de sus transiciones electrónicas. En este contexto, los complejos de Ru(II) están principalmente formados por moléculas orgánicas que contienen una agrupación de tipo α -diimina ($:\text{N}=\text{C}-\text{C}=\text{N}:$), que poseen orbitales σ -dadores localizados en los átomos de nitrógeno y orbitales π -aceptores deslocalizados en los anillos heteroaromáticos.¹⁰ El rutenio(II) es un ion metálico de bajo espín, que posee los 6 electrones de valencia apareados en sus orbitales d . Según la teoría del campo cristalino, la disposición octaédrica de los complejos de Ru(II) provoca un desdoblamiento de sus orbitales d debido a las repulsiones diferenciales que experimentan por su orientación espacial. Por consiguiente, no todos los orbitales d del metal se perturban de la misma manera por la coordinación de los ligandos (**Figura 3**). Aquellos orbitales d dirigidos hacia los ligandos ($d_{x^2-y^2}$ y d_{z^2}) sufren una repulsión (elevando su energía), dando lugar a dos orbitales degenerados con simetría σ denominados e_g . En cambio, los electrones en orbitales d dirigidos entre los ligandos (d_{xy} , d_{xz} y d_{yz}) no experimentan una elevación de su energía en presencia de los ligandos, resultando tres orbitales degenerados con simetría π denominados t_{2g} . Es importante indicar que la **Figura 3** representa la posición relativa de los orbitales moleculares de un complejo que contiene tres ligandos idénticos; en complejos heterolépticos esta disposición es mucho más complicada debido a la pérdida de simetría.

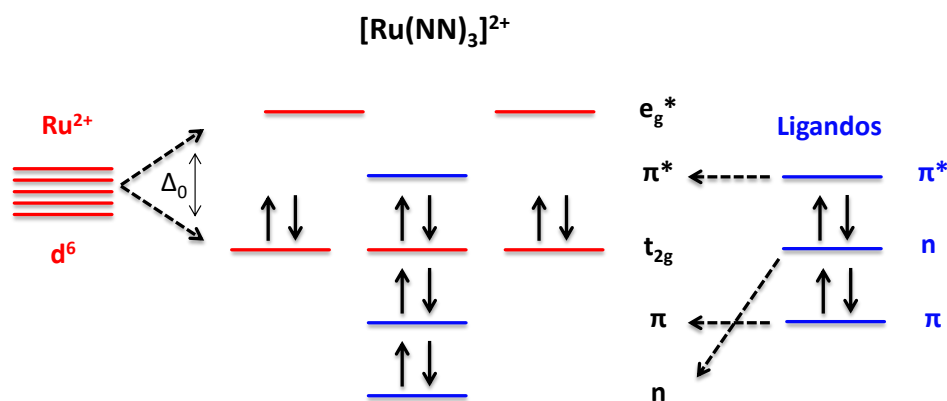


Figura 3. Esquema simplificado de los orbitales moleculares de un complejo homoléptico de Ru(II) con simetría octaédrica y ligandos de campo fuerte.

La diferencia de energía existente entre los orbitales t_{2g} y e_g , se conoce como energía de desdoblamiento del campo del cristal (Δ_0), y depende del radio del metal, de la carga de este ion metálico y de la naturaleza de los ligandos. Generalmente, los ligandos poliazaaromáticos son de campo fuerte y, por consiguiente, al coordinarse al centro metálico generan complejos de bajo espín, es decir, presentan una Δ_0 elevada por lo que los electrones no enlazantes del Ru(II) se encuentran en los orbitales t_{2g} . Como se muestra en la **Figura 3**, los ligandos de campo fuerte presentan electrones no enlazantes ocupando posiciones en los últimos orbitales ocupados (n). Estos electrones se localizan en los átomos de nitrógeno quelantes del ligando y, al coordinarse con el centro metálico, forman un enlace covalente de tipo σ disminuyendo su energía con respecto a los orbitales de simetría π enlazantes y π^* antienlazantes (**Figura 3**). De este modo, como se había mencionado antes, los orbitales t_{2g} del metal son los orbitales moleculares ocupados de mayor energía (HOMO) y el primer orbital vacío de menor energía (LUMO) corresponde a un π^* del ligando.¹⁰ Esta última característica confiere a los complejos de Ru(II) con ligandos poliazaaromáticos sus especiales propiedades fotofísicas y fotoquímicas (ver abajo).

2.3 Transiciones electrónicas y estados excitados

2.3.1 Absorción

La absorción de radiación electromagnética de una longitud de onda específica por el complejo de Ru(II) promueve la transición de los electrones desde los orbitales ocupados del estado electrónico fundamental a cualquiera de los estados excitados. En la **Figura 4a** se observa que la transición electrónica de menor energía es una $d \rightarrow \pi^*$, es decir, una transferencia de carga del metal al ligando (MLCT, del inglés “*metal-to-ligand charge transfer*”). Esta transición es la responsable de la intensa absorción que presentan estos complejos metálicos en la región UV-Vis del espectro electromagnético (**Figura 4b**), con coeficientes de absorción molar (ϵ) entre 10000 y 40000 L mol⁻¹ cm⁻¹ (con máximo a 400 – 500

nm). La promoción de un electrón desde el HOMO a los orbitales e_g^* , se denomina transición centrada en el metal (MC, del inglés “*metal centered*”). A pesar de ser una transición prohibida por las reglas de selección, puede que se observe en el espectro de absorción debido al fuerte acoplamiento espín-órbita característico de estos compuestos. Por último, otras transiciones electrónicas que requieren una mayor energía son la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ (intra-ligando o LC, del inglés “*ligand centered*”) y la $\pi \rightarrow e_g^*$ donde se transfiere un electrón del ligando al metal (LMCT, del inglés “*ligand-to-metal charge transfer*”). La transición LC origina bandas muy intensas en la región UV del espectro (**Figura 4b**), con coeficientes de absorción molar entre 40000 y 100000 L mol⁻¹ cm⁻¹. La transición LMCT presenta bandas muy difíciles de observar ($\lambda_{\text{abs}} < 200$ nm).¹¹

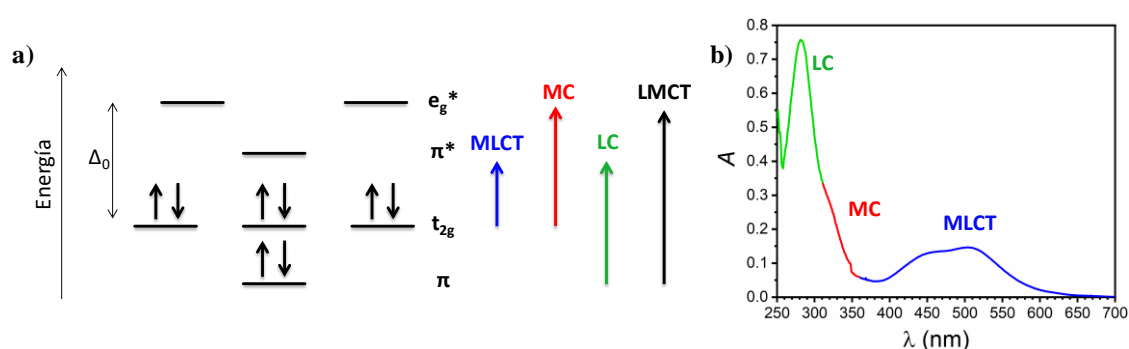


Figura 4. a) Diagrama simplificado de orbitales moleculares de un complejo homoléptico de Ru(II) donde las flechas representan las transiciones electrónicas de menor energía. b) Espectro de absorción de un complejo de Ru(II) mostrando las bandas de absorción más características.

2.3.2 Luminiscencia

En la **Figura 5** se muestra el diagrama de Jablonski de los diferentes estados de energía de un complejo de Ru(II) con el fin de describir las transiciones electrónicas más relevantes. Los electrones en el estado fundamental de un complejo de Ru(II) se encuentran apareados. Si el complejo de Ru(II) se irradia con luz de una frecuencia apropiada, se produce la absorción de un fotón. Uno de los electrones del estado fundamental singlete S_0 promociona al estado excitado singlete S_1 de menor energía o a estados de mayor energía (S_2 , S_3 ,...). Si el electrón se encuentra en estos últimos, el complejo de Ru(II) libera rápidamente ($<10^{-13}$ s) este exceso energético a través de procesos de relajación vibracional y conversión interna, para finalmente alcanzar el estado excitado singlete S_1 . Desde éste, el electrón puede liberar su exceso de energía a través de conversión interna, de la emisión de un fotón (fluorescencia, $h\nu_F$) o experimentando un rápido cruce intersistemas ($10^{-12} - 10^{-11}$ s). Este último proceso es el único que tiene lugar o predominante en los complejos de Ru(II) debido al *efecto del átomo pesado* de este ion metálico, para alcanzar el estado excitado triplete de menor energía ($^3\text{MLCT}$). En realidad, debido al fuerte acoplamiento espín-órbita provocado por el rutenio, se produce una mezcla de estados singlete-triplete que, formalmente y por simplicidad, se denomina “estado

tripleto”.¹²⁻¹⁴ Desde el estado excitado ³MLCT, el complejo de Ru(II) puede experimentar varios procesos de desactivación unimoleculares:

- ❖ Luminiscencia: Proceso de desactivación radiante por emisión de un fotón ($h\nu_L$).
- ❖ Desactivación no radiante: El exceso energético se disipa en forma de calor.
- ❖ Promoción térmica: El electrón accede a un estado de mayor energía ³MC por vía térmica para, finalmente, desactivarse mediante un proceso no radiante o por una reacción química dando lugar a otros productos (se habla de *fotoinestabilidad* del complejo debido a que el estado ³MC es de tipo disociativo, pudiendo conducir a la pérdida de ligandos, isomerización...).

El estado ³MLCT también puede experimentar procesos de desactivación bimolecular como la transferencia de energía a un aceptor (por ejemplo, a la molécula de oxígeno, para la formación del oxígeno singlete, ¹O₂), la transferencia electrónica (por ejemplo, a la molécula de oxígeno, para la formación del anión superóxido, O₂⁻), o una transferencia protónica a/desde un desactivador, si el complejo de Ru(II) posee ligandos poliazaaromáticos capaces de ceder/aceptar un protón. Todas las especies que desactivan bimolecularmente el estado excitado se denominan genéricamente desactivadoras o *quenchers* (Q). Estos procesos se estudiarán con detenimiento en la sección 2.5 de la Introducción.

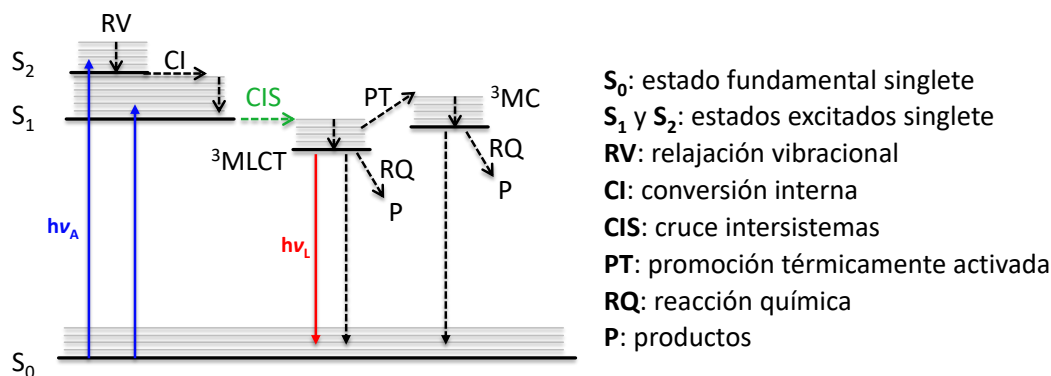


Figura 5. Diagrama de Jablonski de los estados de energía para complejos de Ru(II) con ligandos poliazaaromáticos. Las flechas discontinuas hacen referencia a procesos de desactivación no radiantes.

Los complejos de Ru(II), cuando se excitan en cualquiera de sus bandas de absorción, dan lugar a una banda de emisión muy ancha en la zona roja del espectro (desde 580 nm a >850 nm). Dado que la desactivación de la emisión de los complejos de Ru(II) tiene lugar desde una mezcla de estados excitados singlete-triplete, el tiempo de vida de emisión de estos complejos es más largo que el de moléculas que presentan fluorescencia (0.5 – 20 ns) pero más corto que el de aquéllas que presentan fosforescencia (de ms a s), por lo que se denomina habitualmente “luminiscencia” (0.1 a 7 μs para complejos de Ru(II)).¹

El rendimiento cuántico de emisión se define como la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos por un luminóforo (por unidad de tiempo). En el caso de los complejos de Ru(II), también se puede expresar según la Ecuación 1:

$$\Phi_{em} = \Phi_{CIS} \times \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (1)$$

siendo Φ_{CIS} el rendimiento cuántico de cruce intersistemas (rendimiento de producción de estados excitados triplete), k_r y k_{nr} las constantes de desactivación unimolecular radiantes y no radiantes totales. En muchos complejos de Ru(II) con ligandos poliazaaromáticos, el Φ_{CIS} es la unidad,¹⁵ aunque se ha demostrado que este valor depende de la naturaleza de los ligandos, sobre todo en aquellos que presenten anillos de cinco miembros.¹⁶ Por ello, mientras que complejos como el $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (bpy = 2,2'-bipiridina) tienen un Φ_{em} de 0.063 (en agua desoxigenada),¹⁷ otros como el $[\text{Ru}(\text{bth})_3]^{2+}$ (bth = 2,2'-bitiazol) presentan un Φ_{em} notablemente inferior (0.0014).¹⁸

El tiempo de vida de emisión (τ) se define como el tiempo promedio en el que una especie emisora permanece en su estado excitado y es equivalente al tiempo transcurrido hasta que la concentración inicial de estados excitados emisores ha disminuido $1/e$ veces mediante un decaimiento exponencial. De este modo, el τ resulta ser igual al recíproco de la suma de todas las constantes de primer orden que despueblan el estado excitado emisor, desactivación radiante (luminiscencia) y no radiante (conversión interna y cruce intersistemas), definidos por sus correspondientes constantes de velocidad unimoleculares k_r y k_{nr} (Ecuación 2):

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (2)$$

Como se ha mencionado anteriormente, el tiempo de vida del estado excitado triplete ($^3\text{MLCT}$) de los complejos de Ru(II) también puede experimentar procesos de desactivación bimoleculares como la transferencia de energía, la transferencia electrónica, o la transferencia de protón. En este caso, la emisión de la especie luminiscente ($[\text{Ru}(\text{NN})_3]^*$) se ve desactivada por la presencia de un *quencher*, que siempre se encuentra en proporción muy superior a la concentración de estados excitados, por lo que las constantes de pseudoprimer orden que resultan de los procesos bimoleculares de desactivación ($k_q[\text{Q}]$) pueden incorporarse a la Ecuación (2), contribuyendo a la disminución adicional de τ .

2.4 Propiedades electroquímicas

Los complejos de Ru(II) pueden participar activamente en diferentes reacciones de oxidación-reducción formando los correspondientes cationes cerivalentes, monovalentes y trivalentes de Ru, siendo el catión divalente el que presenta una mayor estabilidad (**Figura 6**). En este contexto, los potenciales rédox de los complejos de Ru(II) pueden variar dependiendo de la naturaleza de los ligandos poliazaaromáticos elegidos, más concretamente de su carácter σ -dador y π -aceptor. En el proceso de oxidación, el potencial $E^\circ_{(Ru^{3+}/Ru^{2+})}$ depende principalmente de la energía de los orbitales t_{2g} . Ligandos quelantes σ -dadores (más básicos) aumentan la energía de estos orbitales, favoreciendo así el proceso de oxidación ($\downarrow E^\circ_{(Ru^{3+}/Ru^{2+})}$). En cambio, ligandos con carácter π -aceptor, estabilizan la energía de los orbitales t_{2g} , aumentando por consiguiente su potencial de oxidación ($\uparrow E^\circ_{(Ru^{3+}/Ru^{2+})}$). En el proceso de reducción, el complejo metálico $[Ru(NN)_3]^{2+}$ acepta un electrón en el orbital π^* del ligando (estado excitado de menor energía, **Figura 6**) para formar el catión monovalente $[Ru(NN)_3]^+$. En este caso, el $E^\circ_{(Ru^{2+}/Ru^+)}$ dependerá de la capacidad del ligando para aceptar un electrón: ligandos π -aceptores provocan que el complejo de Ru(II) se reduzca más fácilmente ($\uparrow E^\circ_{(Ru^{2+}/Ru^+)}$, menos negativo).¹⁹

Al absorber un fotón, un electrón promociona al estado excitado de menor energía (3MLCT) quedando dos electrones desapareados en sendos orbitales t_{2g} y π^* (**Figura 6**). En este caso, es mucho más fácil arrancar un electrón situado en un orbital π^* de alto contenido energético (oxidación) o incorporarlo en los orbitales t_{2g} de menor energía (reducción) que hacerlo sobre el estado fundamental. Por tanto, los complejos de Ru(II) en el estado excitado, son más reductores y oxidantes que en su estado fundamental.¹⁸

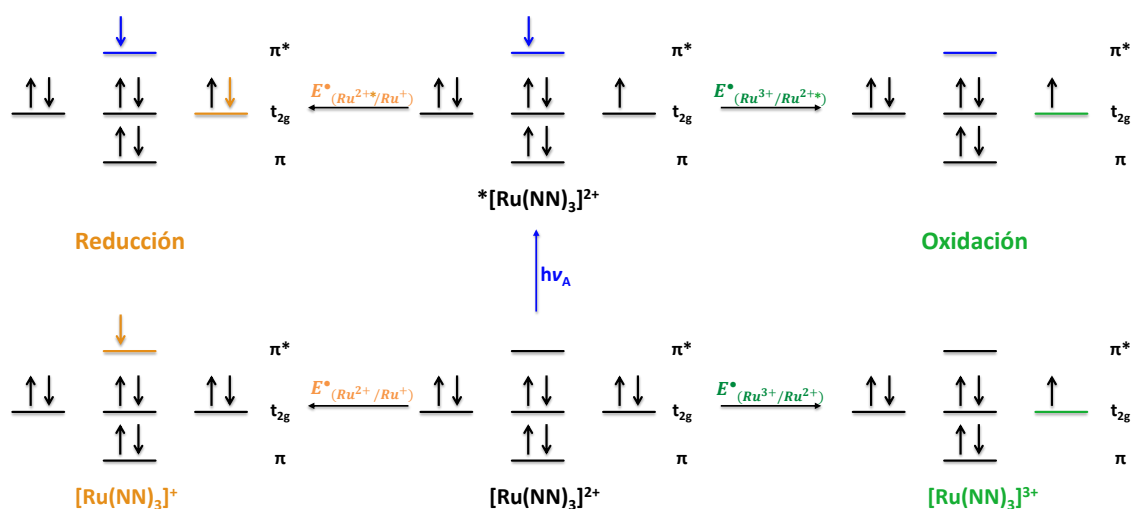


Figura 6. Esquema general de los procesos rédox que tienen lugar en el estado fundamental y en el estado excitado de un complejo homoléptico de Ru(II) con ligandos de campo fuerte.

2.5 Fotoquímica de los complejos de Ru(II) con el oxígeno molecular

El oxígeno molecular es capaz de desactivar eficazmente la luminiscencia de los complejos de Ru(II) a través un proceso bimolecular de transferencia de energía, transferencia electrónica (al O₂) o desactivación física tras la colisión de ambas moléculas. En este contexto, se pueden emplear los complejos de Ru(II) para la fotosensibilización de oxígeno para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), de las que cabe destacar el oxígeno singlete (¹O₂) y el anión superóxido (O₂^{•-}).

Tras la activación del complejo metálico mediante irradiación con luz de una longitud de onda específica (**Figura 4b**), en el intervalo azul o verde del espectro, (si se desea usar luz visible), éste promociona un electrón a su estado excitado singlete (¹[Ru(NN)₃]*) (**Figura 7**). Teniendo en cuenta que el rendimiento cuántico de cruce intersistemas en estos compuestos de coordinación es, frecuentemente, igual a la unidad, es muy probable que el electrón pase a un estado excitado triplete (³[Ru(NN)₃]*). Desde este estado excitado ³[Ru(NN)₃]*, la molécula puede interactuar con el ³O₂ predominantemente a través de dos mecanismos (**Figura 7**): i) una transferencia de energía y ii) una transferencia electrónica, para la generación de ¹O₂ ó de O₂^{•-}, respectivamente.²⁰

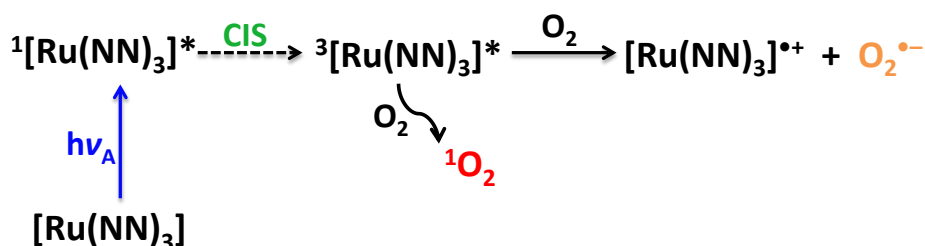


Figura 7. Mecanismo de generación de especies reactivas de oxígeno mediante fotosensibilización promovida por un complejo de rutenio(II).

2.5.1 Oxígeno singlete

El oxígeno molecular en su estado fundamental es una especie paramagnética que presenta multiplicidad triplete (³O₂), es decir, tiene dos electrones desapareados ocupando sendos orbitales π* degenerados (**Figura 8**). El estado excitado de menor energía de la molécula de oxígeno, también conocido como oxígeno singlete (¹O₂) posee dos electrones apareados en un mismo orbital π*.²¹ El ¹O₂ no se puede generar por la absorción directa de luz por parte del oxígeno molecular por ser una transición prohibida por el espín. Pero sí se puede generar ¹O₂ mediante el empleo de un fotosensibilizador (FS), que puede realizar una transferencia de energía desde su estado excitado triplete (³FS*) al ³O₂. El factor limitante para la fotogeneración de ¹O₂ es que dicho estado excitado triplete del FS tiene que estar situado por encima del nivel energético del ¹O₂ (94.2 kJ mol⁻¹, diferencia de energía de entre el estado excitado triplete y el

estado fundamental singlete del O₂), requisito que generalmente cumplen los complejos de Ru(II).

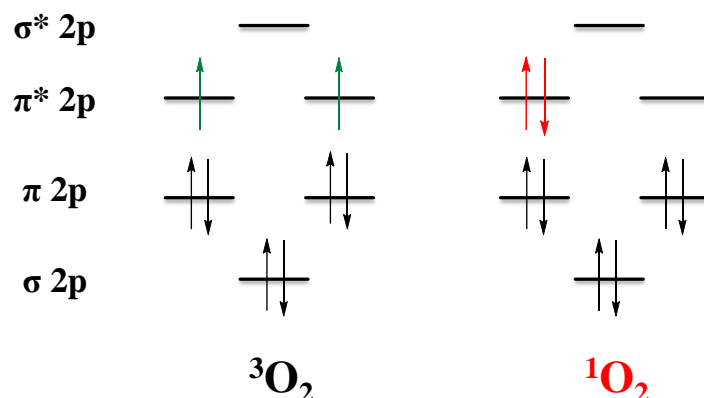


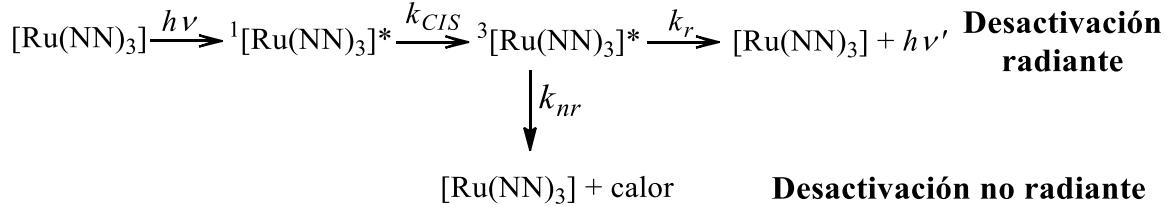
Figura 8. Diagrama de orbitales moleculares del oxígeno molecular en estado fundamental (3O_2) y del oxígeno singlete (1O_2).

La capacidad que presenta un FS para fotogenerar 1O_2 se cuantifica mediante la determinación del rendimiento cuántico de producción de 1O_2 (Φ_A). El Φ_A se define como el número de moléculas de 1O_2 generadas por fotón absorbido por el FS (por unidad de tiempo en ambos casos).²² La determinación del Φ_A puede llevarse a cabo de forma *directa*, monitorizando la muy débil fosforescencia del 1O_2 en el infrarrojo cercano (máximo a 1270 nm, aproximadamente), o de forma *indirecta*, monitorizando un cambio en las propiedades ópticas de moléculas atrapadoras de 1O_2 .

La detección del 1O_2 por espectroscopía de fosforescencia resuelta en el tiempo se ha convertido en una de las mejores herramientas para detectar esta especie en disolución o en materiales sólidos. Con el fin de determinar el rendimiento cuántico de 1O_2 producido por un FS, en particular por un complejo de Ru(II), es necesario tener en cuenta todos los procesos fotofísicos y fotoquímicos que pueden tener lugar cuando la molécula se encuentra en su estado excitado. Como se ha comentado anteriormente, una de las características principales de muchos de los complejos de Ru(II) es que presentan una eficiencia unitaria de cruce del estado excitado singlete $^1[Ru(NN)_3]^*$ al estado excitado triplete $^3[Ru(NN)_3]^*$ ($\Phi_{CIS} \approx 1$) por el efecto de átomo pesado, por lo que la eficacia intrínseca de generación de ROS es especialmente elevada en el caso de FS como los complejos de Ru(II) (no obstante, la eficiencia real está limitada por el tiempo de vida del estado excitado 3MLCT , que determina la eficiencia de su captura por el O₂ disuelto). Una vez formado el estado triplete $^3[Ru(NN)_3]^*$, se establece una competición para la desactivación de éste mediante procesos unimoleculares o bimoleculares (**Esquema 1** y **Esquema 2**). En los procesos unimoleculares, se puede desprender del exceso de energía a través de la emisión de un fotón, siendo k_r la constante de velocidad de desactivación radiante; o

bien en forma de calor (a través de retro-CIS y RV), siendo k_{nr} la constante de velocidad de desactivación no radiante (**Esquema 1**).²³

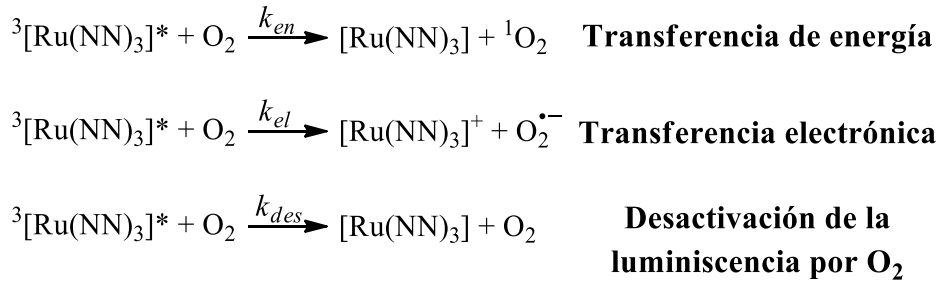
Procesos unimoleculares



Esquema 1. Procesos unimoleculares por los que evoluciona el estado excitado de los complejos de Ru(II).

Por otra parte, los procesos bimoleculares que compiten con la transferencia de energía al oxígeno molecular son la posibilidad de una transferencia electrónica al O_2 , con la consiguiente formación del $\text{O}_2^{\bullet -}$, o la propia desactivación física de la luminiscencia del complejo de Ru(II) por el oxígeno molecular (que algunos autores denominan, incorrectamente, “*enhanced internal conversion*”) (**Esquema 2**). Por motivos cinéticos, es necesario que el tiempo de vida del estado excitado del ${}^3[\text{Ru}(\text{NN})_3]^*$ sea lo suficientemente largo (> 50 ns) para asegurar un cierto número de colisiones con el O_2 .

Procesos bimoleculares con O_2



Esquema 2. Procesos bimoleculares por los que evoluciona el estado excitado de los complejos de Ru(II).

Teniendo en cuenta los procesos mencionados anteriormente, el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete (Φ_Δ) viene definido por la Ecuación 3:²⁴

$$\Phi_\Delta = \Phi_{CIS} \eta_{en} = \Phi_{CIS} \times \frac{k_{en}[\text{O}_2]}{k_r + k_{nr} + k_q[\text{O}_2]} \quad (3)$$

donde η_{en} es la eficiencia de la transferencia de energía del ${}^3[\text{Ru}(\text{NN})_3]^*$ al oxígeno molecular y k_q la suma de las constantes de velocidad de desactivación de ${}^3[\text{Ru}(\text{NN})_3]^*$ por ${}^3\text{O}_2$ ($k_q = k_{en} + k_{el} + k_{des}$).

Alternativamente, Φ_{Δ} también puede expresarse por la Ecuación 4:

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{CIS} \times \frac{k_q[O_2]}{k_r + k_{nr} + k_q[O_2]} \times \frac{k_{en}}{k_q} = \Phi_{CIS} \times P_{O_2}^T \times f_{\Delta}^T \quad (4)$$

donde $P_{O_2}^T$ es la fracción de moléculas de $^3[Ru(NN)_3]^*$ desactivadas por el 3O_2 y f_{Δ}^T es la fracción de moléculas de $^3[Ru(NN)_3]^*$ desactivadas por el 3O_2 que dan lugar a 1O_2 . En definitiva, el Φ_{Δ} viene determinado por la eficiencia del FS a dar lugar a su estado excitado triplete, la probabilidad de colisión del oxígeno molecular con el $^3FS^*$ antes de que se produzca su desactivación y de la capacidad del FS de transferir su energía al 3O_2 . Esto indica que el Φ_{Δ} no depende únicamente de la estructura del FS; la polaridad del medio, la concentración de oxígeno o la viscosidad del disolvente son factores para tener en cuenta cuando se determina el Φ_{Δ} por espectroscopía de fosforescencia resuelta en el tiempo.

La utilización del método de medida directa del 1O_2 también ha de considerar el tiempo de vida de esta ROS en el disolvente elegido, ya que determina su detectabilidad. Un ejemplo claro es el corto tiempo de vida que presenta el 1O_2 en agua ($\tau_{\Delta} \approx 3.5 \mu s$): la baja concentración de oxígeno en este disolvente, la mayor viscosidad con respecto a otros disolventes orgánicos y la presencia de enlaces O–H capaces de desactivar la fosforescencia del 1O_2 por transferencia de energía electrónica y vibracional, son algunos de los factores que determinan este hecho. Por ello, para la determinación de Φ_{Δ} , generalmente se suelen utilizar disolventes deuterados, donde el tiempo de vida del 1O_2 es mucho más elevado (e.g. D_2O , $\tau_{\Delta} = 66 \pm 2 \mu s$).²⁵ A pesar de la robustez y sensibilidad que presenta este método, su limitación de medida en medio acuoso, donde la señal de emisión queda reducida al umbral de detección, hace que se hayan desarrollado alternativas como la determinación indirecta del 1O_2 .

La determinación indirecta del 1O_2 se basa en el uso de sondas moleculares capaces de reaccionar con esta especie reactiva de oxígeno con el consiguiente cambio en sus propiedades espectroscópicas (absorción o fluorescencia). Una de las primeras sondas desarrolladas fue el 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF), que basa su detección en la disminución de su absorción ($\lambda_{abs}^{max} = 415 \text{ nm}$) o su emisión ($\lambda_{em}^{max} = 450 \text{ nm}$) tras la formación de un endoperoxido inestable que termina descomponiendo para dar lugar a un compuesto incoloro, el 1,2-dibenzoilbenceno (**Figura 9**). Otro ejemplo es el uso del ácido antraceno-9,10-diil-bis(metilen)dimalónico (ABDA). Su principal ventaja frente al DPBF es su elevada solubilidad en agua. Esta molécula fluorescente ($\lambda_{em}^{max} = 405 \text{ nm}$) es capaz de capturar el 1O_2 para formar una especie no emisiva.²⁶ Otra de las sondas más empleadas actualmente es el Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG). Como se muestra en la **Figura 9**, esta sonda presenta dos partes bien diferenciadas, el antraceno y la fluoresceína. En ausencia de 1O_2 , el antraceno desactiva la fluorescencia de la fluoresceína

mediante un proceso de transferencia electrónica fotoinducida (PET, del inglés, “*photoinduced electron transfer*”). En presencia de $^1\text{O}_2$, el antraceno forma un endoperóxido, lo que inactiva el proceso PET, recuperándose por tanto la emisión típica de la fluoresceína a 530 nm. A pesar de que se uso está más que afianzado, existen ciertos estudios que cuestionan su sensibilidad debido a un autoabastecimiento de $^1\text{O}_2$ cuando la sonda se irradia con luz UV-visible, lo que proporciona una emisión residual de la fluoresceína.^{27–29} Por ejemplo, la determinación del Φ_A del SOSG por el método directo –mediante monitorización de la fosforescencia de $^1\text{O}_2$ a 1270 nm– proporcionó un valor de $\Phi_A = 0.03 \pm 0.01$ en metanol deuterado.²⁸ Valor nada despreciable que puede resultar en una interferencia en la detección del $^1\text{O}_2$ al emplear SOSG como sonda.

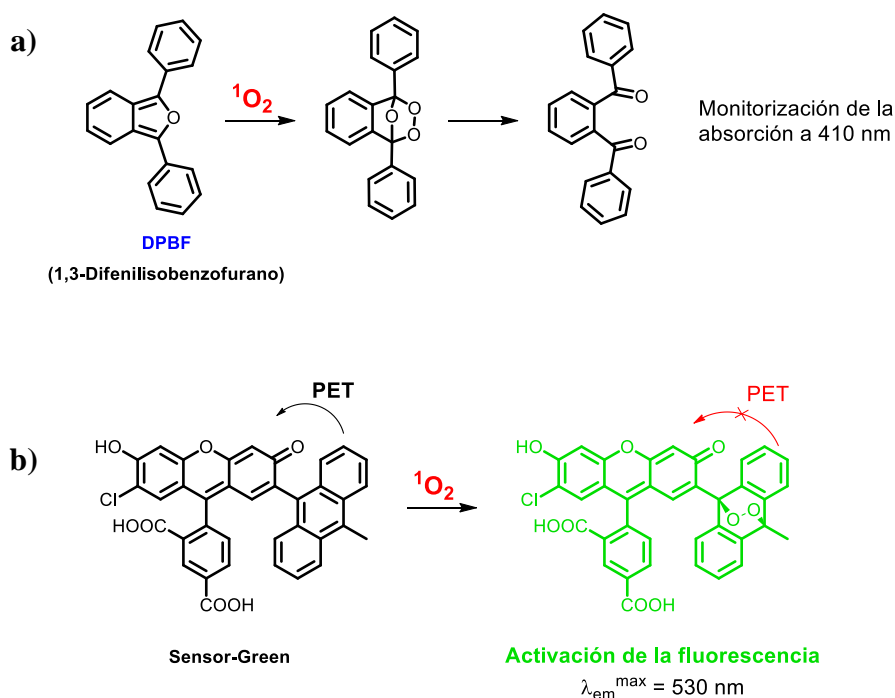


Figura 9. Diferentes sondas químicas para la detección de $^1\text{O}_2$ (a) 1,3-difenilisobenzofurano o (b) Singlet Oxygen Sensor Green.

2.5.2. Anión superóxido

El anión-radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) puede originarse directamente por una transferencia electrónica desde el $^3\text{FS}^*$ al oxígeno molecular (**Figura 10**) o, indirectamente, a través de radicales formados a partir de transferencia electrónica de un sustrato al $^3\text{FS}^*$ en el clásico mecanismo “tipo I” de acción de un fotosensibilizador.³⁰ Por ello, uno de los factores determinantes de el proceso de generación directa es el potencial de oxidación del $^3\text{FS}^*$, teniendo en cuenta que el potencial de reducción del $\text{O}_2/\text{O}_2^{\cdot-}$ es -0.33 V(SHE) a 1 atm de presión parcial de O_2 en medio acuoso.²⁵ Fotosensibilizadores con potenciales de reducción en el estado excitado ($3+/2+^*$) más negativos, presentarán una mayor tendencia a ceder un electrón al $^3\text{O}_2$ para producir $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Esta especie paramagnética presenta una menor reactividad que el $^1\text{O}_2$, lo que le permite ser aislada en forma de sal de metales alcalinos como el superóxido de potasio o sodio.³¹ A pesar de su menor reactividad, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ está involucrado en múltiples reacciones químicas o enzimáticas para dar lugar a otros radicales libres o especies que pueden generar un mayor daño oxidativo como el agua oxigenada (H_2O_2) o el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$).

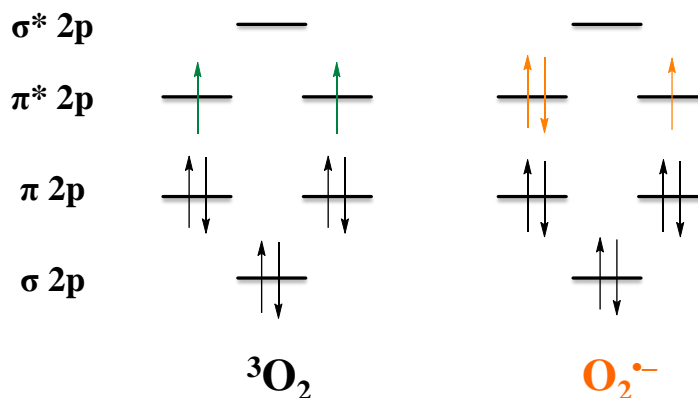


Figura 10. Diagrama de orbitales moleculares del estado fundamental del oxígeno molecular ($^3\text{O}_2$) y del anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

A diferencia del oxígeno singlete, es indispensable el uso de sondas químicas para su detección. Una de las sondas disponibles comercialmente es la dihidrorrodamina 123, cuya fluorescencia verde se activa tras su oxidación en presencia de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Un inconveniente que presenta dicha sonda es la interferencia de otras especies reactivas de oxígeno como el H_2O_2 que también son capaces de generar la especie fluorescente.³² Alternativamente, una de las sondas más empleadas en la detección selectiva de $\text{O}_2^{\cdot-}$ es el dihidroetidio (DHE). Esta molécula no emisiva da lugar al fluoróforo 2-hidroxi-etidio ($\lambda_{em}^{max} = 610 \text{ nm}$) por reacción con el anión $\text{O}_2^{\cdot-}$ (**Figura 11**).³³

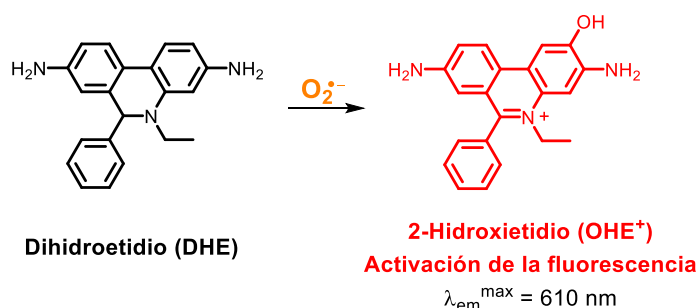


Figura 11. Dihidroetidio como sonda específica para la detección del anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

Otra de las metodologías empleadas en la detección del $\text{O}_2^{\cdot-}$, es el uso de la resonancia de espín electrónico (REE), también llamada resonancia paramagnética electrónica (RPE). Esta técnica permite el estudio de especies paramagnéticas, siendo un método fiable para la detección

de radicales libres en diferentes entornos químicos y biológicos. Los conceptos físicos básicos de la REE son análogos a los de la resonancia magnética nuclear, salvo que en la REE se excitan los espines de los electrones en lugar de los núcleos atómicos.³⁴ Una de las principales técnicas que emplea la REE para la detección de especies reactivas de oxígeno, es el uso de sondas capaces de captar estas especies para la posterior formación de radicales lo suficientemente estables para ser analizados. La mayoría de estas sondas se basan en la estructura de nitronas cíclicas. En la detección del $O_2^{\cdot-}$ se emplea, por ejemplo, el *N*-óxido de 5,5'-dimetil-1-pirrolina (DMPO). El uso de esta sonda trae consigo ciertas dificultades como una baja velocidad de reacción con el $O_2^{\cdot-}$ (son necesarias altas concentraciones de la sonda atrapadora), así como una baja estabilidad del aducto radicalario formado (DMPO/ \bullet OOH).³⁵ A pesar de sus limitaciones, el DMPO es uno de los atrapadores más empleados en REE, aunque ya existen otras sondas con mejores propiedades como el *N*-óxido de 5-dietoxifosforil-5-metil-1-pirrolina.³⁶

3. Aplicaciones fotoquímicas de los complejos de Ru(II)

Las propiedades espectroscópicas y fotoquímicas únicas que presentan los complejos metálicos de rutenio(II) hace que sean compuestos muy atractivos para su empleo en el diseño de sensores luminiscentes. Las características más relevantes se enumeran a continuación:

- ❖ Exhiben bandas de absorción en el intervalo UV-Vis (200 – 500 nm) y emisión en el rojo (550 – 850 nm). Por consiguiente, presentan gran desplazamiento Stokes (> 150 nm), lo que permite reducir los costes de la instrumentación óptica, ya que se puede discernir fácilmente entre la luz dispersa de la fuente de excitación y la emisión con el simple uso de filtros ópticos.
- ❖ Poseen tiempos de vida de luminiscencia relativamente largos (0.1 a 7 μ s) lo que permite el desarrollo de sensores basados en la medida de su cinética de emisión.
- ❖ Presentan rendimientos cuánticos de emisión moderados (0.01 a 0.4).
- ❖ Presentan una elevada estabilidad térmica y (foto)química, lo que asegura su durabilidad como sensores luminiscentes.
- ❖ La minuciosa selección de los ligandos de coordinación alrededor del ion metálico permite modular las propiedades (foto)químicas y (foto)físicas del complejo de Ru(II). De este modo, se pueden diseñar complejos de Ru(II) “*a medida*” para analitos específicos o introducir funciones que permitan reacciones de conjugación posterior (i.e. inmovilización en superficies, etiquetado de biomoléculas, etc.).

Una aplicación muy común de los complejos de Ru(II) es su uso como sensores del oxígeno molecular dada la gran capacidad de este analito de desactivar eficazmente la luminiscencia de los complejos.⁸ Alternativamente, la incorporación de ligandos con grupos funcionales capaces de aceptar o ceder un protón como grupos hidroxilo, amino o carboxilo permite el desarrollo de sensores de pH⁵ o de analitos básicos como el amoníaco.³⁷ Otro ejemplo relevante, que muestra cómo la selección apropiada de la esfera de coordinación del Ru(II) puede contribuir a dirigir la respuesta para un analito específico, es la incorporación de ligandos (foto)oxidantes (con carácter π -aceptor, como la biperazina o el tetraazafenantreno) en complejos que se han aplicado como sensores luminiscentes de analitos reductores como el H₂S.³⁸

Además de sus propiedades como sensores (opto)químicos, la gran capacidad de los complejos de Ru(II) para generar especies reactivas de oxígeno mediante fotosensibilización de O₂ permite también su empleo en procesos de amplificación fotoquímica o en las conocidas terapias fotodinámicas para la inactivación de células cancerígenas, bacterias o virus (ver sección 3.2 de la Introducción).

3.1. Sensores (opto)químicos y polímeros biomiméticos

3.1.1 Sensores químicos: definición y características

Un sensor químico es un dispositivo capaz de detectar y cuantificar de forma reversible, en tiempo real e *in situ* un parámetro químico transformándolo en una señal analítica útil (actualmente, eléctrica).³⁹ Los sensores químicos constan principalmente de tres partes fundamentales (**Figura 12**): un elemento de reconocimiento, un transductor y un sistema electrónico. Dada la complejidad de las muestras reales, es posible que el analito coexista con otras moléculas o iones; para minimizar el efecto de dichas interferencias en la medida, el elemento de reconocimiento ha de ser selectivo al analito. Por su parte, el transductor se encarga de transformar el evento de reconocimiento en una señal analítica medible. Dependiendo del tipo de transductor que se emplee, los sensores pueden clasificarse en ópticos, electroquímicos, eléctricos, másicos, térmicos o magnéticos, entre otros. Por último, la señal eléctrica es amplificada y procesada por un sistema electrónico.

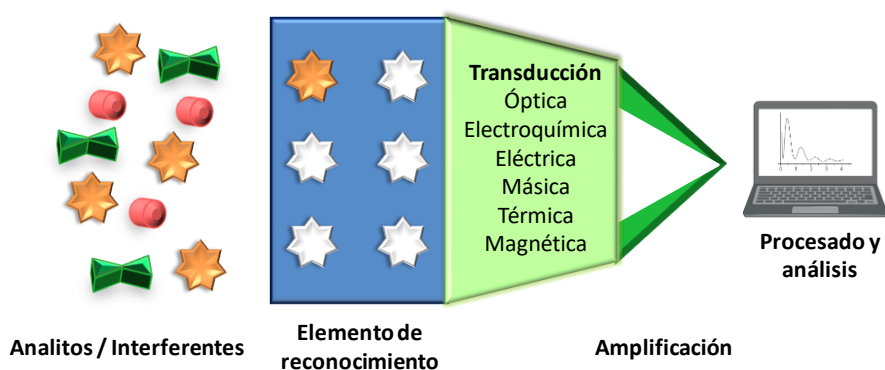


Figura 12. Componentes de un sensor químico.

Un sensor ideal debe presentar las siguientes características:

- ❖ Una importante selectividad y sensibilidad a la molécula objetivo.
- ❖ Una elevada precisión y exactitud en las medidas. Además, ha de ser robusto, estable y con gran durabilidad, manteniendo sus propiedades analíticas.
- ❖ Ser compacto y pequeño con el fin de poder transportarlo e instalarlo fácilmente incluso en lugares con difícil acceso.
- ❖ Tiempos de respuesta cortos, permitiendo medir en continuo y en tiempo real.
- ❖ Un bajo coste, fácil manejo y con posibilidad de automatización con el fin de minimizar la necesidad de personal cualificado.

3.1.2 Luminiscencia como método de transducción en sensores químicos ópticos

Los sensores ópticos emplean la radiación electromagnética para generar una señal analítica útil. La interacción de la luz con la molécula sensible provoca el cambio en una propiedad óptica (como la absorbancia, intensidad de emisión, tiempo de vida de luminiscencia, reflectancia, etc.) que puede relacionarse con la concentración de analito en la muestra. La gran sensibilidad de los métodos ópticos, especialmente aquellos basados en la medida de la luminiscencia, ha permitido que hoy en día, sea una de las técnicas más empleadas para la monitorización *in situ* en la industria como en el control de procesos en fábricas o en el análisis medioambiental.⁴⁰ Otra característica a destacar es su versatilidad y la posibilidad de miniaturización con la consiguiente reducción de costes.⁴¹ Además, los sensores basados en fibra óptica permiten una monitorización remota y casi sin contacto físico y, por consiguiente, pueden instalarse en ambientes hostiles y permanecer inalterados por la radiación electromagnética o por altas temperaturas.⁴²

Dada la importancia que tiene en la presente tesis doctoral el desarrollo de sensores ópticos basados en a) la medida de la luminiscencia en estado estacionario o b) la medida de la luminiscencia con resolución temporal (por cronometraje de fotones individuales), se detallarán a continuación los aspectos más relevantes de ambas modalidades.

a) Los sensores luminiscentes basados en la medida de intensidad de emisión en estado estacionario (englobando fluorescencia y fosforescencia), registran la emisión de luz de una molécula (en algunos casos la muestra pero, en general, un indicador fotoluminiscente) previamente excitada con una luz de longitud de onda específica procedente de una fuente de luz continua.⁴³ También existen sensores basados en la medida de quimio- o bioluminiscencia. En este caso, la especie en su estado electrónico excitado se genera a partir de una reacción química (quimioluminiscencia) o una reacción biológica (bioluminiscencia), en lugar de por el empleo de una fuente de luz externa.

Las medidas de intensidad absoluta vienen regidas por la ley de Parker (Ecuación 5, simplificada para disoluciones de baja concentración del luminóforo), donde la luz emitida por el luminóforo es directamente proporcional a su concentración:⁴³

$$I = 2.3 \times I_0 \times \Phi_{em} \times \varepsilon \times l \times c \times k \quad (5)$$

siendo I_0 la intensidad de la radiación de excitación, Φ_{em} el rendimiento cuántico de emisión del luminóforo, ε el coeficiente de absorción molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), l el paso óptico de la cubeta utilizada para la medida (cm), c la concentración del luminóforo (mol L^{-1}) y k un factor de proporcionalidad que tiene en cuenta la geometría del instrumento.

En algunos casos no se emplea la medida directa de la intensidad de emisión del analito, sino que se estudia la desactivación (dinámica) de la luminiscencia o *quenching* de un cromóforo en presencia de una molécula determinada. En este caso, la intensidad de emisión en presencia (I) y en ausencia (I_0) de la especie desactivante o *quencher* está relacionada directamente por la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 6):

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + \tau_0 k_q [Q] \quad (6)$$

siendo K_{SV} la denominada constante de Stern-Volmer, τ_0 el tiempo de vida de emisión de la molécula en ausencia del desactivador (s), k_q la constante de velocidad de desactivación bimolecular ($\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$) y $[Q]$ la concentración del desactivador (mol L^{-1}). Como se muestra en la Ecuación 6, esta aproximación también puede aplicarse con la medida de los tiempos de vida de luminiscencia de una molécula emisora, siempre que se trate de una desactivación colisional (siguiente sección b).

b) Los sensores luminiscentes basados en la medida de tiempos de vida de emisión utilizan el tiempo (t) transcurrido desde que el luminóforo es excitado con un pulso de luz muy corto hasta que quedan únicamente $1/e$ moléculas del luminóforo en el estado excitado. El tiempo de vida de luminiscencia (τ) se puede calcular mediante el ajuste del perfil cinético de desactivación de la luminiscencia del indicador a la Ecuación 7, siendo I_0 la intensidad de emisión inmediatamente tras finalizar el pulso de excitación.

$$I_t = I_0 e^{(-t/\tau)} \quad (7)$$

La Ecuación 7 se puede emplear cuando el perfil de extinción es monoexponencial, es decir, cuando existe una única especie emisora con un tiempo de vida determinado. Para sistemas más complejos en el que el luminóforo puede presentar distintos estados excitados (por ejemplo, debido a la presencia de distintas especies ácido-base o a la formación de agregados) se obtienen perfiles cinéticos de desactivación de la luminiscencia que requieren un ajuste multiexponencial, ya que el indicador luminiscente presenta más de un tiempo de vida distinto. Esta situación también se puede dar cuando un luminóforo se encuentra en diferentes entornos químicos, algo que ocurre con frecuencia cuando la molécula luminiscente se incorpora en una matriz polimérica (dependiendo de la localización de la molécula en la red del polímero o del grado de solvatación, el tiempo de vida de emisión puede variar). En los casos en los que la muestra presenta más de un tiempo de vida, y para facilitar la comparación de resultados entre distintas muestras, se puede emplear el llamado tiempo de vida medio ponderado pre-exponencialmente (τ_m) calculado a partir de la Ecuación 8:

$$\tau_m = \frac{\sum_i B_i \tau_i}{\sum_i B_i} \quad (8)$$

donde B_i es factor preexponencial de cada una de las especies emisoras en la cinética multiexponencial de desactivación $I_t = A + \sum_i B_i e^{-(t/\tau_i)}$ registrada.

Dichos sensores basados en el tiempo de vida de emisión (i.e. la cinética) presentan ventajas con respecto a los basados en la medida de intensidad de luminiscencia:^{44,45}

- ❖ El tiempo de vida de emisión es independiente de fluctuaciones en la intensidad de la fuente luminosa o del deterioro del detector o la fuente de excitación.
- ❖ El tiempo de vida de emisión es una magnitud intensiva, es decir, es independiente de la concentración de la especie emisora; por ello, no presenta deriva por (foto)degradación del luminóforo.
- ❖ Las medidas de tiempos de vida de emisión no se ven afectadas por fenómenos de filtro interno. Este efecto se produce cuando la concentración del luminóforo es demasiado elevada, lo que puede provocar una disminución de la intensidad de luminiscencia por imposibilidad de detección correcta de la emisión o autoabsorción (solapamiento la absorción y emisión del luminóforo).

3.1.3 Polímeros de impronta molecular (MIPs) como elementos de reconocimiento biomimético en sensores químicos

3.1.3.1 Concepto y propiedades

Los polímeros de impronta molecular (MIPs, del inglés “*molecularly imprinted polymers*”) han ido ganando terreno en el desarrollo de nuevos sensores (opto)químicos como elementos de reconocimiento biomiméticos debido a la selectividad que presentan y su relativa facilidad de síntesis.⁴⁶⁻⁴⁸ Dicha síntesis consiste en la obtención de una estructura macromolecular entrecruzada alrededor de una molécula que actúa como “plantilla” (el propio analito o una molécula estructural y funcionalmente lo más similar posible) que se extrae una vez obtenida la red polimérica, dejando cavidades selectivas para su reconocimiento posterior (**Figura 13**). Con anterioridad a la polimerización (y durante ésta), la molécula plantilla interacciona con los llamados “monómeros funcionales” en el seno del disolvente elegido, constituyendo aductos supramoleculares plantilla-monómero funcional. Seguidamente, se añaden el resto de los componentes de la mezcla de polimerización (i.e. monómeros entrecruzantes, monómeros diluyentes, disolvente e iniciador radicalario) y se lleva a cabo la polimerización para formar la estructura polimérica alrededor de la molécula plantilla. La elección de los componentes de la mezcla de polimerización, así como su proporción, son factores que determinarán las propiedades físico-químicas del material final.

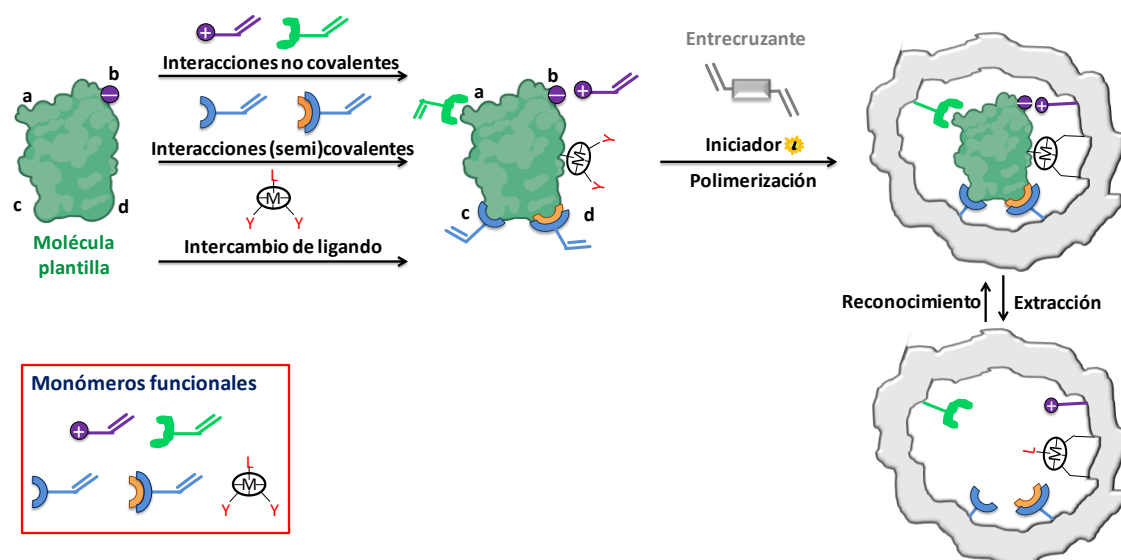


Figura 13. Esquema general de la preparación de un polímero de impronta molecular (MIP) y las interacciones más características que rigen el tipo de impronta: a) no covalente (fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno, apilamiento π - π); b) no covalente por interacciones electrostáticas; c) (semi)covalente; d) mediada por metales. Pueden darse simultáneamente varias de ellas en la síntesis de un determinado MIP.

A continuación, se explican las características de los distintos componentes de la mezcla polimérica.

- ❖ Monómero entrecruzante. Monómero con, al menos, dos unidades polimerizables. Estabiliza las cavidades formadas alrededor de la molécula plantilla y favorece que los grupos funcionales encargados de la interacción se encuentren en la posición óptima para el reconocimiento al formar una red covalente de polímero entrecruzada. La polaridad y la cantidad de entrecruzante empleado son factores que afectan directamente a las propiedades del material. La polaridad del entrecruzante se elige acorde con el tipo de interacción plantilla-monómero funcional, con el objetivo de obtener una mayor constante de unión y, por consiguiente, menores interacciones inespecíficas. El empleo de un elevado porcentaje de monómero entrecruzante con respecto al funcional, implica una mayor rigidez del material sintetizado. En cambio, un bajo porcentaje de entrecruzante genera geles con menor afinidad por el analito. Por ello, la proporción de monómero entrecruzante deber ser lo suficientemente alta como para mantener la estabilidad de las cavidades constituidas alrededor del analito, pero también lo suficientemente baja para permitir una rápida difusión del mismo a través de la red tridimensional. Por último, es importante elegir monómeros que presenten una reactividad similar para lograr una polimerización homogénea.^{49,50}
- ❖ Monómeros diluyentes. No participan en la interacción con la molécula plantilla pero sirven para modular la hidrofilia/hidrofobia de la matriz polimérica mejorando así el reconocimiento del analito.

- ❖ *Disolvente (también denominado “porógeno”)*. Es el responsable de la porosidad del material. Debe conferir a la red polimérica una estructura macroporosa con el fin de facilitar la difusión del analito en las cavidades selectivas. La elección del disolvente presenta una mayor relevancia en la impronta regida por interacciones no covalentes (enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o de van der Waals), donde la polaridad, constante dieléctrica y propiedades próticas/apróticas del medio son factores determinantes en la estabilidad del aducto molécula plantilla-monomero funcional. Es importante elegir un disolvente que favorezca las interacciones molécula plantilla-monomero funcional sin afectar al reconocimiento (p.ej. las interacciones por enlaces de hidrógeno desaparecen en un alcohol).^{51,52} Por último, el disolvente también es determinante en el reconocimiento del analito, ya que se puede generar un “efecto memoria” (mejor reconocimiento del analito en el disolvente en el que se llevó a cabo la polimerización).
- ❖ *Iniciador*. La polimerización por radicales libres se basa en la adición sucesiva de monómeros a centros radicalarios.⁵³ Este proceso comienza con la formación de un centro radicalario en un iniciador (vía fotoquímica mediante irradiación con luz UV/VIS o por vía térmica) y su posterior adición a los monómeros acrílicos/vinílicos presentes en la mezcla.

Finalmente, una vez preparado el polímero, se lleva a cabo la extracción de la molécula plantilla. Muchas veces existe la posibilidad de que cierta cantidad de la molécula plantilla quede atrapada en la red polimérica y esta se libere cuando se está utilizando el material, lo que se conoce como “sangrado”.⁵⁴ Por ello, en ocasiones, en lugar del propio analito se emplea como molécula plantilla un “sucedáneo” (*surrogate*) que presenta una estructura química semejante al analito que se quiere determinar. Además, el uso de estas moléculas supone una alternativa cuando el analito presenta una elevada toxicidad o su disponibilidad es limitada y cara. Una vez extraída la plantilla, en condiciones ideales, se obtienen cavidades selectivas (tamaño, forma) donde se encuentran los grupos funcionales encargados del reconocimiento del analito (**Figura 13**). Análogamente, y con el fin de demostrar la formación de las cavidades selectivas, se prepara el mismo polímero pero en ausencia de la molécula plantilla, lo que se conoce como polímero sin impronta molecular (NIP, del inglés “*non-imprinted polymer*”) o bien un polímero de control, en presencia de una molécula plantilla diferente pero con la misma funcionalidad que el analito (CIP, del inglés “*control imprinted polymer*”).

En la preparación de nuevos MIPs, la naturaleza de la interacción existente entre la molécula plantilla y los monómeros funcionales determina el tipo de impronta empleado (**Figura 13**). La *impronta covalente* se basa en la unión química de la molécula plantilla y el monómero funcional antes de llevar a cabo la polimerización. El enlace covalente establecido

entre ambos se caracteriza por ser lábil, de tal manera que la molécula plantilla pueda extraerse en condiciones hidrolíticas ácidas o básicas, o con calor. Algunos ejemplos son la formación de carbamatos, ésteres borónicos o iminas.⁵⁵ Una de las principales ventajas de esta aproximación es que los monómeros funcionales siempre se encontrarán en las cavidades selectivas al analito enlazados a éste, es decir, no existe una distribución al azar en la red polimérica. Sin embargo, este tipo de impronta presenta una baja versatilidad ya que está limitado a un determinado tipo de enlaces y grupos funcionales, así como una gran complejidad debido a la necesidad de rotura y posterior formación del enlace covalente para reconocimiento del analito.⁵⁶ En la *impronta no covalente*, las interacciones establecidas entre la molécula plantilla y el/los monómero(s) funcional(es), tanto en la preparación del MIP como en el ulterior reconocimiento del analito, no son covalentes (i.e. enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas o hidrofóbicas).⁵⁷ Dado que las interacciones no covalentes son mucho más débiles, en este tipo de impronta se suele emplear un exceso de monómeros funcionales para favorecer la formación del complejo. Esto implica que parte de los monómeros funcionales estén distribuidos por toda la red polimérica (también fuera de los sitios de unión), aumentando por consiguiente las interacciones no específicas.⁵⁸ Por último, la *impronta semicovalente* se basa en la unión covalente de la molécula plantilla y el monómero funcional. La extracción de la molécula plantilla tras la polimerización, por rotura del enlace covalente, generará grupos funcionales en las cavidades del MIP para el ulterior reconocimiento del analito a través de interacciones no covalentes.⁵⁹

3.1.3.2 Formatos físicos de los MIPs

Los MIPs se caracterizan por su versatilidad de síntesis en diferentes formatos físicos, lo cual es especialmente interesante para adaptar las propiedades deseadas dependiendo de su aplicación final. Algunos de los formatos más empleados en la preparación de MIPs incluyen:

- ❖ **Polímeros en bloque.** Es el formato más sencillo para la preparación de MIPs. El bloque obtenido ha de ser molturado y tamizado antes de su aplicación. Este procesado de la muestra presenta el inconveniente de la destrucción parcial de sitios de unión. Otra desventaja de este formato es la baja superficie específica del material obtenido (macropartículas), lo que limita su aplicación en sensores ópticos por la lenta cinética de unión con el analito como consecuencia de una lenta difusión en las cavidades heterogéneas de la red.⁶⁰
- ❖ **Partículas esféricas.** En este caso se parte de disoluciones muy diluidas de los componentes de la mezcla de polimerización.⁶¹ Los monómeros y oligómeros se van integrando lentamente hasta que el polímero alcanza el tamaño suficiente como para ocasionar la precipitación uniforme de partículas esféricas en la disolución. La

preparación de MIPs como partículas con tamaño uniforme solventa las principales limitaciones de la polimerización en bloque, ya que se obtienen nano/micro-partículas con una alta monodispersidad y mayor superficie específica que los polímeros en bloque.

- ❖ **Síntesis por moldeo.** En esta aproximación, el MIP se prepara utilizando un molde que generalmente se destruye después de la polimerización. Uno de los procedimientos más empleados es la polimerización en el interior de un molde de sílice sacrificable. El procedimiento para la síntesis de estos materiales consiste en la impregnación de la mezcla de polimerización en microesferas porosas de gel de sílice. A continuación, el molde se disgrega mediante la adición de ácido fluorhídrico. De esta forma se obtienen partículas MIP muy porosas cuyo tamaño depende del molde empleado. En la **Figura 14a** se muestra una micrografía SEM de micropartículas MIP obtenidas mediante este protocolo.
- ❖ **Partículas núcleo-recubrimiento.** En este caso, se crece una capa de MIP sobre un núcleo de otro material que dota de propiedades adicionales (ópticas, magnéticas, estructurales...) a las nanocapas de MIP (**Figura 14b**). Algunos de los núcleos utilizados son los puntos cuánticos (QDs, del inglés “*quantum dots*”), las nanopartículas de Au (para el desarrollo de sensores de resonancia de plasmón de superficie), partículas magnéticas o partículas de sílice. Una de las aproximaciones más útiles para la preparación de este tipo de nanopartículas es la polimerización por precipitación para obtener el núcleo, seguido del crecimiento controlado del MIP por polimerización por transferencia de cadena con adición-fragmentación reversible (RAFT, del inglés “*reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization*”).^{62,63}
- ❖ **Nanogeles.** Son materiales poliméricos con un bajo porcentaje de entrecruzamiento, una alta relación superficie/volumen, un pequeño tamaño (10 – 300 nm) y una gran afinidad por el analito, lo que les convierte, probablemente, en los materiales artificiales más próximos a los anticuerpos. Además, generalmente se preparan en medio acuoso lo que garantiza la compatibilidad con la impronta de proteínas.^{64,65} La principal limitación de estos materiales es su importante hinchamiento en ciertos disolventes, afectando a la cavidad selectiva del MIP.

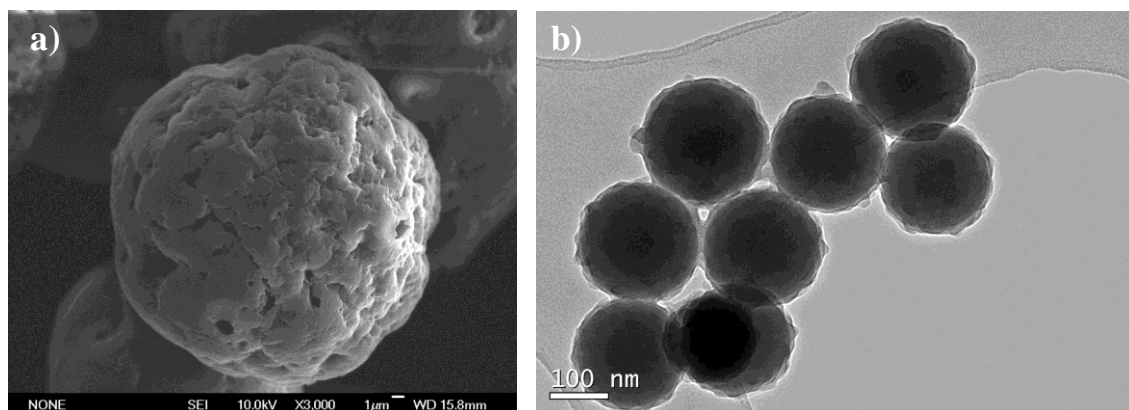


Figura 14. a) Micrografía SEM de partículas esféricas porosas sintetizadas utilizando un molde sacrificable de sílice. b) Micrografía TEM de partículas núcleo (SiO₂)-coraza(MIP).

3.1.3.3 Aplicaciones de los MIPs

Las aplicaciones de los MIPs pueden ser muy diversas como se muestra en la **Figura 15**. Destaca sobre todo su empleo como adsorbentes selectivos para la purificación o preconcentración de muestras en extracción en fase sólida (MISPE, del inglés, “*molecularly imprinted solid phase extraction*”).⁶⁶ Esta metodología se ha empleado, por ejemplo, en el análisis de micotoxinas en alimentos.^{67,68} Los MIPs también pueden utilizarse como catalizadores y, en concreto, como análogos enzimáticos artificiales. En este caso, para la síntesis del MIP, se puede emplear como molécula plantilla un sucedáneo del sustrato, del estado de transición o algún producto de la reacción catalítica.⁶⁹ Algunos de los MIPs más complejos son aquellos que se obtienen mediante impronta de proteínas para su aplicación en análisis diagnóstico, proteómica o análisis medioambiental.^{70,71} Esta complejidad se debe al gran tamaño de las proteínas, su elevada flexibilidad conformacional y su limitada solubilidad. Alternativamente, se puede proceder a la impronta de epítopos en lugar de la proteína completa. Un epítipo es un pequeño fragmento peptídico que representa la porción donde reside el reconocimiento de la macromolécula.⁷² Los MIPs también se emplean como sistemas de transporte y liberación controlada. Algunos ejemplos incluyen la aplicación de MIPs para la liberación sostenida de antioxidantes en “envases inteligentes”,⁷³ o la liberación controlada de fármacos, fotosensibilizadores o moléculas fluorescentes con aplicación en el tratamiento de diferentes enfermedades, en terapia fotodinámica o en imagen de tumores sólidos.⁷⁴

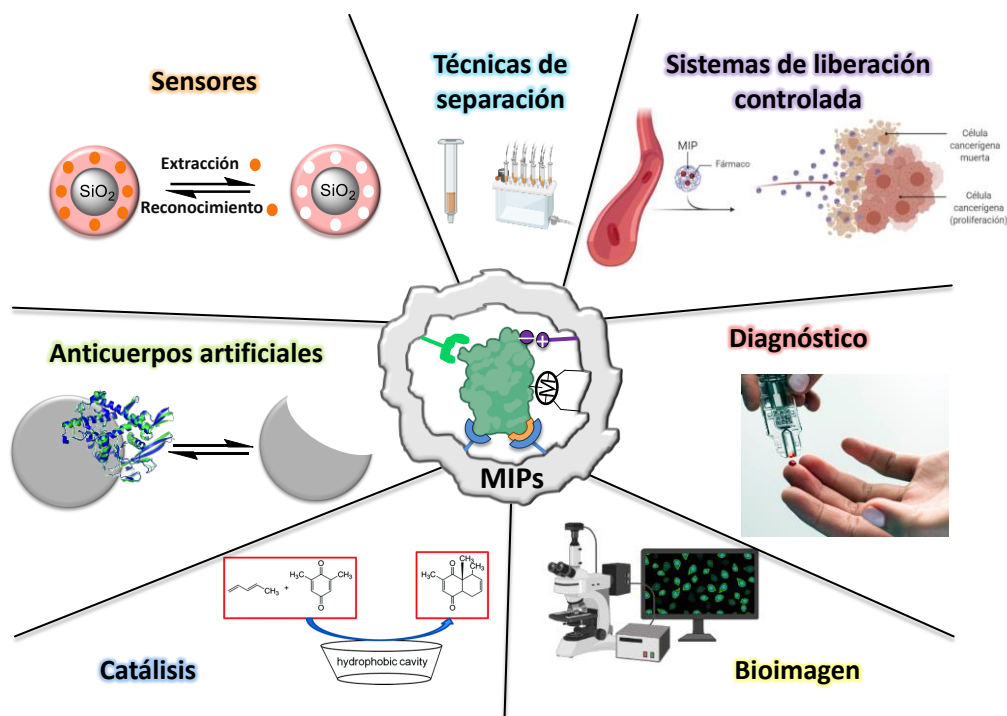


Figura 15. Principales aplicaciones de los polímeros de impronta molecular (MIPs).

Una de las aplicaciones más útiles es el empleo de MIPs para el desarrollo de **sensores químicos** biomiméticos (ópticos, electroquímicos o piezoeléctricos^{47,75,76}). El uso de estos materiales sintéticos presenta ventajas con respecto a los sensores basados en receptores biológicos (biosensores): gran estabilidad térmica y química, bajo coste o la posibilidad de llevar a cabo la detección tanto en medio orgánico como en presencia de agua. Más concretamente, el empleo de MIPs en combinación con la fluorescencia como método de transducción de la señal química (FMIPs), ha recibido una gran acogida en los últimos años debido a su elevada sensibilidad y versatilidad. Dado el bajo número de analitos fluorescentes, la preparación de materiales MIP con fluorescencia intrínseca es interesante ya que permite una detección directa sin necesidad de marcado del analito con sondas fluorescentes ni el empleo de ensayos competitivos.⁷⁷ A continuación se hace una clasificación de los FMIPs en dos grupos atendiendo a si han sido preparados a partir de monómeros funcionales fluorescentes o nanoestructuras fluorescentes.

FMIPs preparados a partir de monómeros funcionales fluorescentes. El anclaje covalente de una sonda fluorescente a la red polimérica del MIP puede lograrse incorporando *unidades polimerizables* en el fluoróforo. Para que dichos monómeros fluorescentes puedan considerarse además “*funcionales*”, deben ser capaces de establecer interacciones con la molécula objetivo (analito). Más aún, para que el reconocimiento molecular se pueda traducir en una señal óptica, la unión del analito ha de inducir un cambio electrónico en el *fluoróforo*.⁷⁸ Se considera así que estas sondas fluorescentes polimerizables son *trifuncionales* por la presencia

de una unidad polimerizable, una unidad de reconocimiento del analito y una unidad luminiscente encargada de convertir el reconocimiento molecular en una señal medible (**Figura 16**). Esto supone un reto importante ya que, muy a menudo, la trifuncionalización es difícil de llevar a cabo, los grupos requeridos no son químicamente ortogonales o la presencia simultánea de los grupos polimerizables, de reconocimiento y de señalización disminuye las prestaciones de cualquiera de ellos (o de todos). Muchas sondas fluorescentes comunes se han derivatizado con grupos (meta)acrilato, (meta)acrilamida, vinilo, estireno o grupos funcionales relacionados, para su polimerización radical con monómeros diluyentes y entrecruzantes que dan lugar a los MIPs. En la **Tabla 1** se muestran algunos ejemplos de FMIPs basados en monómeros trifuncionales empleando sondas luminiscentes (englobando sondas fluorescentes y fosforescentes) como complejos de Eu(III),⁷⁹ pireno,⁸⁰ fenazina⁸¹ o fenoxacinona⁸² derivatizadas con grupos acrilato o acrilamida. Los FMIPs preparados con monómeros fluorescentes cuya fluorescencia se *desactiva* por el analito presentan una menor sensibilidad que aquellos en los que la coordinación del analito induce un *incremento* de la luminiscencia ya que, en el segundo caso, se parte de una señal de fondo mínima que permite distinguir mejor la señal producida.

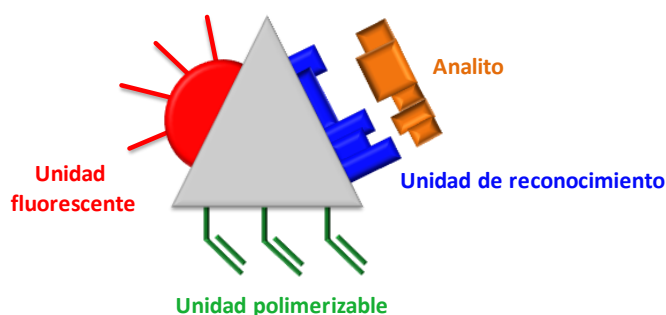


Figura 16. Componentes de un monómero trifuncional para la síntesis de un MIP fluorescente. El código de colores (rojo, unidad fluorescente; verde, unidad polimerizable y azul: unidad de reconocimiento) se mantendrá a lo largo de la memoria de tesis.

Nanoestructuras fluorescentes. Si la sonda fluorescente no presenta grupos funcionales que puedan interactuar directamente con el analito, la aproximación más común es el empleo de nanopartículas compuestas (núcleo-coraza o “*core-shell*”), en las que el fluoróforo está integrado en el núcleo y, alrededor de éste, se crece una capa de MIP (normalmente de espesor nanométrico). Una forma común de señalar la unión del analito en el FMIP es mediante la modulación de un proceso de transferencia de energía resonante de Förster (FRET) cuando el analito se une a las cavidades del MIP.⁸³ La FRET es un proceso fotoquímico dependiente de la distancia que puede revelar la proximidad de dos especies, un molécula dadora de energía (D) y una aceptora (A), por medio de la variación de la señal luminiscente. FRET se basa en una transferencia de energía desde una sonda D fluorescente en su estado excitado a una sonda A en su estado fundamental, siempre y cuando, D y A estén lo suficientemente próximos ($d < 10$ nm) y exista un solapamiento espectral significativo entre la emisión de D y la absorción de A. En el

ejemplo mostrado en la **Tabla 1**, el núcleo luminiscente está constituido por una nanopartícula de sílice dopada con un complejo de Ru(II) que actúa como molécula dadora de energía para la FRET. Alrededor del núcleo se crece una fina capa de MIP selectivo al antibiótico enrofloxacina y el analito se detecta mediante un ensayo competitivo entre la enrofloxacina marcada con un fluoróforo aceptor de energía y la enrofloxacina libre.⁸³

En las últimas dos décadas, el uso como fluoróforos de nanocristales semiconductores (3 – 10 nm, denominados puntos cuánticos, QDs) se ha extendido ampliamente. Los QDs poseen una intensa absorción de la luz, bandas estrechas de emisión con máximos modulables en función del tamaño del QD y una elevada fotoestabilidad. Sin embargo, la ausencia de receptores selectivos en su estructura limita su uso como sensores ópticos. Una forma de introducir elementos de reconocimiento en QDs es mediante su recubrimiento con una nanocapa de MIP. Las nanocapas de MIP se pueden crecer directamente sobre los núcleos de los QDs o bien sobre otro material (sílice, por ejemplo) en el que previamente se han embebido los QDs (**Figura 17**).⁷⁶ Para la preparación de MIPs basados en QDs se han empleado nanocristales de CdSe, CdSe/ZnS, CdTe y ZnS dopado con Mn. A pesar de las ventajas comentadas, los QDs presentan ciertas limitaciones en su uso en muestras biológicas reales debido a su toxicidad y riesgo medioambiental, ya que están formados por metales pesados como el Cd²⁺. Además, la necesidad de excitación en el UV compromete su uso para aplicaciones *in vivo*. Por lo tanto, han surgido otras nanoformas como alternativa, por ejemplo, los puntos de carbono (CDs).⁸⁴

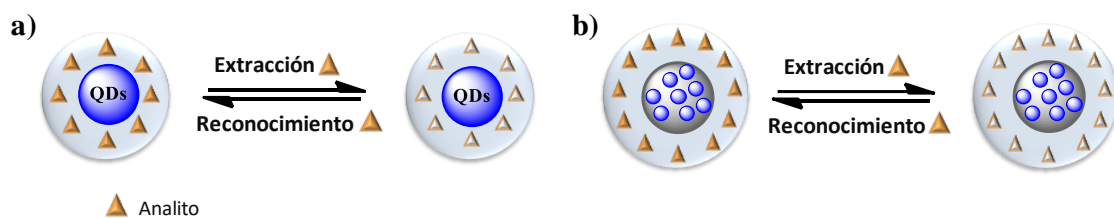


Figura 17. Representación esquemática (no a escala) de la detección de un analito utilizando MIP-QDs donde los QDs son el material de soporte (a) o están incorporados en un núcleo de SiO₂ (b).

Otros nanomateriales que se han empleado como luminóforos para el desarrollo de FMIPs son las conocidas como “*upconverting nanoparticles*” (UCNPs, nanopartículas de conversión ascendente de fotones). Se preparan a partir de un proceso de precipitación que da lugar a estructuras de 10 a 100 nm y están constituidas generalmente por fluoruro de itrio (YF₃) dopado con tierras raras como Eu³⁺ o Yb³⁺. Presentan una estrecha banda de emisión y elevada fotoestabilidad, haciendo posible la realización de medidas ultrasensibles ya que muestran un gran desplazamiento anti-Stokes (absorben dos o más fotones en el infrarrojo cercano y emiten un fotón en el UV-visible) y las medidas están libres de señal de fondo. Estas características permiten su uso en aplicaciones biológicas sin excitación de la fluorescencia intrínseca.

Tabla 1. Ejemplos de polímeros de impronta molecular fluorescentes (FMIPs) según la clasificación previamente establecida. El código de colores de los monómeros trifuncionales es acorde con la **Figura 16**, donde en rojo se señala la unidad fluorescente, en azul la unidad de reconocimiento y en verde la unidad polimerizable.

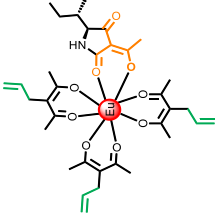
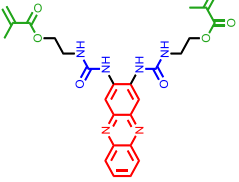
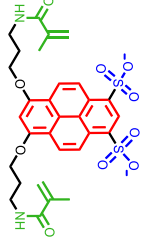
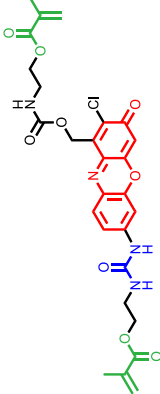
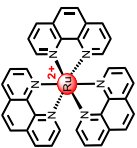
Tipo FMIP	Sonda fluorescente	Formato del sensor	Analito	LOD	Ref.
Monómeros funcionales fluorescentes		Microesferas porosas MIP luminiscente con plantilla sacrificable de sílice	Ácido tenuazónico	500 $\mu\text{g kg}^{-1}$	79
Monómeros funcionales fluorescentes		Coraza nanométrica de MIP luminiscente sobre núcleo de sílice	Aminoácidos fosforilados	70 nmol L^{-1}	81
Monómeros funcionales fluorescentes		Película de polímero en portaobjetos de cristal	Diquat Paraquat	162 nmol L^{-1} 281 nmol L^{-1}	80
Monómeros funcionales fluorescentes		Coraza nanométrica de MIP luminiscente sobre núcleo de sílice	Ácido 2,4- diclorofenoxiacético	28 $\mu\text{mol L}^{-1}$	82

Tabla 1. Continuación.

Tipo FMIP	Sonda fluorescente	Formato del sensor	Analito	LOD	Ref.
Nanoestructuras fluorescentes		Coraza nanométrica de MIP sobre núcleo de sílice luminiscente	Enrofloxacina	2 $\mu\text{mol L}^{-1}$	83
Nanoestructuras fluorescentes	Puntos cuánticos (CsPbBr ₃)	Núcleos de QDs recubiertos con MIP	Ometoato	18.8 ng mL ⁻¹	85
Nanoestructuras fluorescentes	Puntos de carbono	Núcleos de CDs recubiertos con MIP	Cr ³⁺ Pb ²⁺	27 nmol L ⁻¹ 34 nmol L ⁻¹	86
Nanoestructuras fluorescentes	<i>Upconverting Nanoparticles</i> (YF ₃ ; Eu ³⁺ o Yb ³⁺)	UCNPs recubiertos con MIP	Clembuterol	0.12 $\mu\text{g L}^{-1}$	87

3.1.4 Analitos diana: micotoxinas en alimentos

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de relativo bajo peso molecular producidas por hongos filamentosos que contaminan durante su cultivo, transporte o almacenaje alimentos como cereales, hortalizas o especias, entre muchos otros productos. Su acumulación supone un gran problema global, afectando negativamente a la economía así como a la salud de la población ya que su ingesta puede acarrear efectos adversos.⁸⁸ El impacto de la ingestión de estos metabolitos depende de varios factores como la concentración de las toxinas en los alimentos o la frecuencia de su consumo. Aunque los efectos provocados por la ingesta de estas toxinas en bajas concentraciones y cortos periodos de tiempo no son alarmantes, una exposición prolongada a estos metabolitos puede tener efectos crónicos en el ser humano.⁸⁹ En este contexto, ciertos estudios revelan el carácter carcinogénico, mutagénico, teratogénico, neurotóxico y/o nefrotóxico de estos metabolitos.^{90,91} La mayoría de los estudios anteriormente mencionados, sin embargo, únicamente evalúan los efectos tóxicos sobre la base de la ingesta de una única micotoxina. No obstante, hay que tener en cuenta que la presencia de varias toxinas en un mismo alimento puede tener un efecto sinérgico agravando su efecto nocivo.⁹²

Actualmente existen más de 100000 especies de hongos y más de 500 micotoxinas conocidas. Este hecho da una idea de la amplia distribución de estos metabolitos a nivel mundial, destacando su abundancia en zonas con temperaturas moderadas y tropicales.⁹⁰ Las micotoxinas se caracterizan por ser moléculas generalmente estables incluso a altas temperaturas y el procesado de los alimentos, ya sea por tratamiento térmico (cocción o extrusión) o a través de su limpieza o molienda, no garantiza su total eliminación.⁹³ A pesar de su amplia distribución mundial y de los graves efectos tóxicos que puede llegar a acarrear su ingesta, la Unión Europea (UE) únicamente ha establecido hasta la fecha niveles máximos permitidos y métodos de análisis para unas pocas micotoxinas. En la actualidad, está vigente en la UE el reglamento (CE) n°1881/2006,⁹⁴ que limita el contenido de algunas micotoxinas en ciertos alimentos (**Tabla 2**).

Algunas de las toxinas más abundantes son las producidas por los hongos del género *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. En la **Tabla 2** se muestran las estructuras químicas de algunas de las micotoxinas más estudiadas por sus efectos tóxicos y su abundancia, como son las aflatoxinas, fumonisinas, la zearalenona, la citrinina o las micotoxinas del género *Alternaria*. Por ejemplo, las aflatoxinas son metabolitos secundarios generados por hongos del género *Aspergillus* que se caracterizan por su amplia distribución en una gran variedad de productos, desde frutos secos (almendras, cacahuetes, pistachos o nueces) hasta productos lácteos o cereales y maíz.⁹⁵ Dependiendo de su estructura química, así como de su fluorescencia en el azul o en el verde, pueden clasificarse en B₁, B₂, G₁ o G₂.⁹⁶ Generalmente el contenido

máximo establecido por la UE para la suma de todas las aflatoxinas en el consumo humano, se encuentra en el intervalo de 4.0 – 15.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. En cambio, debido a la mayor toxicidad de la aflatoxina B₁, su consumo en cereales, cacahuetes o frutos secos no debe superar los 2.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$.⁹⁴

Como se ha mencionado, aún existen ciertas toxinas cuya regulación no se ha establecido en la UE. Entre ellas destacan las producidas por los hongos del género *Alternaria*. Estos hongos se caracterizan por ser capaces de producir más de 70 toxinas, de las cuales sólo unas pocas han sido caracterizadas químicamente (**Tabla 2**), como el ácido tenuazónico (TeA), el alternariol (AOH), el alternariol monometil éter (AME) o el altenueno (ALT). Estas micotoxinas participan activamente en la inhibición de las enzimas colinesterasas, provocan daños hepáticos y renales y/o presentan características teratogénicas y mutagénicas.⁹⁷ Además, recientemente se ha descrito su amplia distribución en una gran cantidad de alimentos.⁹⁸ Por ello, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha realizado un informe sobre los principales riesgos que acarrea la presencia de estas micotoxinas para la salud pública, reclamando su regulación en ciertos productos alimenticios.⁹⁹ Todo esto pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos métodos analíticos, suficientemente sensibles y selectivos así como económicos, para la determinación de micotoxinas *in situ* en diferentes matrices alimentarias, especialmente para micotoxinas *emergentes* cuyos límites máximos aún no se han establecidos.¹⁰⁰

Tabla 2. Principales micotoxinas presentes en alimentos, género del hongo que las produce e intervalo del contenido máximo permitido por la Unión Europea para distintos productos alimenticios.^{94,101}

Micotoxina	Estructura química	Género del hongo	Alimento (contenido máximo; $\mu\text{g kg}^{-1}$)
Ácido ciclopiazónico CPA		<i>Penicillium</i>	—
Ácido tenuazónico TeA		<i>Alternaria</i>	—
Aflatoxinas AF-B₁		<i>Aspergillus</i>	Cereales (4.0), maíz y arroz (10.0), frutos secos (4.0 – 15.0), higos (4.0 – 10.0) y especias (10.0)
Alternariol AOH		<i>Alternaria</i>	—
Alternariol monometil éter AME		<i>Alternaria</i>	—
Altenueno ALT		<i>Alternaria</i>	—
Citrinina Cit		<i>Penicillium</i>	Arroz fermentado con levadura roja <i>Monascus purpureus</i> (2000)
Fumonisininas (e.g. FB₁)		<i>Fusarium</i>	Maíz y productos elaborados en base a los mismos (200 – 60000)
Zearalenona ZON		<i>Fusarium</i>	Cereales productos elaborados en base a los mismos (20 – 100) maíz y productos elaborados en base a los mismos (20 – 400)

3.1.4.1 Ácido tenuazónico (TeA)

El ácido tenuazónico ((5S)-3-acetil-5-[(1S)-1-metilpropil]pirrolidina-2,4-diona, TeA) es una micotoxina derivada del ácido tetrámico producida principalmente por el hongo *Alternaria Alternata* (**Figura 18**), aunque también se ha descrito su biosíntesis por otros hongos del género *Poma Sorghina* y *Pyricularia Oryzae*.¹⁰² Se caracteriza por ser una molécula pequeña (PM = 197.2 g mol⁻¹), polar y con carácter ácido (pK_a = 3.5). Además, el TeA presenta tautomería ceto-enólica debido a su estructura β-dicarbonílica, siendo el tautómero más estable el que se muestra en la **Figura 18**.¹⁰³ Este carácter, le permite formar complejos con diferentes metales como calcio, magnesio, sodio, cobre y hierro. De hecho, el TeA suele comercializarse en forma de sal cúprica.¹⁰⁴

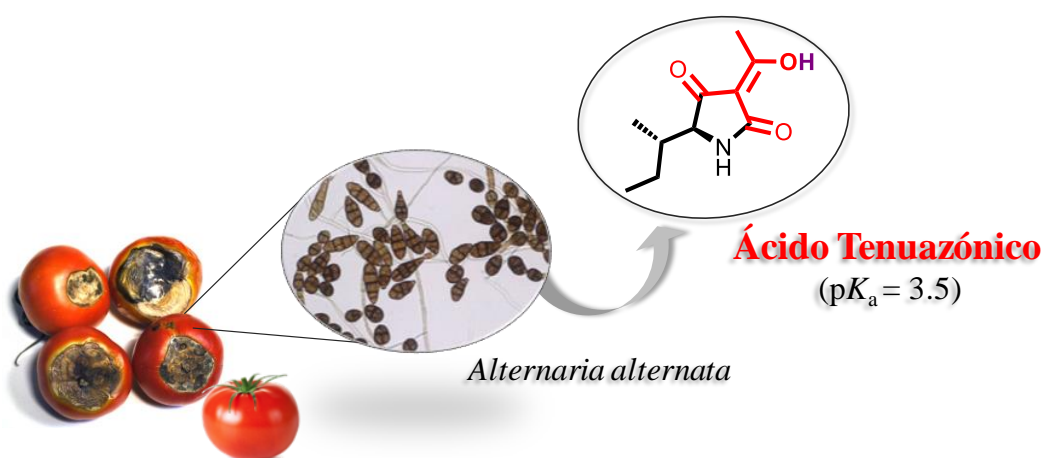


Figura 18. Estructura química de la micotoxina ácido tenuazónico producida por el hongo *Alternaria Alternata*.

3.1.4.2 Abundancia y toxicidad del TeA

El TeA se puede encontrar en una gran variedad de productos alimenticios como tomates, arroz, aceites, especias o el té, siendo favorable su acumulación en ambientes con elevada humedad y temperaturas alrededor de 21°C.¹⁰⁵ En los últimos años, el desarrollo de métodos y procedimientos más sensibles, ha permitido la detección del TeA en diferentes matrices alimentarias, poniendo de manifiesto su importante presencia en algunos alimentos. De acuerdo con un estudio realizado en Bélgica, se encontró un contenido máximo de 4000 µg kg⁻¹ de TeA en muestras de tomate.¹⁰⁶ En cambio, otros estudios han reportado un menor contenido medio de TeA en tomates (3.0 – 2330 µg kg⁻¹).¹⁰⁷ Además del alto contenido medio en el tomate, algunas encuestas confirman que un 92% de muestras de cereales y un 87% de muestras de especias dieron positivo en su contenido en TeA.¹⁰⁸ Otras publicaciones destacan la alarmante abundancia de esta micotoxina en alimentos para niños, especialmente en alimentos con mijo o sorgo (550 µg kg⁻¹).¹⁰⁹ Por último, un estudio realizado en Argentina confirma la coexistencia de TeA, AOH y AME en muestras de tomate. De las 80 muestras estudiadas, el TeA se encontró

en presencia de otra micotoxina del género *Alternaria* en al menos 10 muestras, lo que puede potenciar su efecto tóxico si el alimento se consume.¹¹⁰

Entre todas las micotoxinas producidas por hongos del género *Alternaria*, el TeA se considera una de las más tóxicas ya que se han reportado valores de dosis letal media (LD₅₀) en ratones macho de 182 o 225 mg kg⁻¹ de peso corporal (p.c.) y 81 mg kg⁻¹ p.c. en ratones hembra.^{111,112} Se considera un potente inhibidor de la biosíntesis de proteínas en los ribosomas de las células eucariotas y se caracteriza por inducir cambios precancerosos en la mucosa del esófago de ratones tratados con la misma.^{113,114} Además, presenta propiedades antivirales, bactericidas o herbicidas.^{111,115} En cuanto a su efecto en el ser humano, se cree que puede ser responsable de un desorden hematológico encontrado en África conocido como “*onyalai*”,¹¹⁶ aunque serían necesarias más pruebas toxicológicas para confirmar este hecho.

3.1.4.3 Métodos analíticos para la detección del TeA

La elevada toxicidad y gran abundancia del TeA en diferentes productos alimenticios ha provocado que el sector de la seguridad alimentaria se vuelque en la búsqueda de nuevos métodos analíticos para su detección. Debido a la relativa complejidad que presentan las diferentes matrices alimentarias, es necesaria una etapa de extracción y limpieza (incluso a veces una de preconcentración de la muestra) previa a su determinación analítica.¹¹⁷ En la **Tabla 3** se recogen algunas de las publicaciones más relevantes en la extracción y análisis del TeA en distintas matrices alimentarias. Una de las técnicas más empleadas es la extracción de las micotoxinas de acuerdo con su solubilidad, también conocidas como extracción líquido-líquido (LLE, del inglés “*liquid-liquid extraction*”) o extracción sólido-líquido (SLE, del inglés “*solid-liquid extraction*”). Un método alternativo que se caracteriza por su sencillez y efectividad para la extracción de las micotoxinas en alimentos es el método *QuEChERS* (del inglés “*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*”). *QuEChERS* se basa en una primera etapa de extracción del TeA con acetonitrilo y diferentes sales inorgánicas como el cloruro sódico (evita la extracción de otros elementos no deseados presentes en la matriz), seguida de una segunda etapa de limpieza o “*clean-up*” mediante extracción en fase sólida con el empleo de sulfato magnésico (favorece la extracción de las micotoxinas ya que adsorbe grandes cantidades de agua).¹¹⁸ A través de este metodología, se han obtenido recuperaciones mayores del 75% (**Tabla 3**).^{119–121}

Una vez se ha llevado a cabo la extracción de los componentes de la muestra, tiene lugar su detección analítica. En la determinación de micotoxinas, la metodología habitual es la cromatografía líquida (LC) acoplada a la detección por absorción UV-Vis (LC-DAD, del inglés “*diode array detector*”), por fluorescencia (LC-FLD) o mediante espectrometría de masas (LC-MS o detectores de masas en tándem LC-MS/MS). Como se observa en la **Tabla 3**, la gran mayoría de trabajos descritos para la detección del TeA emplean la técnica LC-MS/MS debido a

su elevada sensibilidad (bajos límites de detección y cuantificación) y alta especificidad (basado en la relación masa carga m/z). Además, otra ventaja de esta técnica con respecto a la LC-DAD o LC-FLD, es su capacidad para llevar a cabo un análisis simultáneo de varias micotoxinas. Sin embargo, esta metodología se caracteriza por ser compleja y requerir una instrumentación costosa, lo que implica personal cualificado a su cargo y una preparación laboriosa de la muestra impidiendo por consiguiente una detección *in situ* y rápida de las micotoxinas. Por ello, surgen nuevas metodologías con altas prestaciones como los inmunoensayos.¹²² Éstos se basan en el uso de receptores biológicos como los anticuerpos para el reconocimiento selectivo de la micotoxina. Algunos de los métodos empleados para la detección del TeA son los ensayos tipo ELISA¹²³ (del inglés “*enzyme linked immunosorbent assay*”) o LFIA¹²⁴ (del inglés “*lateral flow immunoassay*”). Uno de los formatos más comunes en el ensayo tipo ELISA consiste en la unión covalente de una enzima al anticuerpo cuya función es generar un sub-producto que sea detectable por cambio de color o por su fluorescencia. Esta misma metodología se emplea en los ensayos tipo LFIA, donde el inmunoensayo se realiza por capilaridad en tiras reactivas que cambian de color en presencia del analito. Estos ensayos se caracterizan por su simplicidad, por ser relativamente baratos y por la capacidad de detectar *in situ* diferentes micotoxinas como método de cribado, pero requieren la generación por animales, el aislamiento y la purificación del correspondiente anticuerpo.¹²²

Otra alternativa que destaca por su selectividad y sencillez es el empleo de MIPs (ver sección 3.1.3). Recientemente se ha descrito el primer MIP luminiscente para la detección selectiva del TeA en arroz.⁷⁹ En este estudio, se explota el carácter bidentado de la entidad tipo β -dicetonato del TeA y el hecho de que puede ejercer como ligando (cromóforo) antena y sensibilizar la emisión típica del catión Eu(III) a 615 nm ($\lambda_{exc} = 337$ nm). El MIP se prepara en formato de micropartículas porosas incorporando un complejo mixto Eu(III)–TeA–monómeros quelantes con estructura tipo β -dicetonato (alilmalonato de dietilo o acetoacetato de alilo), donde el TeA ejerce de molécula plantilla que se extrae una vez formada la red polimérica. La presencia de TeA en una muestra se pone de manifiesto con un incremento de la luminiscencia del material polimérico a 615 nm en disolvente orgánico como consecuencia de la incorporación del analito a la esfera de coordinación del Eu(III). El material luminiscente se aplicó en muestras de arroz, mostrando un LOD de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Aunque su sensibilidad está lejos de otros métodos mencionados anteriormente para el análisis del TeA, este trabajo abre el camino para el desarrollo de nuevos polímeros luminiscentes de impronta molecular capaces de reconocer al TeA de forma más sensible, rápida, eficaz y económica.

Tabla 3. Métodos analíticos descritos en bibliografía para la determinación del ácido tenuazónico.

Matriz	Recuperación (%)	Técnica de análisis	LOD / LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$ o $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Ref.
Tomate, zumo de manzana, cerveza, aceitunas y albahaca	51.1 – 70.1 61.0 – 80.6 50.3 – 63.8	LC-MS/MS	1220 / 4060 3120 / 1039 6130 / 2040 6130 / 2023	125
Productos de tomate	96.7 – 102.0	LC-MS/MS	0.86 / 2.89	107
Trigo	70.0	LC-MS/MS	2.5 / 7.5	126
Productos de tomate, zumos, aceites y semillas de girasol	52.0 – 102	LC-MS/MS	3.6 – 34 / 12 – 110	127
Productos de tomate	87.0 – 110.6	LC-MS/MS	3.0 – 18.3 / 1.1 – 61.5	119
Trigo, maíz, arroz y cebada	90 – 96	LC-MS/MS	20.0 – 42.0 / 80.0 – 150	120

Tabla 3. Continuación.

Matriz	Recuperación (%)	Técnica de análisis	LOD / LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$ o $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Ref.
Baya de goji	76.4 – 81.2	LC-MS/MS	0.07 – 0.24 / 0.32 – 0.77	121
Zumos de frutas	84.3 – 95.4	LC-MS/MS	$(5 - 20) \times 10^{-5} / (1 - 5) \times 10^{-5}$	128
Fresas	71.4 – 89.4	LC-ESI-MS/MS	0.005 / 0.016	129
Trigo Zumo de manzana	118 – 124 90 – 97	LFIA	1264.0 – 65.3 / n.d	124
Arroz, harina y zumo de manzana	80.1 – 113.5	IEQ IEB	0.3 – 0.1 / n.d	130
Zumo de manzana o uva y cerveza de trigo	85.0 – 120.0	ELISA	1.0 / n.d	123
Arroz	n.d.	Luminiscencia (MIP)	500 / 1700	79

n.d.: No descrito. ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas; ESI: Ionización por electrospray; IEQ: Inmunoensayo enzimático quimiluminiscente; IEB: Inmunoensayo enzimático bioluminiscente; LFIA: Inmunoensayo de flujo lateral; LC: Cromatografía líquida; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; MIP: polímero de impronta molecular; MS/MS: Espectrometría de masas en tándem.

3.1.4.4 MIPs luminiscentes para la detección de TeA: estrategias de diseño

Los polímeros de impronta son excelentes candidatos para el desarrollo de sensores debido a su simplicidad de síntesis, estabilidad, y selectividad de reconocimiento. Por ello, existen numerosos ejemplos en bibliografía sobre su empleo como sensores en seguridad alimentaria.¹³¹ En el desarrollo de estos materiales, el reconocimiento molecular basado en interacciones electrostáticas o enlaces de hidrógeno cobra especial importancia debido al gran número de analitos aniónicos.^{132,133} Concretamente, los aniones carboxilato suscitan un gran interés debido a su presencia en aminoácidos, ácidos grasos o enzimas. Un ejemplo destacable dentro de estas especies aniónicas son las micotoxinas carboxiladas generadas por hongos que contaminan una gran cantidad de alimentos (ver sección 3.1.4).

El reconocimiento de aniones carboxilato se ha llevado a cabo desde 1992 mediante el empleo de derivados tipo urea o tiourea.^{134,135} Las ureas y tioureas poseen dos grupos paralelos dadores de enlaces de hidrógeno –NH, que les permite establecer simultáneamente con gran eficiencia dos enlaces de hidrógeno direccionales con aniones con geometría tipo “Y” como el acetato (**Figura 19**).¹³³ Un aspecto a tener en cuenta en la formación de enlaces de hidrógeno, es la acidez que presentan los grupos NH (mayor en tioureas) y su interacción con aniones de marcado carácter básico en medio orgánico como el fluoruro. En este último caso, es complicado discernir entre la formación de enlaces de hidrógeno o la transferencia de un protón del grupo N-H al anión.

Con el fin de cuantificar el reconocimiento del analito, estos receptores pueden integrarse en moléculas ópticamente activas, de forma que la interacción con la molécula objetivo induzca un cambio en el color, absorción o fluorescencia de la molécula. Existen numerosos ejemplos donde funciones urea o tiourea se integran en estructuras tipo antraceno,¹³⁶ fenoxacina¹³⁷ o pireno,¹³⁸ entre muchas otras, para la detección de aniones acetato.

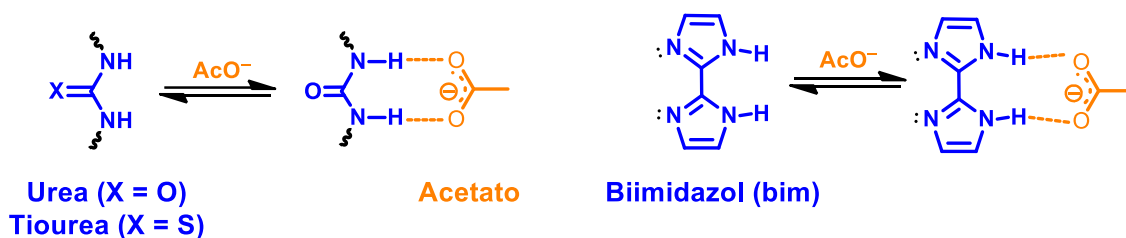


Figura 19. Urea y biimidazol como grupos de reconocimientos de oxoaniones (ej. acetato).

Además de las estructuras tipo urea/tiourea, existen otros receptores comúnmente empleados en el reconocimiento de aniones como las derivados del catión guanidinio, del anillo pirrol o del biimidazol (bim, **Figura 19**).¹³⁹ Este último, presenta propiedades particularmente

interesantes: mientras que sus grupos $-NH$ pueden participar en la formación de enlaces de hidrógeno con un oxoanión, los átomos de N tipo imino pueden formar un quelato con un centro metálico, por ejemplo el catión Ru(II). Se ha descrito de hecho la aplicación de complejos de Ru(II)-biimidazol como sondas de reconocimiento de oxoaniones (AcO^- , HSO_4^- y $H_2PO_4^-$) y diferentes halogenuros.^{140,141} Sin embargo, el estudio de su interacción con especies aniónicas con ángulos mayores como los β -dicetonatos no se ha descrito aún. Los β -dicetonatos surgen como una nueva familia de aniones cuyo reconocimiento presenta un particular interés para el análisis de moléculas intermediarias en el desarrollo de fármacos (ej. en la síntesis de fármacos como el celecoxib o el deracoxib),¹⁴² aditivos (ej. curcumina),¹⁴³ contaminantes alimentarios (micotoxinas como el ácido tenuazónico o el ácido ciclopiazónico) o especies bioactivas (ej. malonil coenzima A).¹⁴⁴

El grupo biimidazol también se ha empleado en el desarrollo de polímeros conjugados luminiscentes para la detección de aniones fosfato o aminoácidos como la cisteína.^{145,146} Los polímeros conjugados basan su estructura en la unión de monómeros aromáticos unidos por dobles o triples enlaces, favoreciendo la deslocalización electrónica a lo largo de todo el esqueleto polimérico. Una vez irradiado el polímero, el excitón migra a lo largo de la cadena conjugada y queda atrapado (se desactiva) al encontrar un sitio de unión enlazado al analito (*quencher*), lo que aumenta la eficacia del proceso de desactivación.

En esta tesis doctoral se explorará el empleo de MIPs luminiscentes derivatizados con complejos de Ru(II) para el reconocimiento y detección de la micotoxina TeA. Para ello se abordará la síntesis de un monómero trifuncional cuya unidad de reconocimiento será el grupo 2,2'-biimidazol (bim), la unidad señalizadora un complejo luminiscente de Ru(II) y que integrará unidades polimerizables tipo acrilato o alílico.

3.2 Fotosensibilizadores para la generación de especies reactivas de oxígeno. Oxígeno singlete (1O_2) y anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

3.2.1 Aplicaciones del 1O_2 y $O_2^{\cdot-}$ en el ámbito de las terapias fotodinámicas

La terapia fotodinámica (TFD) es una modalidad terapéutica clínicamente aprobada para el tratamiento de enfermedades asociadas a la hiperproliferación celular como el cáncer, o el tratamiento de infecciones microbianas.¹⁴⁷ La TFD consiste en el uso de un fotosensibilizador para la generación *in situ* de especies reactivas de oxígeno (ROS) con el objetivo de promover daño oxidativo en las células o microorganismos diana con la consiguiente muerte celular.¹⁴⁸ Como se ha mencionado anteriormente (sección 2.5), existen dos tipos de mecanismos en la fotogeneración de ROS (**Figura 20a**). En el mecanismo tipo I, se produce una transferencia electrónica desde biomoléculas circundantes (ej. proteínas) al $^3FS^*$ para generar distintas

especies radicalarias que finalmente dan lugar al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este último, puede ser transformado enzimáticamente en el interior de las células a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD).³⁰ En esta reacción se libera oxígeno que puede ser reciclado en el proceso (**Figura 20b**). El H_2O_2 puede seguir reaccionando a través de la reacción Haber-Weiss/Fenton²⁰ para, finalmente, generar el radical hidroxilo ($\cdot OH$), extremadamente citotóxico. En el mecanismo tipo II, el $^3FS^*$ transfiere su energía a las moléculas de oxígeno (3O_2) que puedan colisionar con él, para generar oxígeno singlete (1O_2). A pesar del corto tiempo de vida de esta especie en medio acuoso ($<0.04 - 3.5 \mu s$), el 1O_2 es lo suficientemente reactivo para producir un importante daño oxidativo a su alrededor.¹⁴⁹

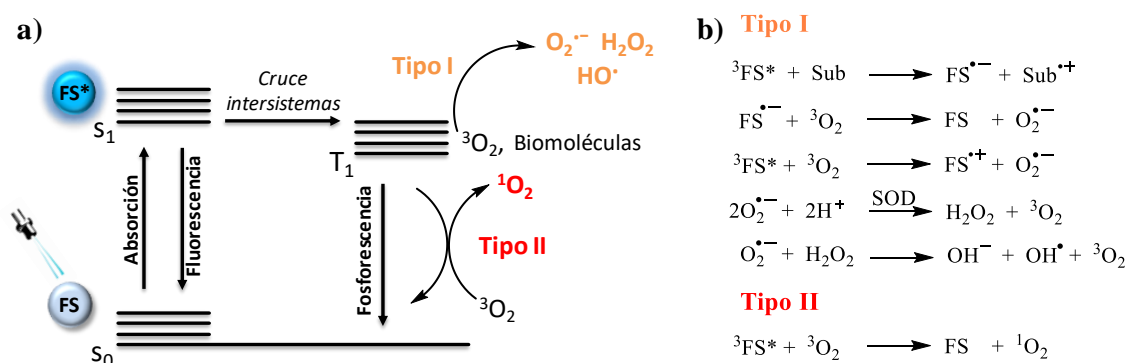


Figura 20. a) Mecanismo de la fotosensibilización de O_2 para la generación de especies reactivas de oxígeno a partir de la activación de un colorante (fotosensibilizador) por absorción de luz de una longitud de onda específica. b) Representación esquemática de las reacciones fotoquímicas más importantes durante la TFD (Sub = substrato biológico; SOD = superóxido dismutasa).

Esta terapia es particularmente beneficiosa para el tratamiento de ciertos cánceres ya que imparte dos grados de selectividad. Cuando el FS es administrado al paciente local o sistémicamente y sin que se conozcan exactamente los mecanismos de ello, el FS muestra una gran tendencia a acumularse en el tejido tumoral (**Figura 21**). Además, la fototoxicidad se limita únicamente a los tejidos donde se lleve a cabo la irradiación.¹⁵⁰ Su relativamente baja toxicidad (en oscuridad) y escasa resistencia farmacológica ha dado lugar a que, en las últimas décadas, su estudio en el tratamiento del cáncer haya experimentado un crecimiento exponencial frente a otras terapias más agresivas como la quimio o radioterapia.¹⁵⁰ Generalmente, cuando la TFD se emplea para el tratamiento de tumores sólidos, se requiere el empleo de FS capaces de absorber en el intervalo rojo a infrarrojo cercano (600 – 900 nm), también conocido como la “ventana biológica terapéutica” de la TFD. La **Figura 21** muestra que la capa más externa de la piel, la epidermis, actúa como un filtro natural frente a la irradiación ultravioleta. Sin embargo, la luz roja tiene un mayor grado de penetración por la ausencia de cromóforos en las biomoléculas capaces de absorber esta radiación.^{151–153}

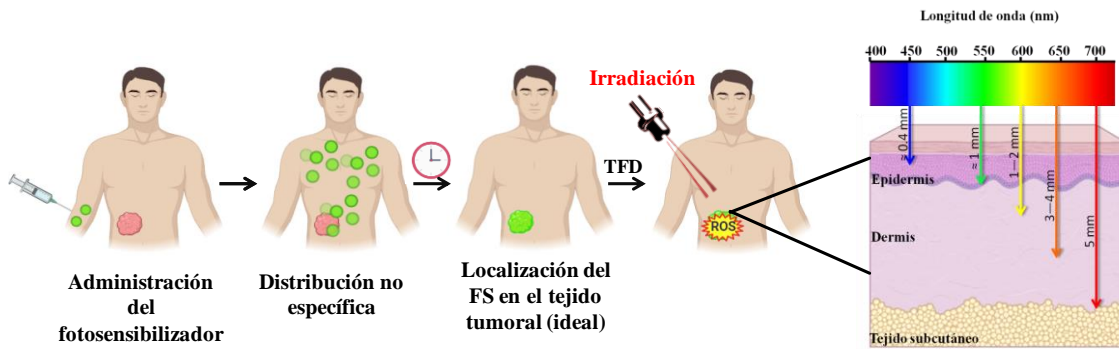
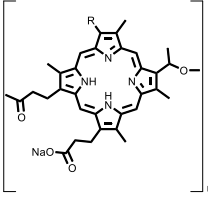
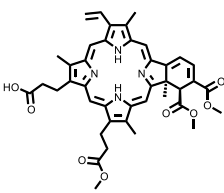
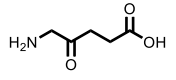
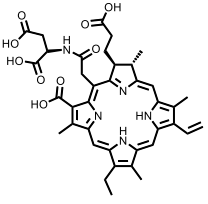
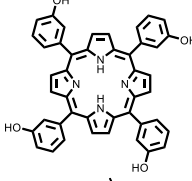
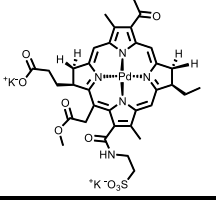


Figura 21. Representación esquemática del proceso clínico de la TFD así como la profundidad de penetración de la luz de diferentes longitudes de onda a través de la piel.

Hoy en día existen más de 300 estudios en fases clínicas sobre el uso de esta terapia para el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Sin embargo, el número de fármacos actualmente aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA) de los EEUU o la Agencia Europea de los Medicamentos (EMA) es aún pequeño.¹⁵⁴ Los fármacos actualmente comercializados para su uso en TFD presentan una estructura común compuesta por un anillo tetrapirrólico tipo porfirina o clorina (o sus precursores biológicos, como el ácido aminolevulínico) (**Tabla 4**). Una de las ventajas principales de este tipo de compuestos orgánicos es su intensa absorción en la ventana biológica.

El Photofrin[®] fue el primer fármaco aprobado (1995) para su uso fotodinámico contra el cáncer de esófago. Hoy en día se sigue empleando, a pesar de su larga persistencia en el organismo tras su administración (ca. dos meses), lo que implica que, durante y después del tratamiento, el paciente no pueda exponerse a la luz del sol así como otras fuentes intensas de luz. Este inconveniente es menos acusado en fotosensibilizadores de segunda generación como el Visudyne[®], cuya vida media de circulación en el organismo es de sólo 48 h.¹⁵⁴ Un ejemplo destacable, es la porfirina de paladio aprobada recientemente, TOOKAD[®]. Este FS que se aplica en el tratamiento del cáncer de próstata, posee una buena solubilidad y un máximo de absorción a 762 nm, que permite que la luz penetre en los tejidos el doble que en el caso de Photofrin[®].¹⁴⁹

Tabla 4. Perspectiva general de los fotosensibilizadores aprobados clínicamente para TFD.

Nombre genérico	Estructura molecular	λ_{exc} (nm)	Mecanismo TFD	Aplicación
Photofrin®		630	Tipo II	Cáncer de esófago, adenocarcinoma de pulmón y cáncer endobronquial
Vysudine®		690	Tipo II	Degeneración macular relacionada con la edad
Ácido aminolevulínico		635	Tipo II	Queratosis actínica
Laserphyrin®		664	Tipo II	Cáncer de pulmón temprano
Foscan®		652	Tipo II	Cáncer de cuello
TOOKAD®		762	Tipo I	Cáncer de próstata

Un inconveniente es que estas moléculas orgánicas suelen presentar una baja solubilidad en agua y una tendencia a formar agregados (disminuyendo su rendimiento cuántico de producción de 1O_2), una relativa inestabilidad fotoquímica, una síntesis tediosa (pobre rendimiento y difícil purificación) y una baja selectividad frente a las células diana.¹⁵⁵ Con el objetivo de paliar estas limitaciones, se hace necesario el desarrollo de nuevos FS.¹⁵⁶ En este contexto, los compuestos de coordinación de Ru(II) con ligandos quelantes poliazaheteroaromáticos pueden constituir una interesante alternativa por sus principales ventajas:¹⁵⁷

- ❖ Relativamente largos tiempos de vida de emisión (0.1 – 7 μ s).
- ❖ Elevados rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete ($\Phi_{\Delta} > 0.5$ en disolvente orgánico y $\Phi_{\Delta} > 0.2$ en agua). Ya hemos visto que los complejos de Ru(II) presentan un elevado rendimiento cuántico de cruce intersistemas por el efecto del átomo pesado, aunque el mismo efecto hace disminuir el tiempo de vida de su estado triplete y, con ello, la eficiencia de desactivación por el oxígeno.
- ❖ Gran estabilidad desde el punto de vista térmico, químico y fotoquímico.
- ❖ Mediante la selección juiciosa de los ligandos de coordinación se pueden modular las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del complejo de Ru(II) fotosensibilizador.
- ❖ La selección del contraión modula la biocompatibilidad y solubilidad de los complejos, e.g. sus cloruros se caracterizan por una importante solubilidad en medio acuoso.

Así, por ejemplo, en el diseño de nuevos complejos de Ru(II), cabe destacar el preparado por el grupo de McFarland, denominado TLD1433, que actualmente se encuentra en fase clínica II en Canadá para el tratamiento del cáncer de vejiga (**Figura 22**).¹⁵⁸ Este complejo basa su efecto terapéutico en un mecanismo tipo I + tipo II tras su activación con luz verde ($\lambda_{exc} = 525$ nm).

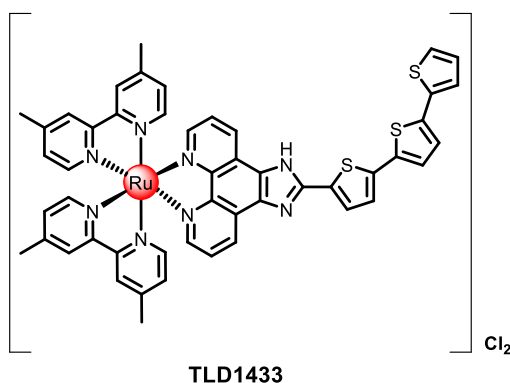


Figura 22. Estructura química del fotosensibilizador TLD1433 preparado por el grupo de McFarland que actualmente se encuentra en fase clínica para el tratamiento fotodinámico del cáncer de vejiga.

Otras alternativas para aumentar la eficiencia del tratamiento fotodinámico es el uso de la nanotecnología.¹⁵⁹ La encapsulación de los FSs en nanoformulaciones ha representado un gran avance en la resolución de ciertos problemas asociados al FS y la TFD convencional.^{160,161,162}

- ❖ Las nanopartículas presentan una relación área superficial/volumen muy grande, lo que implica que se puede encapsular un número elevado de moléculas de FS.
- ❖ Puede evitar la degradación prematura del compuesto orgánico en el plasma sanguíneo, previniendo su acumulación inespecífica en el tejido sano.

- ❖ Es posible aumentar la hidrofilia del FS modulando las propiedades superficiales de la nanoformulación.
- ❖ Favorece el fenómeno de permeabilidad y retención acumulada (EPR), es decir, la capacidad de los tumores de facilitar la difusión de las nanopartículas y su retención en el tejido tumoral debido a la baja vascularización linfática del tumor.
- ❖ Puede diseñarse específicamente para mejorar sus propiedades físicas como la biocompatibilidad, la biodistribución o la internalización en la célula. Además, pueden estar derivatizadas en superficie con agentes diana que favorezcan la selectividad y acumulación en el tejido tumoral.

Se han utilizado múltiples materiales para el desarrollo de nuevas nanoconstrucciones que sirvan de vehículo de las moléculas orgánicas del FS.¹⁶² Algunos ejemplos de polímeros biocompatibles actualmente aceptados por la FDA son el poli(etilenglicol) (PEG), el ácido poli(láctico) (PLA) o el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), en los que el FS puede liberarse por degradación hidrolítica del material.^{163,164} Otro ejemplo es el uso de liposomas compuestos por lípidos naturales o sintéticos que se caracterizan por ser capaces de albergar compuestos hidrofílicos en su núcleo acuoso o compuestos hidrofóbicos en sus láminas lipofílicas.¹⁶⁵ Por último, cabe destacar el diseño de nanopartículas basadas en macromoléculas naturales como la albumina,¹⁶⁶ el ácido hialurónico (HA)¹⁶⁷ o el quitosano.¹⁶⁸

El uso de fotosensibilizadores para la producción de ROS no queda únicamente restringido al tratamiento del cáncer. Esta técnica puede emplearse para otras aplicaciones como:

- ❖ El tratamiento del acné, la rosácea, la enfermedad de Bowen o para el rejuvenecimiento de la piel.¹⁶⁹
- ❖ Bactericida, convirtiéndose en una buena alternativa a los antibióticos, que presentan el problema de generación de resistencia bacteriana.¹⁷⁰ Esta técnica se puede emplear en la desinfección de aguas,¹⁷¹ de superficies¹⁷² o de infecciones producidas por películas bacterianas.
- ❖ Agente virucida, siendo las moléculas objetivo los ácidos nucleicos (ADN o ARN), proteínas víricas o, si están presentes, lípidos virales.¹⁷³

3.2.2 Aplicaciones del $^1\text{O}_2$ en métodos bioanalíticos de detección óptica con amplificación fotoquímica

La técnica de transducción por $^1\text{O}_2$ en inmunoensayos homogéneos luminiscentes de proximidad mediante amplificación fotoquímica, se caracteriza por ser una metodología de una alta sensibilidad. Esta técnica se describió por primera vez en 2008 por Beaudet *et al.*¹⁷⁴ y es comercializada actualmente por Perkin-Elmer bajo el nombre de AlphaLISA® y AlphaScreen® (donde “Alpha” hace referencia a “*amplified luminescent proximity homogeneous assay*”). Este ensayo se basa en la generación de una especie luminiscente por reacción con el $^1\text{O}_2$. La señal luminiscente únicamente se genera cuando dos tipos de nanopartículas (NPs), dadoras de $^1\text{O}_2$ (D) y receptoras de $^1\text{O}_2$ (A), están lo suficientemente próximas (como ocurre por ejemplo cuando hay reconocimiento del analito como un sándwich entre los correspondientes anticuerpos anclados a la superficie de dichas nanopartículas D y A) como para que haya transferencia eficaz de $^1\text{O}_2$ de las NPs D a las A (**Figura 23**). Las NPs dadoras contienen un fotosensibilizador tipo ftalocianina que, tras ser irradiado a 680 nm, es capaz de generar $^1\text{O}_2$. Las NPs receptoras están funcionalizadas con anticuerpos anti-analito para enlace del analito (inmunoensayo tipo “*sándwich*”) y están dopadas además con un derivado de tioxeno capaz de reaccionar irreversiblemente con el $^1\text{O}_2$ generando un producto inestable que libera energía al descomponerse. Esta energía se transfiere a un fluoróforo que se encuentra co-encapsulado en las NPs generando una señal analítica a 520 – 620 nm (quimioluminiscencia).¹⁷⁵ El $^1\text{O}_2$ generado por la ftalocianina no es capaz de recorrer más de 200 nm (tiempo de vida de $^1\text{O}_2$ en agua es de unos 3.5 μs),¹⁷⁶ por lo que únicamente se genera la señal luminiscente cuando las NPs se encuentren lo suficientemente próximas (aproximación por enlace del analito, **Figura 23**). La posibilidad de emplear una longitud de onda de excitación distinta (azul/verde) hace que el empleo de los complejos de Ru(II) como fotosensibilizadores de ROS sea una alternativa interesante en este tipo de ensayos.

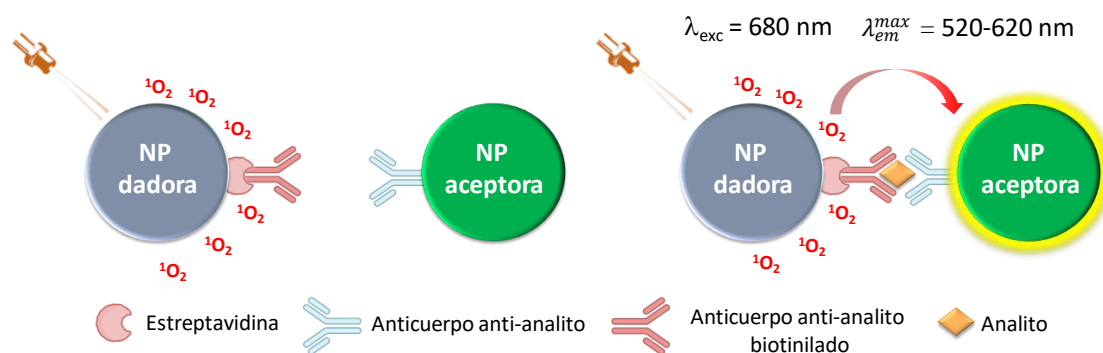


Figura 23. Esquema de la amplificación fotoquímica mediante el empleo de $^1\text{O}_2$ en un bioensayo de proximidad.



AIM OF RESEARCH

The aim of this thesis is to explore and capitalize on the unique spectroscopic and photochemical features of ruthenium(II) polypyridyl complexes for optical sensing and photodynamic applications. The judicious molecular design will allow us to tune the ground- and excited-state optical properties of the Ru(II) complexes for particular applications.

For the development of optical chemosensors, we have devoted our efforts to the detection of tenuazonic acid (TeA), a widespread mycotoxin produced by *Alternaria* fungi, for which there is not currently EU legislation with standard protocols for its determination in food. Taking into consideration our expertise in the molecular design of Ru(II) complexes as luminescent sensors on the one hand, and in the preparation of molecularly imprinted polymers (MIPs) on the other hand, we have explored the possibility of combining both materials for the development of luminescent sensors for the selective detection of TeA.

A second main objective of this thesis work is related to the design of novel Ru(II) photosensitizers for generating reactive oxygen species, either for the development of proximity-based immunoassays (AlphaScreen[®]-like) or for their application in photodynamic therapies. It will be important to evaluate the contribution of the two types of mechanisms (Type I and Type II) in the generation of ROS for evaluating the potential of the designed Ru(II) complex to induce oxidative damage on the target cells.

In this way, the specific objectives of this thesis are:

1. The synthesis and characterization of *Ru(II) complexes for luminescent chemosensor design*. We propose to integrate a 2,2'-biimidazol (bim) ligand in the Ru(II) coordination sphere as the receptor moiety for molecular recognition of 1,3-dicarbonylic compounds such as TeA. In particular, the following tasks will be carried out in this regard:
 - 1.1. Evaluation of the optical properties of the Ru(II)-bim probes and their spectroscopic response towards different analytes such as fluoride (F⁻), acetate (AcO⁻) or tenuazonate (TeA⁻).
 - 1.2. Investigation of the binding between different Ru(II)-bim complexes and TeA, both spectroscopically (UV-Vis, fluorescence and NMR) and by computational chemistry.
 - 1.3. Comparison and rationalization of the experimental and computed results obtained for the different Ru(II)-bim complexes.
2. The preparation of luminescent *molecularly imprinted polymers* for the *selective detection of TeA*. We propose the functionalization of the luminescent Ru(II)-bim

complexes with polymerizable units so that they can be tethered to a polymer matrix.

The following tasks will be carried out in this regard:

- 2.1. Synthesis and characterization of a trifunctional Ru(II)-bim-polypyridyl monomer.
 - 2.2. Preparation of luminescent MIPs employing a synthetic TeA as the molecular template. Different MIP formats will be considered in order to optimize the sensor response. Nevertheless, the use of composite core-shell nanoparticles, where the MIP can be grown as a few nanometer thick layer, is expected to provide fast responsive polymers.
 - 2.3. Structural and spectroscopic characterization of the obtained luminescent MIPs.
 - 2.4. Evaluation of the analytical features of the luminescent materials (the MIPs and also the corresponding non-imprinted, NIP, solids for studying the influence of the imprinting process on the selectivity of the molecular recognition process).
3. The synthesis and characterization of novel Ru(II)-bim photosensitizers for generating ROS. Different complexes will be prepared by varying the chemical structure of the ancillary ligands (with electron withdrawing, electron donating or hydrophobic substituents) in order to study their effect on the photogeneration of ROS (for example, for evaluating whether generation of singlet oxygen, $^1\text{O}_2$, or superoxide anion, $\text{O}_2^{\cdot-}$, can be favoured), or whether lipophilicity plays a role in the cellular uptake of the PSs. The following tasks will be carried out in this regard:
- 3.1. Evaluation of the PSs ability to undergo O_2 quenching to produce $^1\text{O}_2$ and/or $\text{O}_2^{\cdot-}$ upon activation with blue light.
 - 3.2. Evaluation of the Ru(II)-bim dyes phototoxicity towards drug-resistant bacteria or cancer cells line.



PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Los dos primeros trabajos de la presente Tesis Doctoral describen el desarrollo de nuevas sondas luminiscentes para el reconocimiento de compuestos β -dicarbonílicos, más concretamente, el ácido tenuazónico (TeA), micotoxina producida por el hongo del género *Alternaria*.

En el primer artículo “Interaction of a 1,3-Dicarbonyl Toxin with Ru(II)-biimidazole Complexes for Luminescence Sensing: a Spectroscopic and Photochemical Experimental Study Rationalized by TD-DFT Calculations” se describe un estudio experimental y computacional de la interacción que se establece entre los complejos de Ru(II)-bim y varios aniones, entre ellos el anión del ácido tenuazónico, micotoxina diana. Se diseñaron y sintetizaron una familia de complejos de Ru(II) con el ligando 2,2'-biimidazol como elemento de reconocimiento. En primer lugar, se realizó una completa caracterización espectroscópica y fotoquímica de los indicadores luminiscentes. A continuación, se evaluó el proceso de coordinación/desprotonación de las sondas luminiscentes mediante valoraciones con F^- en medio orgánico. Finalmente, se estudiaron los cambios inducidos en la absorción, emisión y en los tiempos de vida de luminiscencia de los complejos de Ru(II) en presencia del anión TeA^- . Además, los resultados experimentales fueron contrastados con cálculos computacionales (*Time-Dependent Density Functional Theory*, TD-DFT) permitiendo entender la interacción por enlaces de hidrógeno que se establece entre el complejo de Ru(II) y el TeA, así como la asignación de las transiciones electrónicas observadas en el espectro de absorción y la correlación entre las constantes de asociación obtenidas experimentalmente para los diferentes complejos Ru(II)-bim- TeA^- .

En el segundo artículo, “Luminescent molecularly imprinted polymer nanocomposites for emission intensity and lifetime rapid sensing of tenuazonic acid mycotoxin”, se describe la preparación de un MIP en formato de nanopartículas “núcleo-coraza” para la detección selectiva y luminiscente del TeA. Para ello, se diseñó y sintetizó un monómero trifuncional con grupos acrilato como unidades polimerizables, un grupo bim como unidad de reconocimiento y el complejo luminiscente de Ru(II) como unidad señalizadora. En primer lugar, se lleva a cabo la caracterización espectroscópica y fotoquímica del monómero trifuncional. Seguidamente, se evalúan los cambios espectroscópicos producidos tras la adición de TeA en medio orgánico. A continuación, el complejo luminiscente se integra covalentemente en una matriz MIP que se prepara en presencia de la plantilla TeA. Dicho material MIP se crece sobre núcleos de sílice nanométricos (ca. 200 nm de diámetro) mediante una polimerización RAFT sobre la superficie de la sílice silanizada para asegurar un crecimiento homogéneo del polímero. Una vez preparados los materiales luminiscentes (el MIP y su análogo sin imbrantar NIP que se sintetiza en las mismas condiciones de polimerización pero omitiendo el uso de la plantilla), se evalúa su respuesta luminiscente frente al TeA en medio orgánico (acetonitrilo) y en mezclas acetonitrilo-

agua en distintas proporciones. También se estudia la variación en los tiempos de vida de emisión de los materiales luminiscentes tras la adición de la micotoxina TeA. Por último, se realizan ensayos de reactividad cruzada con otras micotoxinas que presentan estructuras tipo 1,3-dicarbonílica confirmando la respuesta selectiva frente a TeA. La principal novedad de este trabajo reside en que es el primer MIP que permite monitorizar la concentración del analito mediante un cambio en los tiempos de vida luminiscencia. Esto representa una ventaja frente a medidas basadas únicamente en variaciones de la intensidad de luminiscencia por su menor dependencia de la variación de la concentración de las sondas luminiscentes o de posibles fluctuaciones de la fuente de luz empleada.

En líneas generales, los dos trabajos se encuentran muy relacionados entre sí y presentan las siguientes etapas:

1. Diseño y síntesis de indicadores luminiscentes basados en la estructura de complejos de Ru(II)-bim.
2. Caracterización espectroscópica y fotoquímica de las sondas luminiscentes preparadas.
3. Evaluación de la respuesta frente a la micotoxina TeA en disolución.
4. Comparación de los resultados obtenidos experimentalmente con cálculos computacionales.
5. Síntesis y caracterización de MIPs luminiscentes selectivos para TeA.
6. Evaluación analítica (obtención de curvas de calibrado, determinación de límites de detección, cuantificación y estudio de interferentes) del material sensor para TeA.

1. Interaction of a 1,3-Dicarbonyl Toxin with Ru(II)-biimidazole Complexes for Luminescence Sensing: a Spectroscopic and Photochemical Experimental Study Rationalized by TD-DFT Calculations

Inorganic Chemistry



pubs.acs.org/IC

Article

Interaction of a 1,3-Dicarbonyl Toxin with Ru(II)-Biimidazole Complexes for Luminescence Sensing: A Spectroscopic and Photochemical Experimental Study Rationalized by Time-Dependent Density Functional Theory Calculations

José Quílez-Alburquerque, Cristina García-Iriepa,* Marco Marazzi, Ana B. Descalzo, and Guillermo Orellana*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c02887>

Read Online

Adapted with permission from: *Inorganic Chemistry* **2021**, *61*, 328–337.

<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c02887>

Copyright ©ACS 2021

KEYWORDS. *Ruthenium(II) complexes, biimidazole, luminophore, tenuazonic acid, TD-DFT*

Abstract

A family of ruthenium(II) complexes containing one 2,2'-biimidazole (bim) ligand and two polypyridyl (NN) ligands has been prepared and its photophysical and photochemical features tested in the presence of the tenuazonic acid (TeA), a widespread food and feed mycotoxin of current concern. While not tested in *in vivo* studies, TeA and other secondary metabolites of *Alternaria* fungi are suspected to exert adverse effects on the human health, so that sensors and rapid analytical procedures are required. It is well known that 1,3-dicarbonyl compounds such as TeA are relatively easy to deprotonate (the pK_a of TeA is 3.5), yielding an enolate anion stabilized by resonance. The chelating and hydrogen donor features of bim allow simultaneous binding to the metal core and to the target β -diketonate delocalized anion. Such a binding induces changes in the blue absorption (40 nm bathochromic shift), red luminescence intensity (>75% quenching), and triplet lifetime (0.2 μ s decrease) of the $Ru(NN)_2(bim)^{2+}$ luminophore. Moreover, we have computationally rationalized, by Time-Dependent Density Functional Theory (TD-DFT), the structure of the different adducts of Ru-bim complexes with TeA as well as the electronic nature of the spectral absorption bands and their change upon addition of TeA.

1. Introduction

Anion recognition for optical sensing has drawn attention over the last years due to their critical role in chemical, biological and environmental systems.¹ Anions are essential for the interaction between proteins, the regulation of key cell metabolites and formation of enzyme-substrate complexes.² Moreover, environmental monitoring of nitrates and phosphates that are used as fertilizers of crops is crucial to prevent eutrophication.³ The huge structural variety in terms of shape and dimensions of the anions represents a formidable challenge to the receptor design. Despite the scarcity of studies on β -diketonate anions, they have come out as key intermediates for the synthesis of anticancer drugs,⁴ chemical sensor receptors,⁵ food additives (e.g. curcumin),⁶ and bioactive species.⁷ Moreover, some of the 1,3-dicarbonyl compounds are noxious; for instance, tenuazonic acid (TeA, whose conjugated base is depicted in Scheme 1) and cyclopiazonic acid (CPA) are natural mycotoxins produced by *Alternaria* or *Penicillium* fungi that contaminate a large amount of the world's food such as cereals, oilseeds, fruits and vegetables.⁸ Out of all the *Alternaria* mycotoxins, TeA has been identified as the most dangerous one, showing both cytotoxic and phytotoxic effects.⁹

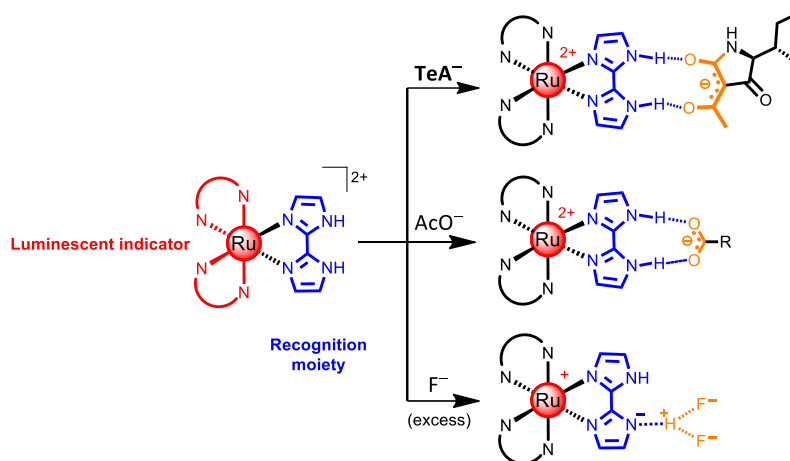
Among all the chemosensing platforms, luminescence-based sensors have been widely used for environmental monitoring, food safety assurance and process analysis due to their high sensitivity, good selectivity, ease of miniaturization and robustness, if luminescence lifetime rather than intensity measurements are carried out.^{10,11} In this regard, luminescent ruthenium(II) polypyridyl complexes are particularly suitable for chemical sensing due to their large Stokes shift (> 150 nm), good thermal and photochemical stability, and their relatively long-lived excited state (up to $7 \mu\text{s}$).¹² Furthermore, their (photo)chemical and (photo)physical properties may be finely tuned by a judicious selection of the polyazaheterocyclic chelating ligands around the metal core. To report the presence of the TeA mycotoxin, a specific ligand must be introduced in the Ru(II) complex, in such a way that its interaction with the target analyte induces a change on the spectroscopic features of the complex. Due to the intrinsic acidity of TeA ($\text{p}K_{\text{a}} = 3.5$),¹³ a variety of tenuazonate (TeA^-) forms may be present in solution arising from its double keto-enol tautomerism, the predominant tautomer being the one represented in Scheme 1.¹³ Its β -diketonate structure allows TeA^- to efficiently chelate metal cations.¹⁴ Moreover, its delocalized charge enables TeA^- to form hydrogen bonds and undergo electrostatic interactions with suitable partners.

Considering its chemical structure, we have recently proposed 2,2'-biimidazole (bim) ligand as a suitable receptor for TeA.¹⁵ A double coordination feature allows bim to chelate a metal atom while keeping its ability to establish two simultaneous hydrogen bonds with different oxoanions of appropriate geometry (Scheme 1). Incorporation of bim to the

coordination sphere of the metal complex considerably increases the acidity of the imidazole NH groups (pK_a of free H_2bim , 11.5; pK_{a1} of $[Ru(bpy)_2(bim)]^{2+}$, 7.2).¹⁶ This enables strong hydrogen bonding or even deprotonation of bim in the presence of basic anions. It is not easy to clearly distinguish these two processes as several factors must be considered such as the acidity of the NH groups in the Ru(II) complex (it can be modulated through incorporation of electron-withdrawing or electron-donating groups in the ancillary ligands), the basicity of the interacting anion, the solvent, and the number and strength of the hydrogen bonds formed.¹⁶ Moreover, most of the investigated luminescent indicator dyes bear a positive charge; therefore, a significant electrostatic contribution must be considered in their interaction with negatively charged species.

Computational methods have demonstrated to be powerful tools to understand the factors that control the photophysical and photochemical features of Ru(II)-polypyridyl complexes.¹⁷ A few studies on the experimental recognition of halide, acetate (AcO^-), phosphates, sulfates and nitrates by Ru(II)- bim complexes have been reported.^{16,18} However, to the best of our knowledge, this is the first experimental and computational study of the interaction of these luminescent dyes with 1,3-dicarbonyl compounds.

Herein we report the synthesis of a family of heteroleptic Ru(II) polypyridyl complexes containing a 2,2'-biimidazole ligand, and a thorough investigation of their interaction with TeA by UV-vis and luminescence spectroscopies to optimize the optical sensing of this and related mycotoxins. The photophysical features of the Ru(II) dyes and their binding constants to TeA have been experimentally determined and computationally studied at the Time-Dependent Density Functional Theory (TD-DFT) level. The latter enlightens the spectroscopic assignment and allows proposition of the most stable interaction geometry. Furthermore, the interaction with TeA has been compared to the binding to other monodentate (F^-) and bidentate (AcO^-) anions in organic non-protogenic media (Scheme 1).



Scheme 1. Suggested interaction of Ru(II)-bim complexes with various anions in non-protogenic media: tenuazonate (TeA⁻), acetate (AcO⁻) and fluoride (F⁻).

2. Experimental Section

Chemicals. The precursor disodium 2,2'-bipyridine-4,4'-disulfonate (s2b), 2,2'-bipyridine-4,4'-diyl dimethyl diacrylate (dab) and 2,2'-biimidazole (bim) ligands were synthesized by following reported procedures.^{19,20,21} The precursor *cis*-[Ru(NN)₂Cl₂] complexes were prepared according to the general method with minimal modifications.²² The 'synthetic' tenuazonic acid, a mixture of 5*S*:5*R* (81:19) diastereoisomers, was obtained by a literature procedure.⁵ [Ru(phen)₂(bim)]²⁺ (phen stands for 1,10-phenanthroline) and [Ru(dab)₂(bim)]²⁺ were synthesized by following literature methods and their NMR data were found to be coincident with those reported.^{23,15} 2,2'-Bipyridine-4,4'-dicarboxylic acid (dcb) and tetrabutylammonium (TBA) acetate were purchased from Alfa Aesar (Germany). Ruthenium(III) chloride trihydrate, lithium chloride, and 2,2,6-trimethyl-4*H*-1,3-dioxin-4-one were from Acros Organics. L-isoleucine methyl ester hydrochloride, TBA hydroxide, TBA fluoride (xH₂O), hexafluorophosphoric acid, butylhydroxytoluene (BHT) and sodium methoxide were from Merck. Ammonium hexafluorophosphate was purchased from Fluorochem. Sephadex[®] LH20 was purchased from Cytiva. *m*-Xylene, anhydrous dimethyl sulfoxide (DMSO) and dimethyl formamide (DMF) were from Merck whereas dichloromethane and methanol (all HPLC grade) were from VWR. Type I water was obtained with a Merck-Millipore Direct-Q3-UV system. Deuterated solvents with tetramethylsilane (TMS) as internal reference were purchased from VWR.

Instrumentation. UV-vis absorption spectra were recorded with a Varian Cary 3-Bio spectrophotometer (CA, USA). Steady-state emission spectra of the Ru(II) complexes in solution were measured with a FluoroSENS spectrofluorimeter (Gilden Photonics, UK) equipped with a red-sensitive Hamamatsu R928 photomultiplier and a 150-W xenon lamp. All the spectra have been corrected for the instrument response. Time-Resolved Emission Spectra

(TRES) and luminescence lifetimes of the indicator dyes in solution were measured with an Edinburgh Instruments (EI) FLS980-Xd2-T spectrometer, equipped with a Horiba NanoLED-470LH (463 nm, <1 ns pulse width), a 467-nm bandpass interference filter (Chroma), a 500 nm-blazed double monochromator in the emission channel, and a Hamamatsu R928P photomultiplier detector thermoelectrically cooled at -21 °C. The EI advanced Fluorescence Analysis Software Technology (FAST) was used to analyze the multiexponential decays and to perform the global analysis. ¹H NMR spectra were obtained on Bruker Avance DPX 300MHz-BACS60 and Bruker AV 500MHz spectrometers; the latter was also used to record the ¹³C NMR spectra. Mass spectra (ESI) were measured with a Bruker HCT Ultra spectrometer.

Synthesis of [Ru(dcb)₂(bim)]²⁺. 250 mg (0.37 mmol) of *cis*-[Ru(dcb)₂Cl₂] and 50 mg of 2,2'-biimidazole (0.37 mmol) were dissolved in 3 mL of ethylene glycol. The solution was refluxed for 1 h under argon until the TLC analysis (silica; MeCN–water–KNO₃ satd. aq. 50:2:1 v/v/v) showed complete consumption of the starting materials. The reaction mixture was cooled, and 2 mL of water was added. The Ru(II) complex salt precipitated upon addition of a few drops of saturated aqueous ammonium hexafluorophosphate, was collected by vacuum filtration and washed with water. The resulting product was purified by dissolving the complex in 1 mmol L⁻¹ NaOH solution and passing the solution through a Sephadex[®] LH20 column. The adsorbed violet complex was eluted with methanol and the fractions containing the sought product were combined and evaporated under reduced pressure. To remove the residual base, the product was dissolved in water and hexafluorophosphoric acid was added until acidic pH. The precipitated PF₆⁻ salt of the complex was extracted into dichloromethane. The organic layer was separated, concentrated under reduced pressure, and dried under vacuum to yield the final pure product as a purple-reddish solid in 27% yield. ¹H NMR (CD₃CN, δ): 8.96 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H_δ), 8.10 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H_{α'}), 7.95 (d, *J*₁ = 5.9 Hz, 2H_α), 7.93 (d, *J*₁ = 5.9 Hz, 2H_{β'}), 7.74 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H_β), 7.30 (s, 2H₅), 6.45 (s, 2H₄). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ): 165.1, 158.6, 158.3, 157.4, 153.2, 152.4, 139.3, 138.6, 128.1, 126.1, 123.3, 123.1, 121.8, 117.1, 114.8. MS(ESI-) *m/z*: [M – H]⁺ calcd for C₃₀H₁₉N₈O₈Ru, 721.0; found, 720.8.

Synthesis of [Ru(s2b)₂(bim)]²⁻. 200 mg (0.20 mmol) of *cis*-[Ru(s2b)₂Cl₂] and 30 mg of 2,2'-biimidazole (0.22 mmol) were dissolved in 9 mL of ethylene glycol. The solution was refluxed for 5 h under argon. The reaction mixture was cooled, and the Ru(II) complex salt precipitated upon addition of acetone. The Ru(II) complex was collected by vacuum filtration and purified by re-precipitation in acetone–diethyl ether mixture to yield the final pure product as a red solid in 70% yield. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ): 8.49 (s, 4H_δ), 7.97 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H_{α'}), 7.89 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H_α), 7.66 (dd, *J*₁ = 5.8 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz, 2H_{β'}), 7.55 (dd, *J*₁ = 5.8 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz, 2H_β), 7.38 (s, 2H₅), 6.39 (s, 2H₄). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ): 157.4, 156.8, 155.3, 152.8,

151.7, 139.4, 127.5, 123.9, 123.3, 121.9, 119.4, 119.2. MS(ESI-) m/z: $[M]^{2+}$ calcd for $C_{26}H_{18}N_8O_{12}RuS_4$, 431.9; found, 431.7.

Computational Details. All calculations were performed by applying the Density Functional Theory (DFT) to the electronic ground state, including its Time-Dependent extension (TD-DFT) when calculating the electronic excited state properties. In particular, the B3LYP^{24,25} functional was used together with the Lanl2dz basis set to describe the metal atom, and the 6-31+G* basis set to describe all other atoms. The D3 version of the Grimme's empirical dispersion with Becke-Johnson damping was included (D3(BJ)).^{26,27} The solvent (dimethyl sulfoxide, DMSO) was implicitly taken into account through the Polarizable Continuum Model (PCM²⁸) using the Integral Equation Formalism variant (IEF-PCM). The Gaussian 16 suite of programs²⁹ was used for these calculations.

3. Results and Discussion

Synthesis of the Luminescent Indicator Dyes. To explore the ability to bind 1,3-dicarbonyl species, a family of heteroleptic Ru(II)-polypyridyl complexes containing one 2,2'-biimidazole (bim) as the recognition moiety and two ancillary ligands, have been prepared (Figure 1). The functional groups of these ancillary ligands (2,2'-bipyridine-4,4'-dicarboxylic acid, dcb; 2,2'-bipyridine-4,4'-disulfonate, s2b; 2,2'-bipyridin-4,4'-diyl dimethyl diacrylate, dab) have been chosen to eventually be able to tether the luminescent complexes to a polymeric matrix for chemical sensing applications (via carboxamide, sulfonamide or radical polymerization).¹⁵ For the sake of comparison, the 1,10-phenanthroline (phen) complex was also prepared. The luminescent dyes were synthesized in a two-step route. Firstly, the *cis*-Ru(NN)₂Cl₂ precursors were obtained according to the established procedure for the synthesis of *cis*-Ru(bpy)₂Cl₂,²² in which the chelating ligand was reacted with RuCl₃ in the presence of a large excess of lithium chloride to prevent formation of the tris complex. The target Ru(II) heteroleptic complexes were synthesized by refluxing the *cis*-Ru(NN)₂Cl₂ and bim. Due to the poor solubility of the latter, ethylene glycol was required. Figures S1–S9 in the Supporting Information show the structural confirmation of the synthesized Ru(II)-bim complexes by ¹H NMR, ¹³C NMR and ESI-MS.

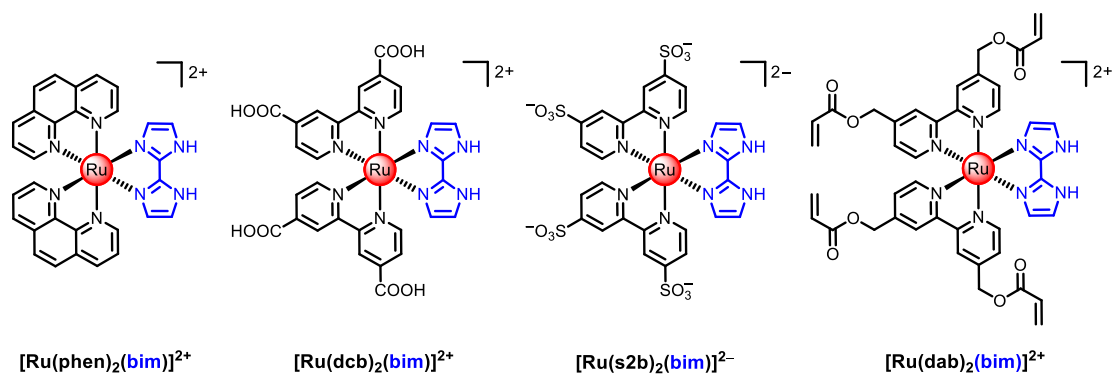


Figure 1. Chemical structure of the luminescent indicator dyes prepared in this work.

Spectroscopic Characterization of the Luminescent Probes. The absorption and photochemical features in DMSO of the prepared Ru(II) dyes are depicted in Table 1. These data were extracted from their corresponding absorption and emission spectra (Figure S10, Supporting Information). All the complexes show a broad absorption band in the blue that is assigned to an allowed $d-\pi^*$ metal-to-ligand charge transfer (MLCT) transition in agreement with the usual feature of Ru(II) polypyridyls and our computational results (Figure S11). In every case, the MLCT transition of the Ru-bim complexes in the visible exclusively involves the π^* orbital of the bpy or phen ligands (Figure S11). This is a consequence of the much higher energy of the bim ligand π^* orbital due to its electron rich character. The high-energy region of the spectra is dominated by narrow intense absorption bands assigned to $\pi-\pi^*$ ligand centered (LC) transitions of the bim and bpy (or phen) ligands.

Upon excitation, a relatively long-lived red luminescence is observed from the lowest-lying $^3\text{MLCT}$ state (Table 1), originated by a fast intersystem crossing from the initially populated $^1\text{MLCT}$ state. The bim ligand decreases the t_{2g}^{π} (metal) $\rightarrow \pi^*$ (ligand) back-donation, raising the energy of the metal t_{2g}^{π} orbitals.³⁰ The latter shrinks the HOMO-LUMO energy gap, causing a red shift of the absorption and emission maxima compared to the corresponding homoleptic complexes $[\text{Ru}(\text{NN})_3]^{2+}$ (454/617 nm for NN = bpy and 450/601 nm for NN = phen in DMSO, data not shown). In this way, the emission quantum yields and luminescence lifetimes of the Ru-bim complexes decrease. While $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ displays an emission quantum yield of 0.045 and a lifetime around 0.7 μs in aerated acetonitrile,³¹ the Ru-bim complexes show emission quantum yields around 0.01 and emission lifetimes lower than 0.2 μs (Table 1). This fact might be ascribed to the smaller energy gap between the excited and ground states discussed above.³²

Table 1. Absorption data, emission maxima, and luminescence lifetimes of the Ru(II) dyes in air-equilibrated DMSO solutions at 25 ± 0.1 °C.

Ru(II) dye	λ_{abs}^{max}/nm ($\epsilon/10^3$ L mol ⁻¹ cm ⁻¹) ^a	λ_{em}^{max}/nm ^a	Φ_{em} ^b	τ_1/ns ^d (B ₁)	τ_2/ns ^d (B ₂)	τ_m/ns ^e
[Ru(phen) ₂ (bim)] ²⁺	266 (82.1), 478 (11.3)	650	0.011	80 (1421)	177 (8430)	163
[Ru(dcb) ₂ (bim)] ²⁺	314 (48.0), 378 (14.3), 510 (15.0)	710	0.008	62 (1504)	153 (3990)	128
[Ru(dab) ₂ (bim)] ²⁺	292 (51.1), 341 (10.5), 490 (7.7)	701	0.003 ^c	50 (322)	200 (247)	115
[Ru(s2b) ₂ (bim)] ²⁻	298 (56.9), 350 (13.2), 494 (11.2)	683	0.014	149 (3599)	503 (396)	184

a) Peak wavelength uncertainty: ± 1 nm; molar absorption coefficient uncertainty: $\pm 5\%$. b) Luminescence quantum yields (sd $\pm 2\%$); measured in triplicate upon excitation at 475 nm, at (25 ± 0.1) °C and atmospheric pressure of 714 mm Hg; reference: [Ru(bpy)₃]Cl₂, $\Phi_{em} = (0.040 \pm 0.002)$ in H₂O.³³ c) This value is somewhat underestimated due to the lack of response of the detector above 850 nm. d) Under air; the luminescence decays are fitted to the eq $I_L = B_0 + \sum_i B_i \tau_i$ ($i = 2$); goodness-of-the-fit indicator: $\chi^2 \leq 1.2$; uncertainties of the individual lifetimes: $\pm 2\%$. e) Pre-exponentially weighted average luminescence lifetime: $\tau_m = \sum_i B_i \tau_i / \sum_i B_i$ ($i = 2$); uncertainty: $\pm 1\%$.

Interaction of Ru(II)-bim Complexes with F⁻, AcO⁻ and TeA⁻. The use of Ru(II)-bim complexes as metalloreceptors for luminescent sensing of various anions via hydrogen bonding has been reported.¹⁸ In these studies, fluoride (F⁻) is used to understand deprotonation of the Ru(II)-bim complexes in organic solvents due to the strong basicity of F⁻ in such media. Figure S12 (Supporting Information) depicts the absorption spectra of our luminescent complexes in the presence of increasing amounts of F⁻ (as TBA salt) in DMSO. As a case in point, Figure 2 shows that the addition of 1.25 mol of F⁻ per mole of [Ru(phen)₂(bim)]²⁺ induces a 37-nm bathochromic shift of its MLCT absorption band, with an isosbestic point at 489 nm. However, upon addition of a large excess of F⁻, the absorption maximum at 515 nm gradually decreases while a new band at 562 nm emerges (Figure 2). A new isosbestic point at 540 nm appears, indicating the direct formation of another species that might be the singly-deprotonated complex (if the first equilibrium corresponds to an association) or the doubly-deprotonated complex (if the first equilibrium corresponds to a deprotonation). These changes are fully reversible by acidification of the solutions and are visible to the naked eye (Figure S13): the initial yellow solution becomes orange and finally violet upon the addition of increasing amounts of F⁻. A similar behavior has been reported by Cui *et al.*³⁴ for [Ru(bpy)₂(bim)]²⁺ in acetonitrile solution.

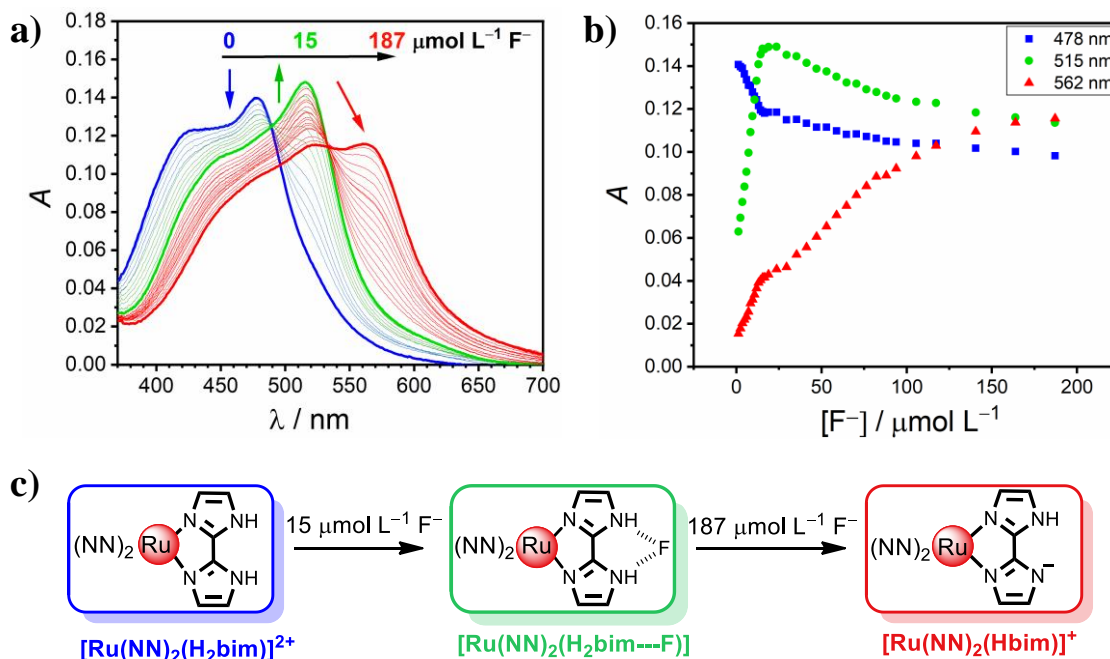


Figure 2. a) Changes in the UV-vis absorption spectrum for the [Ru(phen)₂(bim)]²⁺ complex (12.0 μmol L⁻¹) in DMSO solution upon the addition of increasing amounts of F⁻. b) Absorbance readings at 478, 515 and 562 nm vs. the [F⁻] (μmol L⁻¹). c) Proposed species formed upon successive addition of F⁻.

To elucidate the exact nature of the involved species, a ¹H-NMR titration with F⁻ was carried out in DMSO-d₆ (Figure S14, Supporting Information). The bim N-H signals should provide information on the interaction of [Ru(phen)₂(bim)]²⁺ with the anion but, unfortunately, those protons were not observed in the spectrum. Nevertheless, the addition of an equimolar amount of F⁻ induces a broadening and upfield shift of 0.26 and 0.31 ppm of the bim H₄ and H₅ signals, respectively (Figure S14). Interestingly, when an excess of F⁻ is added, a new triplet at 16.5 ppm arises which can be attributed to the formation of the highly stable HF₂⁻ species.^{35,36} The integral of this signal is compatible with the single deprotonation of the Ru(II) complex and only occurs when an excess of F⁻ is present in solution. Moreover, the H₄ and H₅ protons are further shifted upfield (0.29 and 0.38 ppm, respectively) suggesting an increase of charge on the bim ligand from that observed in the presence of a stoichiometric amount of F⁻.

To investigate whether or not TeA also influences the absorption features of the Ru(II)-bim complexes, we monitored their UV-vis absorption in the presence of tenuazonate in DMSO. As an example, Figure 3 shows that the addition of increasing amounts of the TeA toxin (as TBA salt) induces a shift from 478 to 512 nm in the absorption maximum of [Ru(phen)₂(bim)]²⁺, with a well-defined isosbestic point at 490 nm. The latter is indicative of a 1:1 stoichiometry for the Ru(II)-tenuazonate adduct. For the sake of comparison, the same experiment was performed in the presence of AcO⁻ with similar results (the same changes were observed for all the Ru(II)-complexes studied in the presence of AcO⁻ or TeA⁻ as shown in Figures S15 and S16,

respectively). No further changes were detected when a large excess of AcO^- or TeA^- was added.

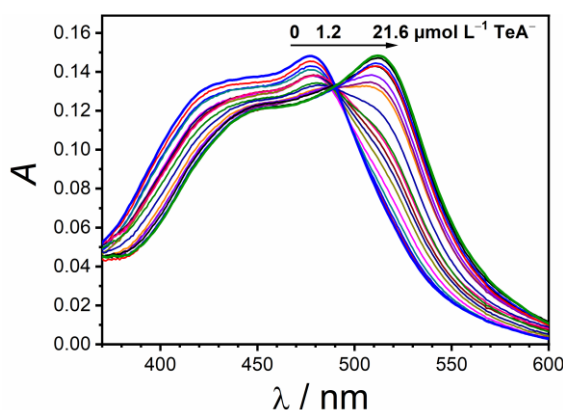


Figure 3. Changes in the UV-vis absorption of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($12.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) in DMSO upon the addition of increasing amounts of TeA^- (as TBA salt).

To confirm that the experimentally observed shifts of the visible absorption band of the Ru-bim complexes upon addition of TeA^- are caused by the hydrogen bond interactions of TeA^- with the bim ligand, we have computed their absorption spectra in the absence and in the presence of TeA^- (Figure 4 and Figure S16 in the Supporting Information). The latter confirms that, in both cases, the lowest energy band corresponds to a metal-to-ligand charge transfer (MLCT) transition for all the luminescent indicator dyes under study. More specifically, our calculations indicate that the MLCT band arises from a charge transfer from the metal center to the bipyridine or phenanthroline ligands, and not to the higher-lying $\pi^*(\text{bim})$ orbital (see above). In agreement with the experimental results, we also found out that the hydrogen-bonded TeA^- -bim interaction in DMSO produces a red-shift of the calculated absorption spectra (Figures 4a and S16). Furthermore, it is computationally confirmed that the band centered at *ca.* 300 nm is not sensitive to the addition of TeA^- because it encompasses several ligand-centered transitions mainly involving the π orbitals of the substituted bipyridines or phenanthroline.

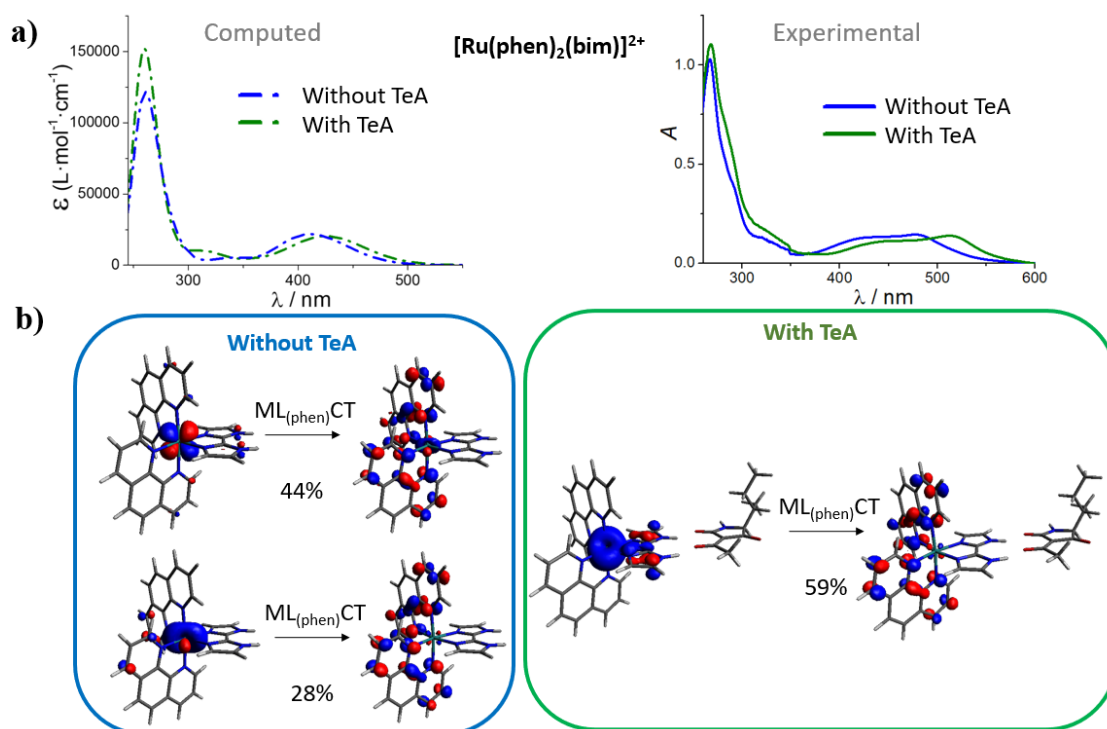


Figure 4. a) Calculated vs. experimental absorption spectrum of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$, in the absence (blue lines) or in the presence (green lines) of a hydrogen-bonded TeA^- molecule. b) Molecular orbitals involved in the lowest lying electronic transition of the visible absorption band, corresponding to a metal-to-phenanthroline charge transfer transition. Calculations have been performed with the ground state optimized (i.e., Franck-Condon) geometry (Table S2).

Geometry of the Association of TeA^- with the Ru-bim Complexes. Once demonstrated the formation of $[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{bim})]$ -tenuazonate adducts through UV-vis absorption measurements, we investigated their geometry by computational methods. We have also compared the geometry of the TeA^- adduct with that reported for AcO^- .³⁴ Firstly, we have modelled TeA^- to evaluate the negative charge delocalization over the two C–O groups in β relative position (lactam and acetyl) of its most stable conformation (Scheme 1 and Figure S17 in the Supporting Information). We have found that the charges on these two oxygen atoms involved in the interaction with bim are similar. Therefore, they should be equivalent for interacting with the NH moieties of bim. Based on this finding, our first proposal for calculations was an association of TeA^- in front of the NH moieties of bim, leading to two hydrogen bonds (Figure 5a). In fact, this structure is similar to that reported for AcO^- ,³⁴ based on the X-ray structure of the adduct. Computationally, we have found this geometry to be stable for the bim– AcO^- adduct but not for the bim– TeA^- analogue. In contrast, two isoenergetic geometries have been computationally discovered for the bim– TeA^- adduct, characterized by the location of one of the C–O groups between the two NH moieties of the bim ligand (Figures 5b and S18). It should be underlined that, as expected, the computed properties (*i.e.* excitation energies) for these two isoenergetic geometries are almost identical. Several other geometries of

the bim–TeA[−] adduct have been explored and computationally optimized but all of them are significantly less stable than the selected one (Figure S19). The alternative (similar) adduct of the keto and acetyl C–O groups of TeA[−], also in β relative position, displays always a higher computed energy due to the steric crowding of the 2-butanoyl chain of TeA[−] and the imidazole ligand.

Furthermore, we have computationally evaluated the possible proton transfer from bim to TeA[−] or AcO[−] in the ground state adducts. To this aim, we have calculated the energy of the interacting species before (NH⋯TeA[−], NH⋯AcO[−]) and after (N[−]⋯TeAH, N[−]⋯AcOH) the single proton transfer (Figure 5c-d). In both cases the N[−]⋯HO species resulting from this proton transfer is less stable than the original situation. However, while this energy difference is *ca.* 3 kcal mol^{−1} for the bim–AcO[−] adduct regardless the ancillary ligands of Ru(II), the energy difference ranges from 9 to 24 kcal mol^{−1} for the bim–TeA[−] adducts (Table S1 in the Supporting Information).

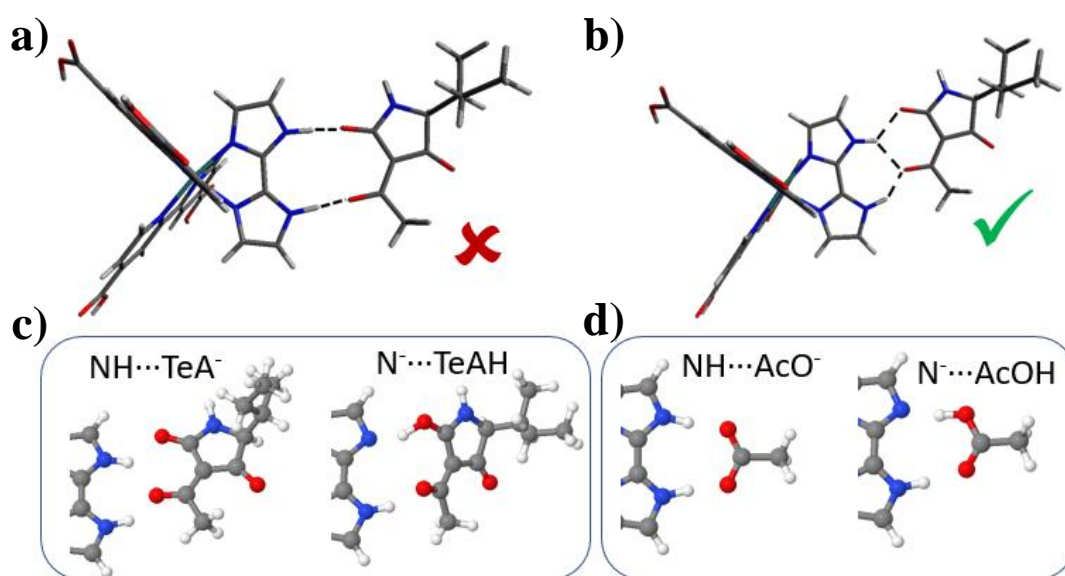


Figure 5. a) Initially proposed geometry (in DMSO) of the [Ru(dcb)₂(bim)]²⁺–TeA[−] adduct with the two C–O groups of TeA[−] in front of the bim N–H moieties. Starting from this unstable geometry, various stable structures characterized by a rearrangement of the NH⋯O^{δ−} intermolecular interactions were found computationally (Figure S18). b) Calculated most stable geometry. c) Geometry of the most stable [Ru(dcb)₂(bim)]²⁺–TeA[−] adduct and of the calculated N[−]⋯HO proton transfer adduct. d) Geometry of the most stable [Ru(dcb)₂(bim)]²⁺–AcO[−] adduct and of the calculated N[−]⋯HO proton transfer adduct.

Luminescence Quenching Upon TeA[−] Binding. To further understand the chemical behavior of the indicator dyes, the effect of TeA[−] on the luminescence of the Ru-bim complexes was evaluated in DMSO. Upon excitation at 490 nm (absorption isosbestic point), [Ru(phen)₂(bim)]²⁺ exhibits an emission maximum at 660 nm (Figure 6a). This luminescence is 82% quenched upon addition of 2 mol TeA[−] per mole of Ru complex, with gradual broadening.

The latter suggests the presence of different luminescent species due to the hydrogen-bonded adduct formation. A similar response to TeA^- was observed in the emission spectra of the other Ru(II)-bim dyes (Figure S20 in the Supporting Information).

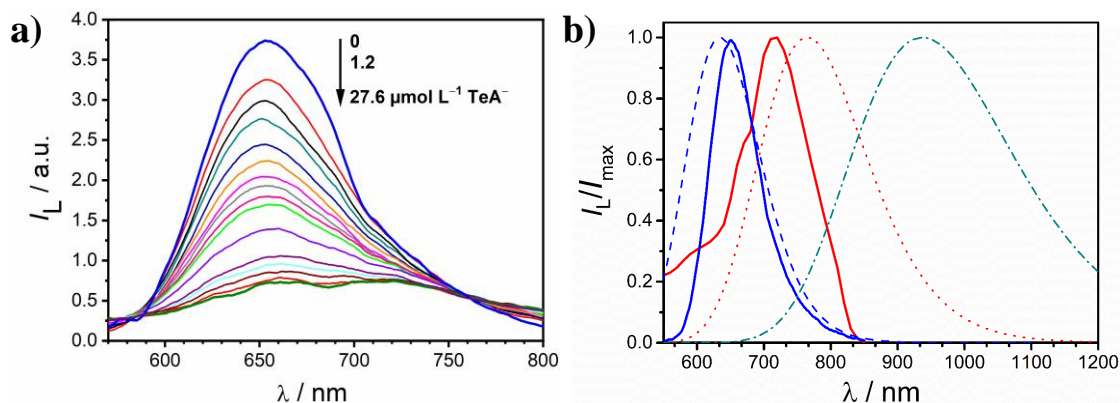


Figure 6. a) Changes in the luminescence spectra of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ in DMSO ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$; $12.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) upon the addition of increasing amounts of TeA^- (as TBA salt). b) Time-Resolved Emission Spectra (TRES, solid lines) of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($14.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) in DMSO, in the presence of a stoichiometric amount of TeA^- upon laser excitation at 463 nm . The TRES were obtained by slicing and addition of the wavelength-dependent luminescence decays in the 160–180 ns (solid red line) and 300–700 ns (solid blue line) time windows, respectively. This Figure includes the calculated emission spectra of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ (dashed line) and its deprotonated (dotted line) and doubly deprotonated (dotted-dashed line) forms in DMSO.

Additionally, we studied the consequences of the TeA^- binding on the luminescence of the Ru(II)-bim complexes by time-resolved detection in aerated DMSO (Figure S21 in the Supporting Information). In all cases the luminescence decay in the absence of TeA^- requires the sum of two exponentials to successfully fit it (Table 1). As a case in point, $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ shows lifetime components of 177 ns (93%) and 80 ns (7%) ($\%_i = B_i \tau_i / \sum_i B_i \tau_i$). Due to traces of water in the spectroscopic-grade DMSO ($< 0.1\%$) and crystallization water molecules in the solid Ru(II) complexes (see Experimental section), the least abundant component would correspond to a small amount of the singly-deprotonated species. This phenomenon has already been observed for the luminescence of $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ in acetonitrile–water medium.¹⁵ Therefore, an irreversible proton transfer or a slow proton exchange and not an acid-base equilibrium is taking place in their $^3\text{MLCT}$ excited state (otherwise, a single exponential would be observed). An irreversible deprotonation in the excited state has indeed been observed for a 2-pyridylimidazole Ru(II) complex in water.³⁷ For the sake of comparison, we also calculated the so-called “pre-exponentially weighted” mean lifetime (τ_m , Table 1) of each decay profile, a robust parameter that characterizes multiexponential decays.³⁸

A global analysis of the luminescence lifetimes of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ in the presence of increasing amounts of TeA^- in DMSO is shown in Table S3 (Supporting Information). The global analysis requires two components for a satisfactory fit ($\chi_{\text{global}} = 1.08$). This result suggests that the fully protonated and singly-deprotonated excited species would be responsible for the luminescence observed in the former conditions, while the doubly-deprotonated excited species is not observed as a consequence of its strongly red-shifted position (see below). A final 25% decrease of the mean luminescence lifetime (from 150 ns to 112 ns) was observed upon addition of TeA^- . If we compare the degree of quenching measured by steady-state luminescence (Figure 6a) and that estimated from the mean emission lifetimes, we have to conclude that a variable degree of static quenching is occurring as it would be expected from the formation of a $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}-\text{TeA}^-$ adduct. Pure static quenching has been observed for $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{iip})]^{2+}$ complexes (iip = 2-imidazolyl-2-imidazo[4,5-f]phenanthroline) in the presence of Cu(II) due to the high association constant of the latter.¹⁷

To investigate the exact nature of the excited species responsible for the emission components mentioned above, a time-resolved emission spectra (TRES) analysis of the photoexcited $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ was carried out in the presence of a stoichiometric amount of TeA^- in DMSO (Figure 6b). The shorter-lived luminescent species (68 ns) displays its emission maximum at 720 nm, while the luminescence of the longer-lived component (164 ns) peaks at 650 nm. This result agrees with the assignment of the short and long components to the singly-deprotonated and fully protonated excited species we have made above. The expected shorter lifetime of the deprotonated species is due to the energy-gap rule. Nevertheless, the emission maximum of the doubly deprotonated $^*[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]$ species is not observed. This might be ascribed to its further red-shifted emission well into the NIR as suggested by the theoretical calculations (Figure 6b). The shift is a consequence of an additional increase in the π -donor character of the doubly deprotonated bim ligand which will destabilise the metal complex HOMO. A summary of the ground and excited state processes involving $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ in the presence of TeA^- is depicted in Figure 7. The photoacidity of our $[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{bim})]^{2+}$ complexes, species that are only able to undergo proton transfer to TeA in their excited state, is not without precedent; the acidity of the bipyridinedicarboxylic (dcb) ligand of $[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{dcb})]^{2+}$ (NN = electron-withdrawing bpy ligand) increases one order of magnitude upon excitation.³⁹

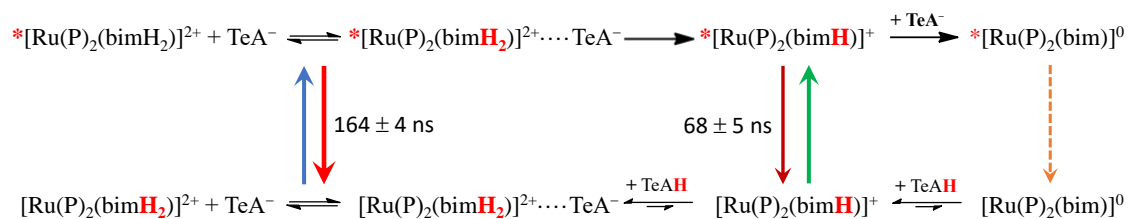


Figure 7. Schematic representation of the different processes that may occur in the presence of TeA^- in the ground and excited state of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$. Note that the fully protonated biimidazole ligand has been called “bim” throughout the text and not “bimH₂”.

Association Constants of Ru(II)-bim Complexes with TeA^- . To determine the association constants (K_a) of the Ru(II)-bim complexes to TeA^- from the spectral luminescence data in DMSO, the HypSpec program (v1.1.50, Protonic Software, www.hyperquad.co.uk), based on the solution of the equations of mass balance by the Newton-Raphson method, was used.⁴⁰ The resulting K_a values for the different $[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{bim})]^{2+}-\text{TeA}^-$ adducts, assuming an 1:1 stoichiometry, have been collected in Table 2. These K_a values have also been computationally calculated by selecting the ground state minimum depicted in Figure 5b. Specifically, the association Gibbs free energy has been computed as the difference between those of the reactants and of each $[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{bim})]^{2+}-\text{TeA}^-$ adduct. For the sake of comparison with the computed data, the association Gibbs free energies were also calculated from the K_a values in Table 2 using the well-known van't Hoff equation ($\Delta G_a = -RT \ln K_a$). The computed values support the experimental data: $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{bim})]^{2-}$ displays the lowest association constant whereas the K_a values for the other bim complexes are 150-fold larger and display similar values. The overall negative charge of the former complex or competition of its sulfonate groups would be the reason for its much lower K_a with TeA^- in DMSO.

Table 2. Association constants determined by luminescence spectroscopy and corresponding experimental and computed Gibbs free energies (ΔG_a) of the $[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{bim})]^{2+}-\text{TeA}^-$ adducts in DMSO at $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Ru(II) complex	Experimental		Computed	
	$K_a/10^5$ (M^{-1})	ΔG_a (kcal mol ⁻¹)	ΔG_a (kcal mol ⁻¹)	$K_a/10^3$ (M^{-1})
$[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{bim})]^{2-}$	0.039	-4.9	-1.7	0.018
$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$	6.3	-7.9	-4.5	2.0
$[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}$	6.2	-7.9	-5.2	6.5
$[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$	6.8	-8.0	-5.2	6.5

4. Conclusions

Luminescent ruthenium(II) polypyridyl complexes containing one 2,2'-biimidazole (bim) ligand and two ancillary ligands for an eventual covalent binding to solid supports can be used as molecular probes for 1,3-dicarbonyl compounds sensing in organic media. A thorough spectroscopic and computational study of a family of $[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{bim})]^{2+}$ complexes, in the presence of the conjugated base of the tenuazonic acid mycotoxin, has allowed us to discern the electronic and structural factors that control the hydrogen bonding interaction between the luminescent probes and the 1,3-dicarbonyl compound. Our findings demonstrate the formation of a hydrogen-bonded adduct between the tenuazonate anion and the bim moiety rather than a single deprotonation. The latter is only accomplished when an excess of more basic anions such as fluoride is present in the organic solvent. Nevertheless, the higher acidity of the $^3\text{MLCT}$ excited state of the $[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{bim})]^{2+}$ complexes, caused by localization of the photoexcited electron on the ancillary polypyridyl ligands (NN), leads to an irreversible proton transfer to tenuazonate with significant quenching of the Ru-complex luminescence. A comprehensive investigation of the luminescence lifetimes and time-resolved emission spectroscopy in the presence of tenuazonate evidence the Ru-complex photoacidity. Our work paves the way for the design of novel Ru(II)-bim complexes as intensity- and lifetime-based luminescent sensors of relevant β -dicarbonyl-containing analytes. More applications in this regard are currently being sought in our laboratories.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and mass spectra of the luminescent indicator dyes, absorption and emission spectra of the Ru(II) dyes in DMSO, absorption and emission spectra of the Ru(II)-bim complexes in DMSO, electronic transitions involved in each absorption band, changes of the Ru(II) dyes upon addition of F^- , color changes of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ upon addition of F^- , $^1\text{H-NMR}$ spectra of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ after addition of increasing amounts of F^- , absorption changes of the Ru(II) dyes upon addition of AcO^- , computed and experimental UV-vis spectra of the Ru(II)-complexes in the absence and in the presence of TeA^- , structure optimization of TeA^- , calculated possible ground state geometries of the $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}-\text{TeA}^-$ adduct, emission changes of the Ru(II) dyes upon addition of TeA^- , luminescence decays of the photoexcited Ru(II)-complexes, schematic representation of the different processes that may occur in the presence of TeA^- in the ground and excited state, association energies between Ru(II)-complex and TeA^- or AcO^- and global analysis of the luminescence lifetimes of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ in the presence of TeA^- . Cartesian coordinates in Ångström of the ground state DFT optimized structures.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: orellana@quim.ucm.es

*E-mail: cristina.garciai@uah.es

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Spanish Ministry of Science & Innovation (MICINN, grant RTI2018-096410-B-C22). J. Q.-A. also thanks MICINN for a F.P.I. doctoral grant. C. G.-I. and M. M. are grateful to Generalitat Valenciana and the European Social Fund (grant GV/2020/226) and the Spanish MICINN (PID2020-118384GB-I00) for financial support.

ABBREVIATIONS

AcO⁻, acetate anion; bim, 2,2'-biimidazole; bpy, 2,2'-bipyridine; dab, [2,2'-bipyridine]-4,4'-diylbis(methylene)diacrylate; dcb, 2,2'-bipyridine-4,4'-dicarboxylic acid; DMSO, dimethyl sulfoxide; F⁻, fluoride anion; IL, intraligand; LC, ligand centered; LLCT, ligand to ligand charge transfer; MLCT, metal-to-ligand charge transfer; NN, ancillary polypyridyl ligand; phen, 1,10-phenantroline; s2b, (2,2'-bipyridine)-4,4'-disulfonate; TBA, tetrabutylammonium; TeA, tenuazonic acid; TRES, time-resolved emission spectra.

REFERENCES

- (1) a) Chen, L.; Berry, S. N.; Wu, X.; Howe, E. N. W.; Gale, P. A. *Advances in Anion Receptor Chemistry*. *Chem* 2020, 6, 61–141. b) Zhao, J.; Yang, D.; Yang, X. J.; Wu, B. *Anion Coordination Chemistry: From Recognition to Supramolecular Assembly*. *Coord. Chem. Rev.* 2019, 378, 415–444.
- (2) Sessler, J. L.; Gale, P.; Cho, W. S. in *Anion Receptor Chemistry*, Royal Society of Chemistry, UK 2006, Ch. 1.
- (3) Albelda, M. T.; Frías, J. C.; García-España, E.; Schneider, H. J. *Supramolecular Complexation for Environmental Control*. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 3859–3877.
- (4) Kljun, J.; Turel, I. β -Diketones as Scaffolds for Anticancer Drug Design – From Organic Building Blocks to Natural Products and Metallo-drug Components. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017, 12, 1655–1666.
- (5) Rico-Yuste, A.; Abouhany, R.; Urraca, J. L.; Descalzo, A. B.; Orellana, G.; Moreno-Bondi, M. C. *Eu(III)-Templated Molecularly Imprinted Polymer Used as a Luminescent Sensor for the Determination of Tenuazonic Acid Mycotoxin in Food Samples*. *Sensors Actuators, B Chem.* 2021, 329, 129256.
- (6) Stanić, Z. *Curcumin, a Compound from Natural Sources, a True Scientific Challenge – A Review*. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2017, 72, 1–12.
- (7) Li, S.; Si, T.; Wang, M.; Zhao, H. *Development of a Synthetic Malonyl-CoA Sensor in Saccharomyces Cerevisiae for Intracellular Metabolite Monitoring and Genetic Screening*. *ACS Synth. Biol.* 2015, 4, 1308–1315.
- (8) a) Mujahid, C.; Savoy, M. C.; Baslé, Q.; Woo, P. M.; Ee, E. C. Y.; Mottier, P.; Bessaire, T. *Levels of Alternaria Toxins in Selected Food Commodities Including Green Coffee*. *Toxins* 2020, 12, 1–17. b) Goyal, S.; Ramawat, K. G.; Mérillon, J. M. in *Fungal Metabolites*, (Eds: Ramawat, K. G.; Mérillon, J. M.), Springer, Switzerland 2016.
- (9) a) Hövelmann, Y.; Hickert, S.; Cramer, B.; Humpf, H. U. *Determination of Exposure to the Alternaria Mycotoxin Tenuazonic Acid and Its Isomer Allo-Tenuazonic Acid in a German Population by Stable Isotope Dilution HPLC-MS³*. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64, 6641–6647. b) Asam, S.; Liu, Y.; Konitzer, K.; Rychlik, M. *Development of a Stable Isotope Dilution Assay for Tenuazonic Acid*. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 2980–2987.

- (10) Urriza-Arsuaga, I.; Ielasi, G.; Bedoya, M.; Orellana, G. in *Fluorescence in Industry*, Springer Nature, Switzerland, 2019; pp 1.
- (11) Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. in *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2nd ed., Wiley-VCH, 2012.
- (12) Orellana, G.; Fresnadillo, D. G. in: *Optical Sensors: Industrial, Environmental and Diagnostic Applications*, (Eds: Narayanaswamy, R.; Wolfbeis, O. S.), Springer, 2004.
- (13) Mikula, H.; Horkel, E.; Hans, P.; Hametner, C.; Fröhlich, J. Structure and Tautomerism of Tenuazonic Acid - A Synergetic Computational and Spectroscopic Approach. *J. Hazard. Mater.* 2013, 250–251, 308–317.
- (14) Biersack, B.; Diestel, R.; Jagusch, C.; Sasse, F.; Schobert, R. Metal Complexes of Natural Melophlins and Their Cytotoxic and Antibiotic Activities. *J. Inorg. Biochem.* 2009, 103, 72–76.
- (15) Quílez-Alburquerque, J.; Descalzo, A. B.; Moreno-Bondi, M. C.; Orellana, G. Luminescent Molecularly Imprinted Polymer Nanocomposites for Emission Intensity and Lifetime Rapid Sensing of Tenuazonic Acid Mycotoxin. *Polymer* 2021, 230, 124041.
- (16) Rommel, S. A.; Sorsche, D.; Fleischmann, M.; Rau, S. Optical Sensing of Anions via Supramolecular Recognition with Biimidazole Complexes. *Chem. - A Eur. J.* 2017, 23, 18101–18119.
- (17) a) Santos, A. R.; Escudero, D.; González, L.; Orellana, G. Unravelling the Quenching Mechanisms of a Luminescent Ru(II) Probe for Cu(II). *Chem. - An Asian J.* 2015, 10, 622–629.
b) Daniel, C. Photochemistry and Photophysics of Transition Metal Complexes: Quantum Chemistry. *Coord. Chem. Rev.* 2015, 282–283, 19–32.
- (18) Mo, H. J.; Niu, Y. L.; Zhang, M.; Qiao, Z. P.; Ye, B. H. Photophysical, Electrochemical and Anion Sensing Properties of Ru(II) Bipyridine Complexes with 2,2'-Biimidazole-like Ligand. *Dalt. Trans.* 2011, 40, 8218–8225.
- (19) García-Fresnadillo, D.; Orellana, G. Interaction of Sulfonated Ruthenium(II) Polypyridine Complexes with Surfactants Probed by Luminescence Spectroscopy. *Helv. Chim. Acta* 2001, 84, 2708–2730.
- (20) Puodziukynaite, E.; Oberst, J. L.; Dyer, A. L.; Reynolds, J. R. Establishing Dual Electrogenerated Chemiluminescence and Multicolor Electrochromism in Functional Ionic Transition-Metal Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 968–978.

- (21) Xiao, J. C.; Shreeve, J. M. Synthesis of 2,2'-Biimidazolium-Based Ionic Liquids: Use as a New Reaction Medium and Ligand for Palladium-Catalyzed Suzuki Cross-Coupling Reactions. *J. Org. Chem.* 2005, 70, 3072–3078.
- (22) Johnson, E. C.; Sullivan, B. P.; Salmon, D. J.; Adeyemi, S. A.; Meyer, T. J. Synthesis and Properties of the Chloro-Bridged Dimer [(Bpy)₂RuCl]₂²⁺ and Its Transient 3+ Mixed-Valence Ion. *Inorg. Chem.* 1978, 17, 2211–2215.
- (23) Xia, Y.; Chen, Q.; Qin, X.; Sun, D.; Zhang, J.; Liu, J. Studies of Ruthenium(II)-2,2'-Bisimidazole Complexes on Binding to G-Quadruplex DNA and Inducing Apoptosis in HeLa Cells. *New J. Chem.* 2013, 37, 3706–3715.
- (24) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* 1993, 98, 5648–5652.
- (25) Lee, C.; Yang, W.; Parr, G. R. Development of the Colic-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. *Phys. Rev. B* 1988, 37, 785–789.
- (26) 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, 154104–154119.
- (27) Grimme, S.; Ehrlich, S.; Goerigk, I. Effect of the Damping Function in Dispersion Corrected Density Functional Theory. *J. Comput. Chem.* 2011, 32, 1456–1465.
- (28) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.* 2005, 105, 2999–3093.
- (29) Gaussian 16, Revision C.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, Ranasinghe, T.; Zakrzewski, D. V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.

- (30) Orellana, G.; Quiroga, M. L.; Braun, A. M. Spectroscopic, Electrochemical, and Kinetic Characterization of New Ruthenium(II) Tris-chelates Containing Five-Membered Heterocyclic Moieties. *Helv. Chim. Acta* 1987, 70, 2073–2086.
- (31) Abdel-Shafi, A. A.; Beer, P. D.; Mortimer, R. J.; Wilkinson, F. Photosensitized Generation of Singlet Oxygen from (Substituted Bipyridine)Ruthenium(II) Complexes. *Helv. Chim. Acta* 2001, 84, 2784–2795.
- (32) Thompson, D. W.; Ito, A.; Meyer, T. J. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ and Other Remarkable Metal-to-Ligand Charge Transfer (MLCT) Excited States. *Pure. Appl. Chem.* 2013, 85, 1257–1305.
- (33) Suzuki, K.; Kobayashi, A.; Kaneko, S.; Takehira, K.; Yoshihara, T.; Ishida, H.; Shiina, Y.; Oishi, S.; Tobita, S. Reevaluation of Absolute Luminescence Quantum Yields of Standard Solutions Using a Spectrometer with an Integrating Sphere and a Back-Thinned CCD Detector. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009, 11, 9850–9860.
- (34) Cui, Y.; Mo, H. J.; Chen, J. C.; Niu, Y. L.; Zhong, Y. R.; Zheng, K. C.; Ye, B. H. Anion-Selective Interaction and Colorimeter by an Optical Metalloreceptor Based on Ruthenium(II) 2,2'-Biimidazole: Hydrogen Bonding and Proton Transfer. *Inorg. Chem.* 2007, 46, 6427–6436.
- (35) Kang, S. O.; Powell, D.; Day, V. W.; Bowman-James, K. Trapped Bifluoride. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 118, 1955–1959.
- (36) Descalzo, A. B.; Rurack, K.; Weisshoff, H.; Martínez-Máñez, R.; Marcos, M. D.; Amorós, P.; Hoffmann, K.; Soto, J. Rational Design of a Chromo- and Fluorogenic Hybrid Chemosensor Material for the Detection of Long-Chain Carboxylates. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 184–200.
- (37) Tormo, L.; Bustamante, N.; Colmenarejo, G.; Orellana, G. Can Luminescent Ru(II) Polypyridyl Dyes Measure pH Directly? *Anal. Chem.* 2010, 82, 5195–5204.
- (38) Carraway, E. R.; Demas, J. N.; DeGraff, B. A.; Bacon, J. R. Photophysics and Photochemistry of Oxygen Sensors Based on Luminescent Transition-Metal Complexes. *Anal. Chem.* 1991, 63, 337–342.
- (39) O'Donnell, R. M.; Sampaio, R. N.; Li, G.; Johansson, P. G.; Ward, C. L.; Meyer, G. J. Photoacidic and Photobasic Behavior of Transition Metal Compounds with Carboxylic Acid Group(S). *J. Am. Chem. Soc.* 2016, 138, 3891–3903.
- (40) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. Investigation of Equilibria in Solution. Determination of Equilibrium Constants with the HYPERQUAD Suite of Programs. *Talanta* 1996, 43, 1739–1753.

Supporting Information

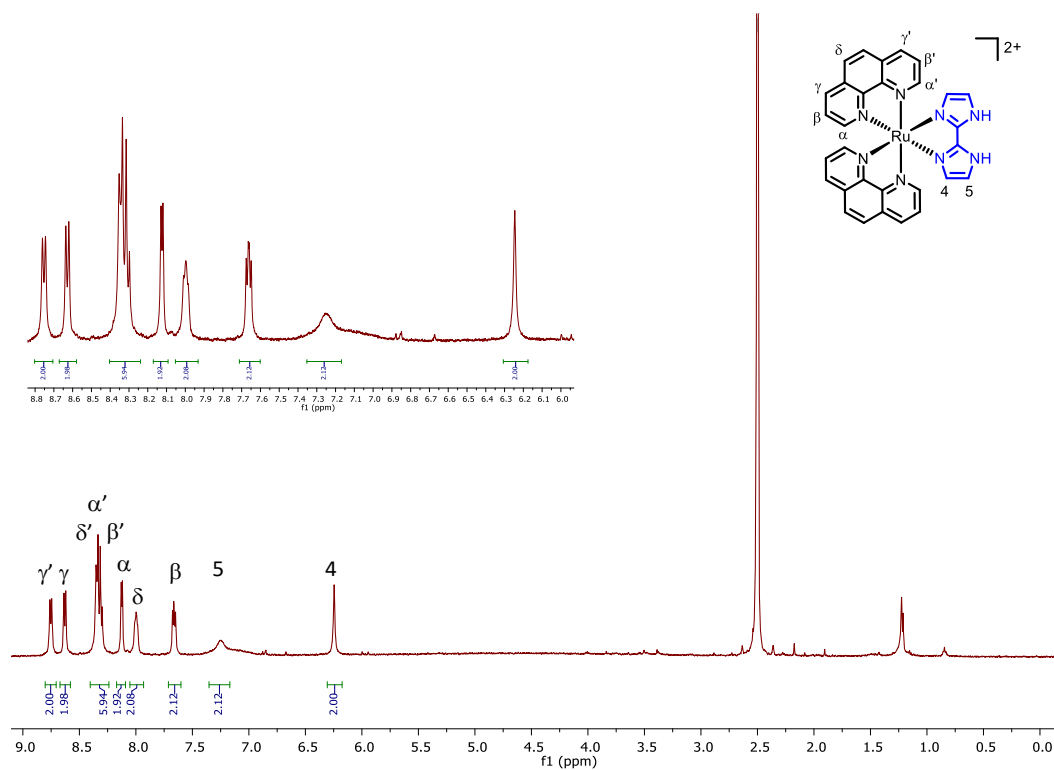


Figure S1. 500-MHz ¹H NMR spectrum of [Ru(phen)₂(bim)]²⁺ in DMSO-d₆. The proton assignment of this and the other complexes was carried out according to Orellana et. al.¹ The inset shows the signals in the aromatic region.

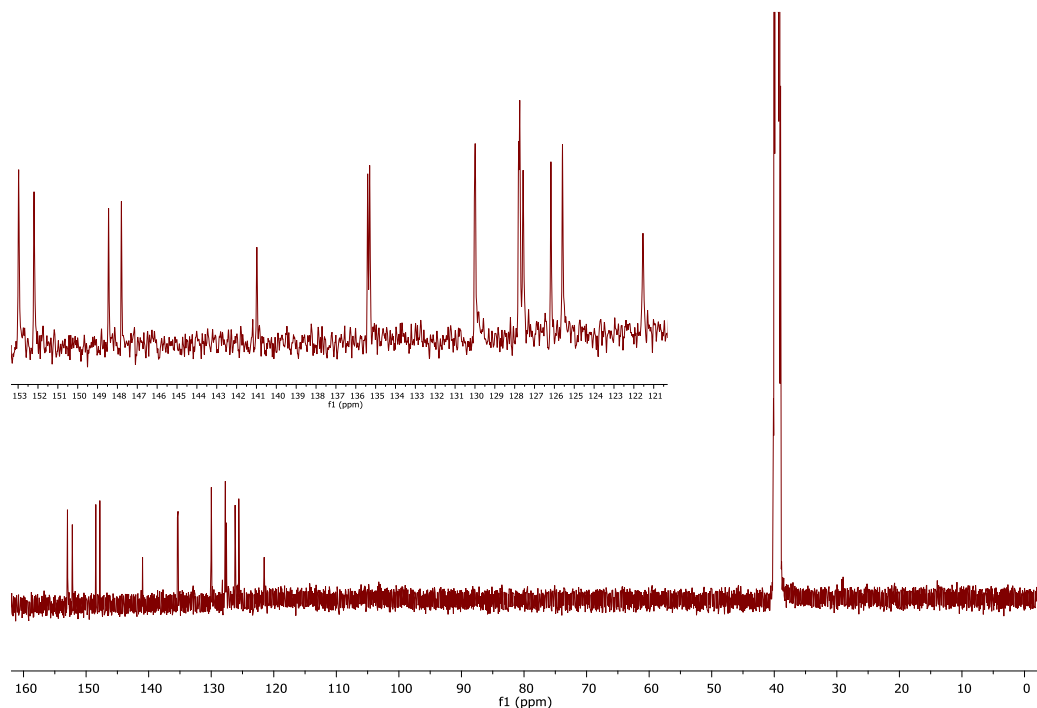


Figure S2. 125-MHz ¹³C NMR spectrum of [Ru(phen)₂(bim)]²⁺ in DMSO-d₆. The inset shows the signals in the aromatic region.

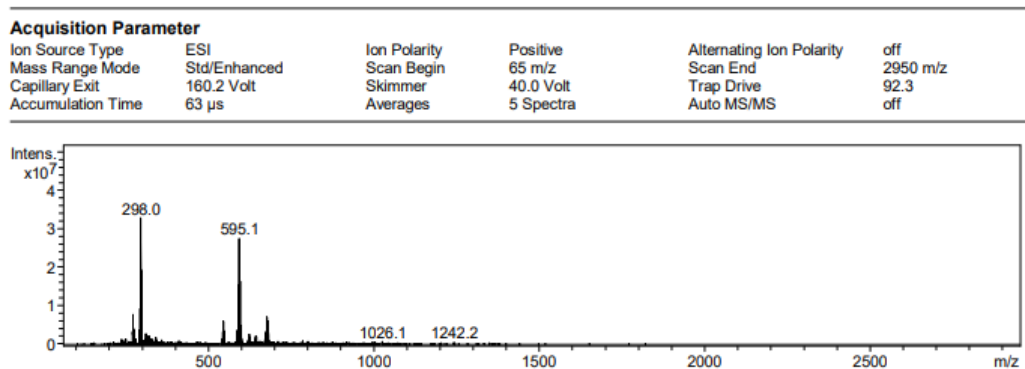


Figure S3. Mass spectrum of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ recorded in MeOH by electrospray ionization in positive detection mode; m/z: $[\text{M}]$ calcd. for $[\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{N}_8\text{Ru}]^+$ and $[\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{Ru}]^{2+}$, 595.1; 298.0; found, 595.1; 298.0.

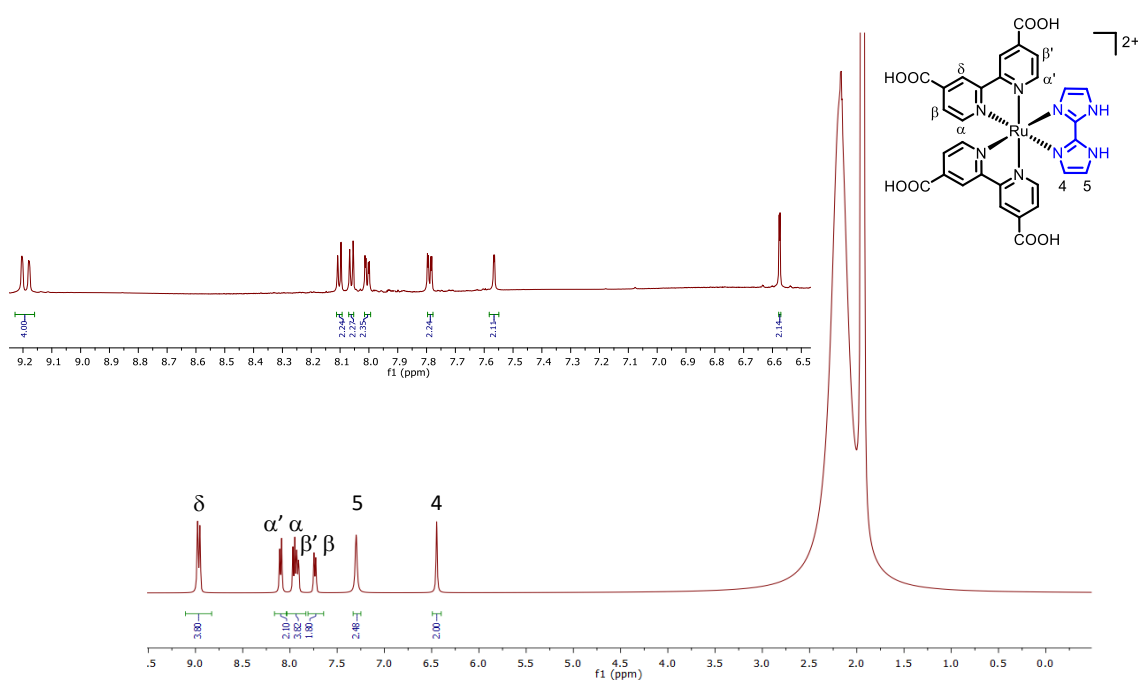


Figure S4. 300-MHz ^1H NMR spectrum of $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}$ in acetonitrile- d_3 . The inset shows the 500-MHz ^1H NMR spectrum (DMSO- d_6) of the aromatic region.

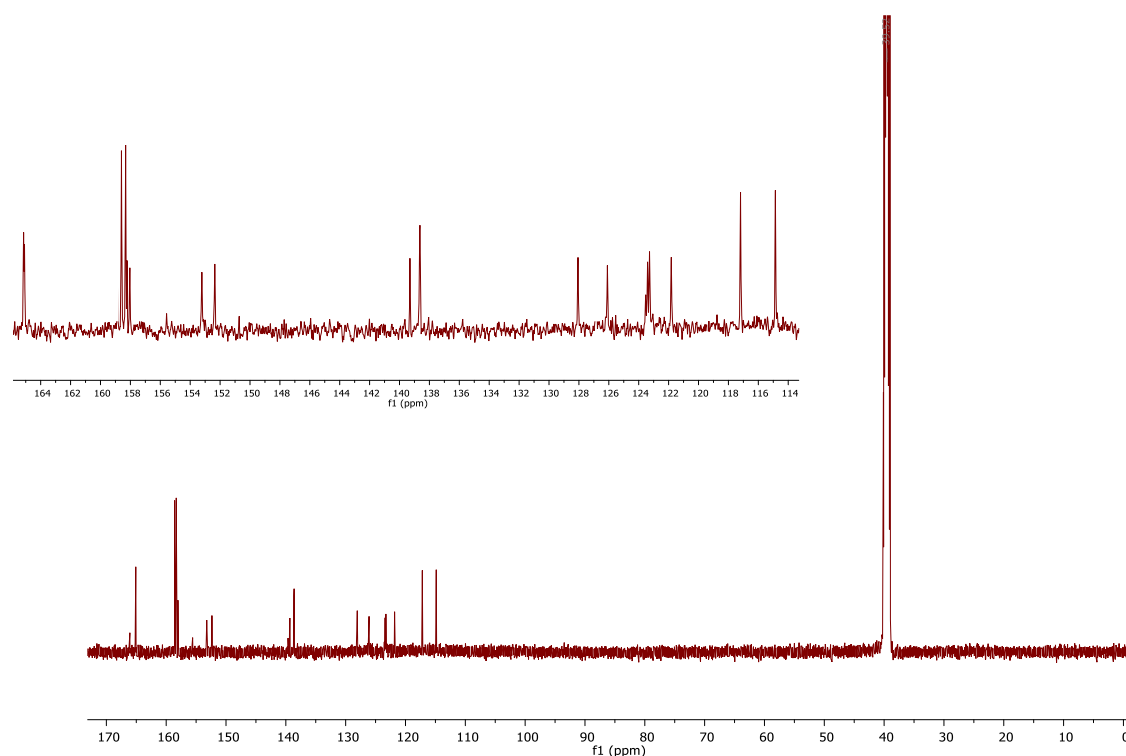


Figure S5. 125-MHz ^{13}C NMR spectrum of $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}$ in DMSO-d_6 . The inset shows the signals in the aromatic region.

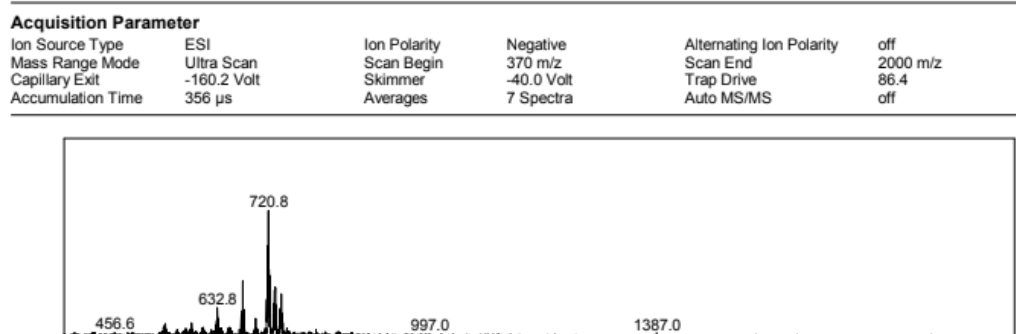


Figure S6. Mass spectrum of $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}$ recorded in MeOH by electrospray ionization in negative detection mode; m/z : calcd. for $[\text{C}_{30}\text{H}_{19}\text{N}_8\text{O}_8\text{Ru}]^-$, 721.0; found, 720.8.

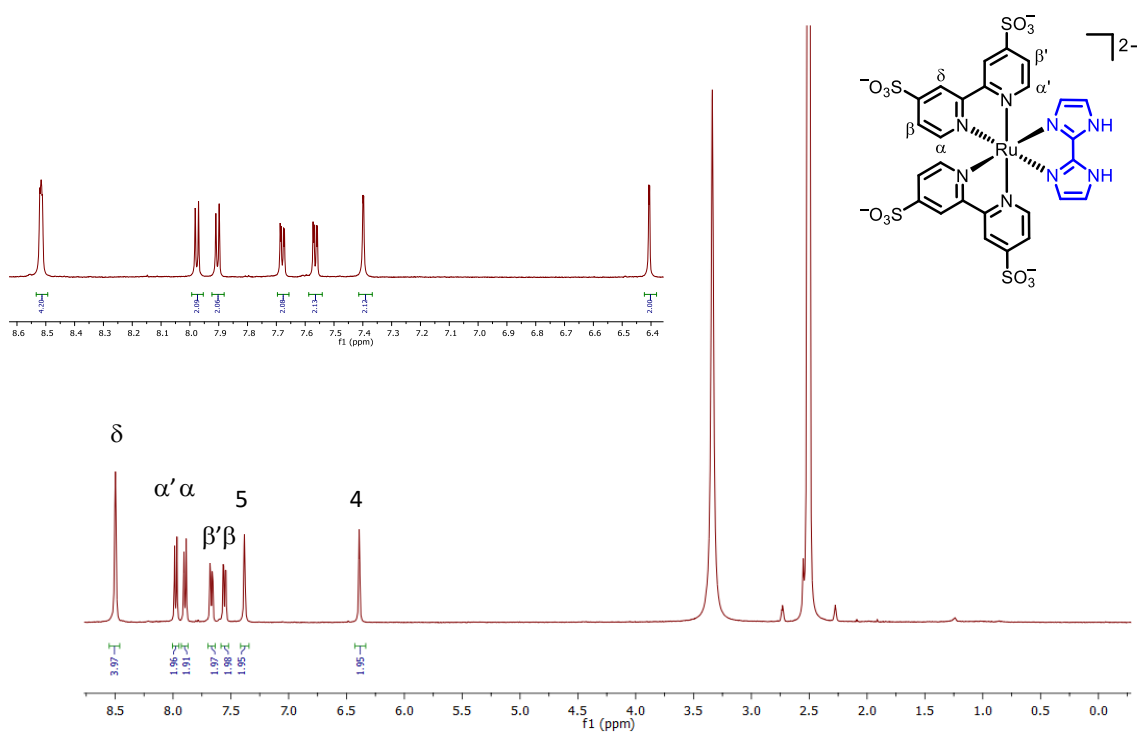


Figure S7. 300-MHz ¹H NMR spectrum of [Ru(s2b)₂(bim)]²⁻ in DMSO-d₆. The inset shows the 500-MHz ¹H NMR spectrum of the aromatic region.

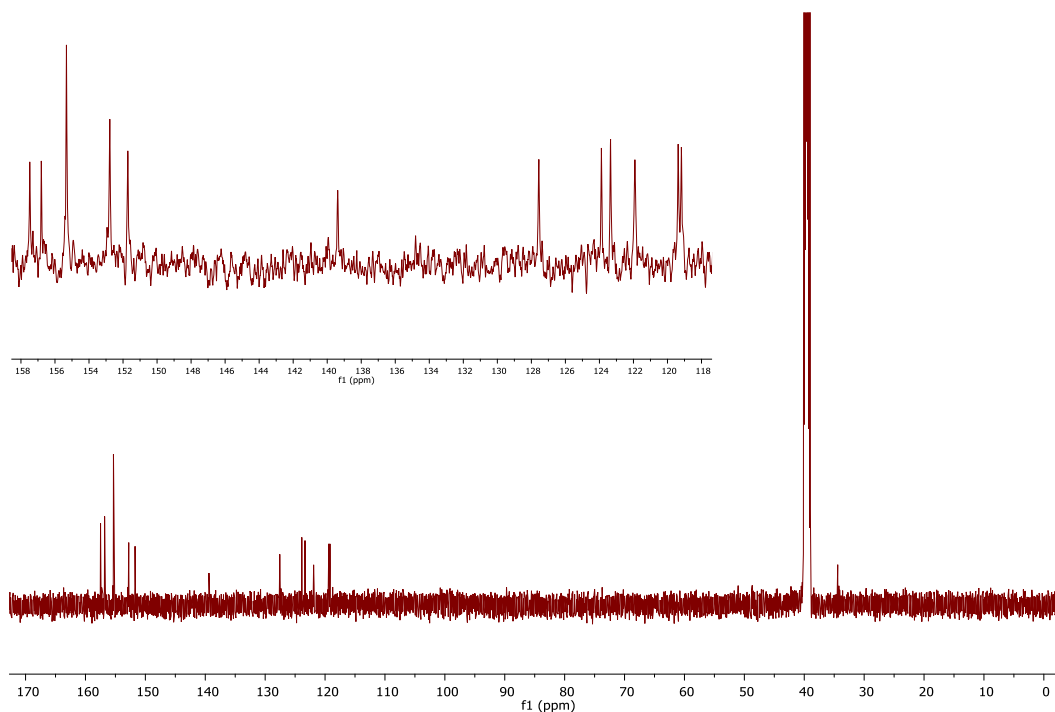


Figure S8. 125-MHz ¹³C NMR spectrum of [Ru(s2b)₂(bim)]²⁻ in DMSO-d₆. The inset shows the signals in the aromatic region.

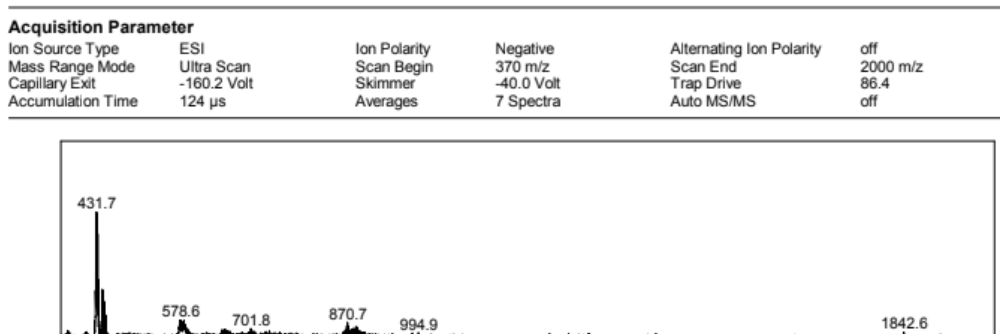


Figure S9. Mass spectrum of $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{bim})]^{2-}$ recorded in MeOH by electrospray ionization in negative detection mode; m/z : $[\text{M}]^{2-}$ calcd. for $[\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{RuS}_4]^{2-}$, 431.9; found, 431.7.

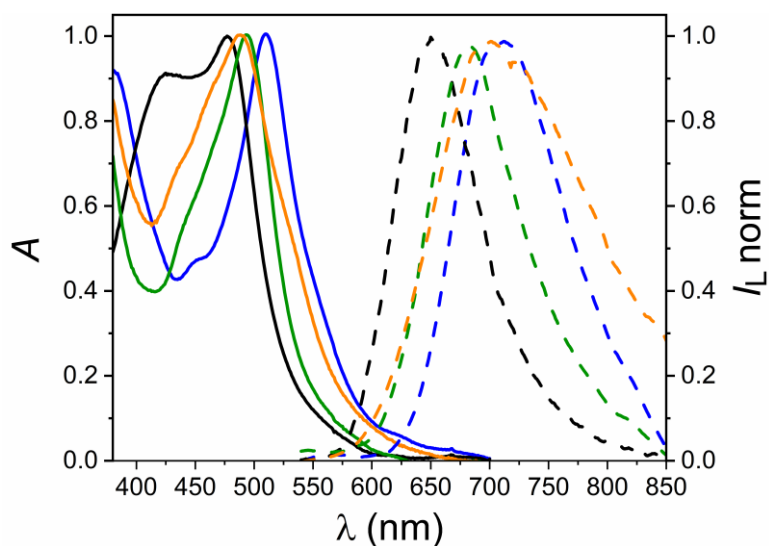
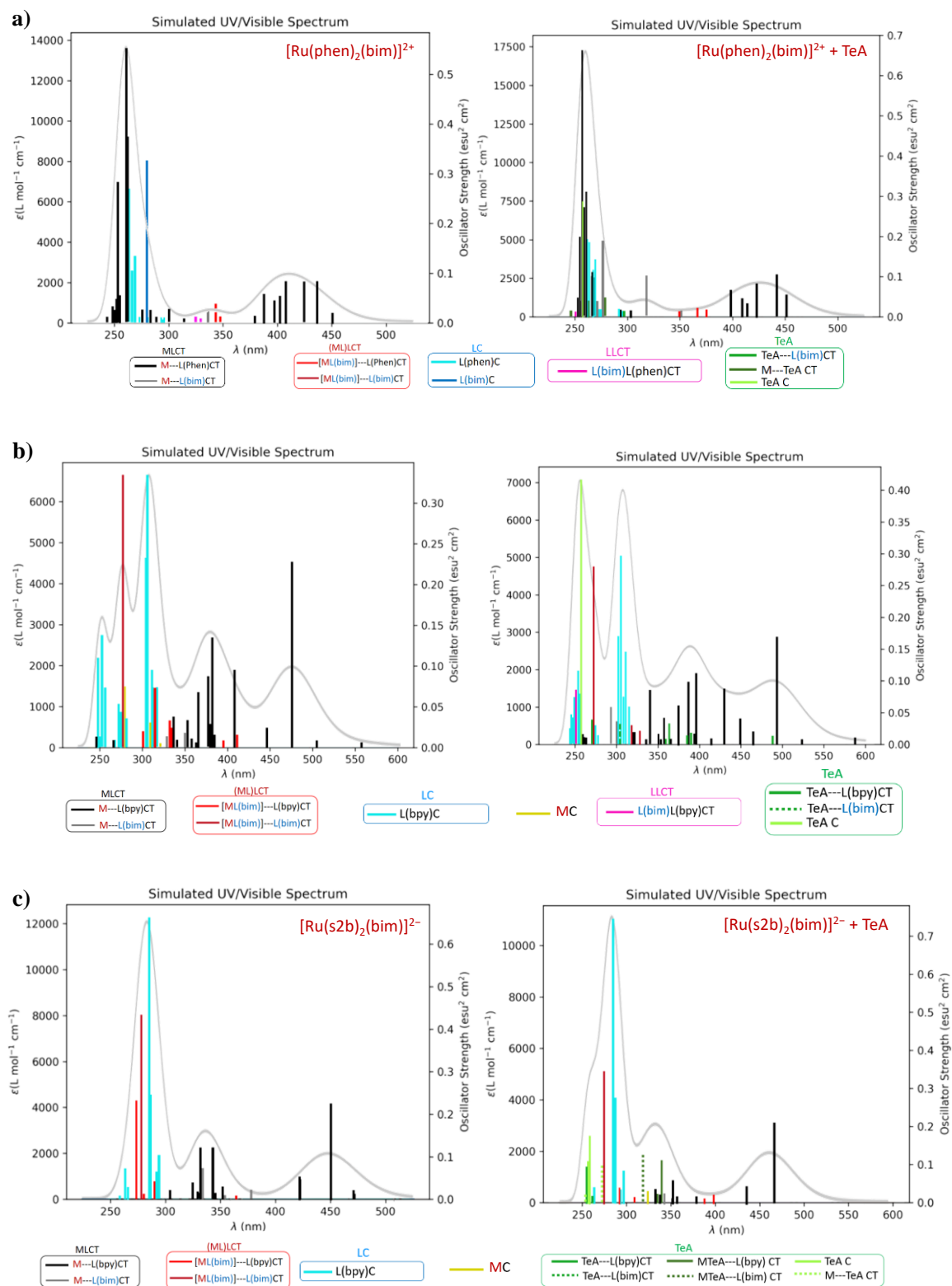


Figure S10. Absorption and emission spectra in DMSO of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ (black solid and dashed line), $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}$ (blue solid and dashed line), $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ (orange solid and dashed line) and $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{bim})]^{2-}$ (green solid and dashed line).



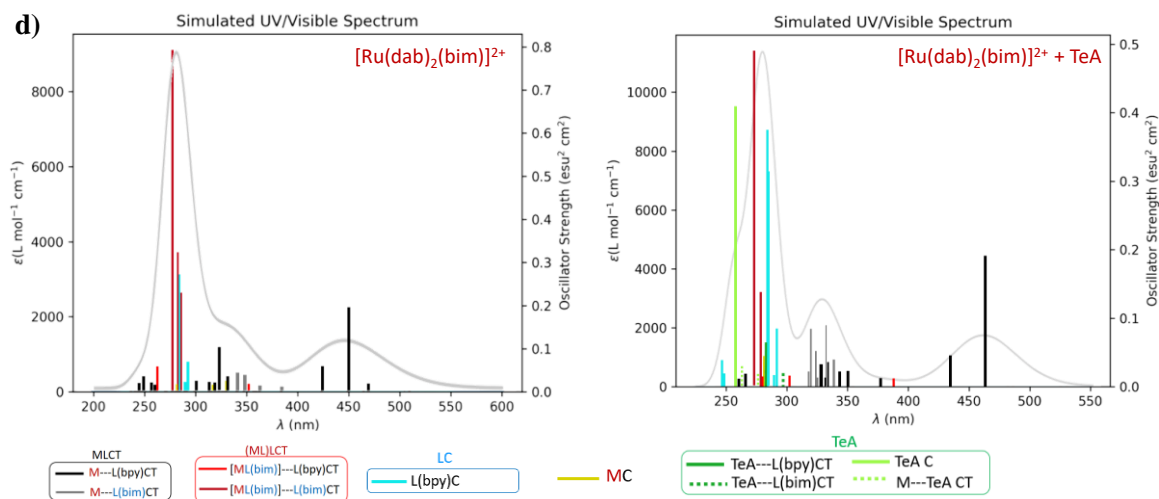


Figure S11. Calculated electronic absorption spectra in the absence and in the presence of TeA^- and electronic transitions involved in each absorption band of a) $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$, b) $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}$, c) $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{bim})]^{2+}$, and d) $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$.

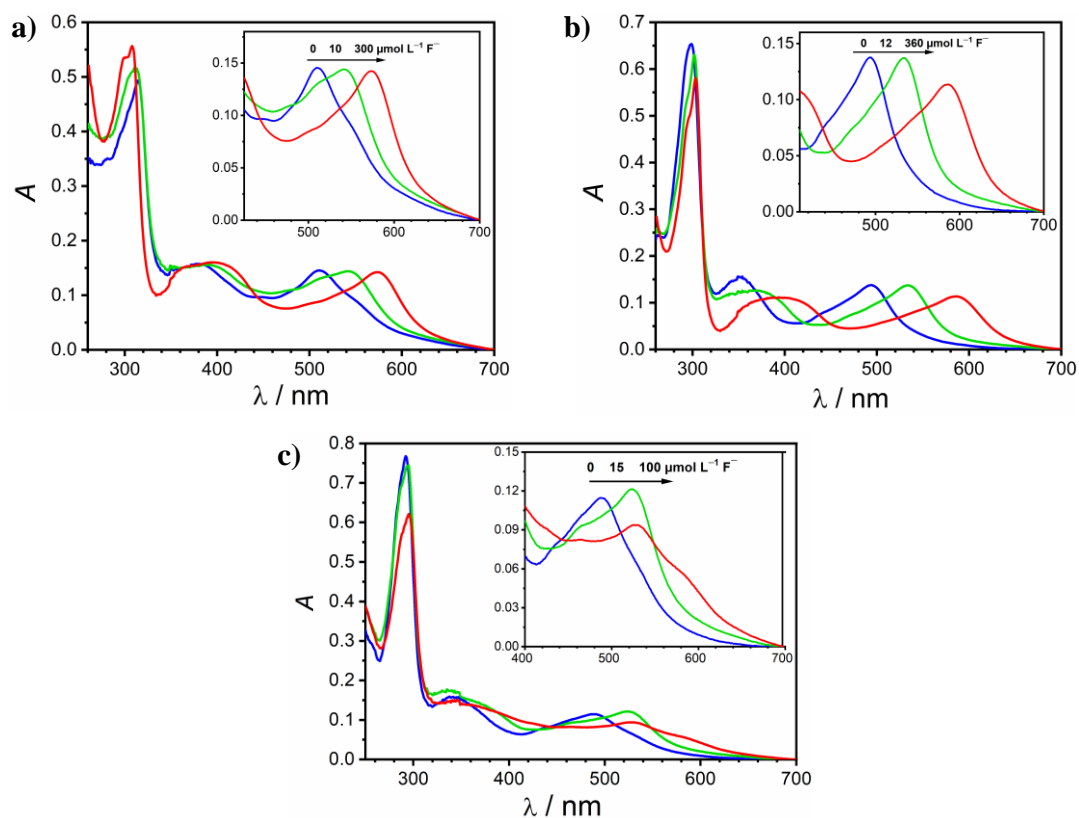


Figure S12. Changes in the UV-vis absorption for a) $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}$ (12.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), b) $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{bim})]^{2+}$ (12.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), and c) $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ (15.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) in DMSO upon the addition of increasing amounts of F^- (as TBA salt).

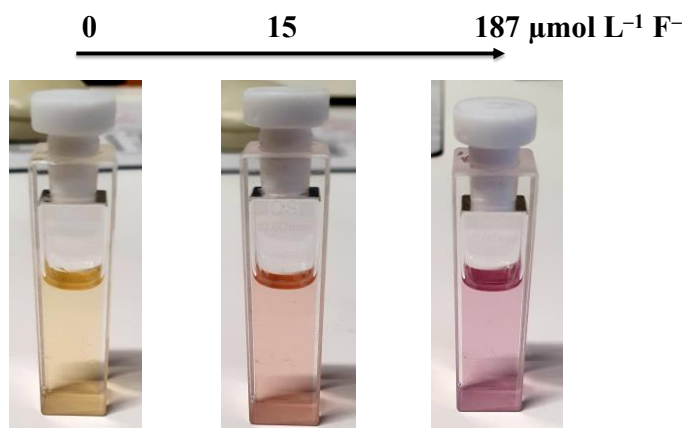


Figure S13. Color changes observed in DMSO for $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($12.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) after addition of 15 and $187 \mu\text{mol L}^{-1}$ of F^- , respectively (as TBA salt).

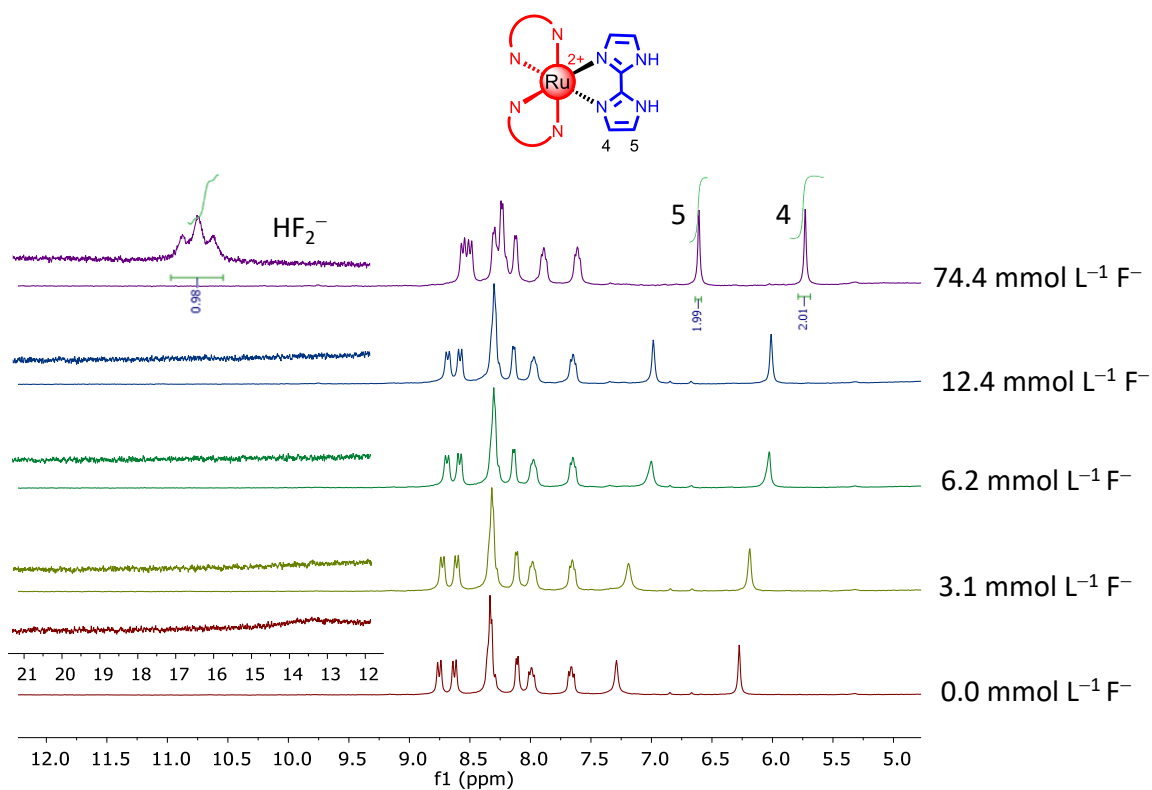


Figure S14. 300-MHz ^1H NMR spectrum of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ (6.2 mmol L^{-1} in DMSO-d_6) after addition of increasing amounts of F^- (as TBA salt). The inset shows the formation of the HF_2^- species at high concentrations of fluoride, indicating deprotonation of the coordinated bim ligand.

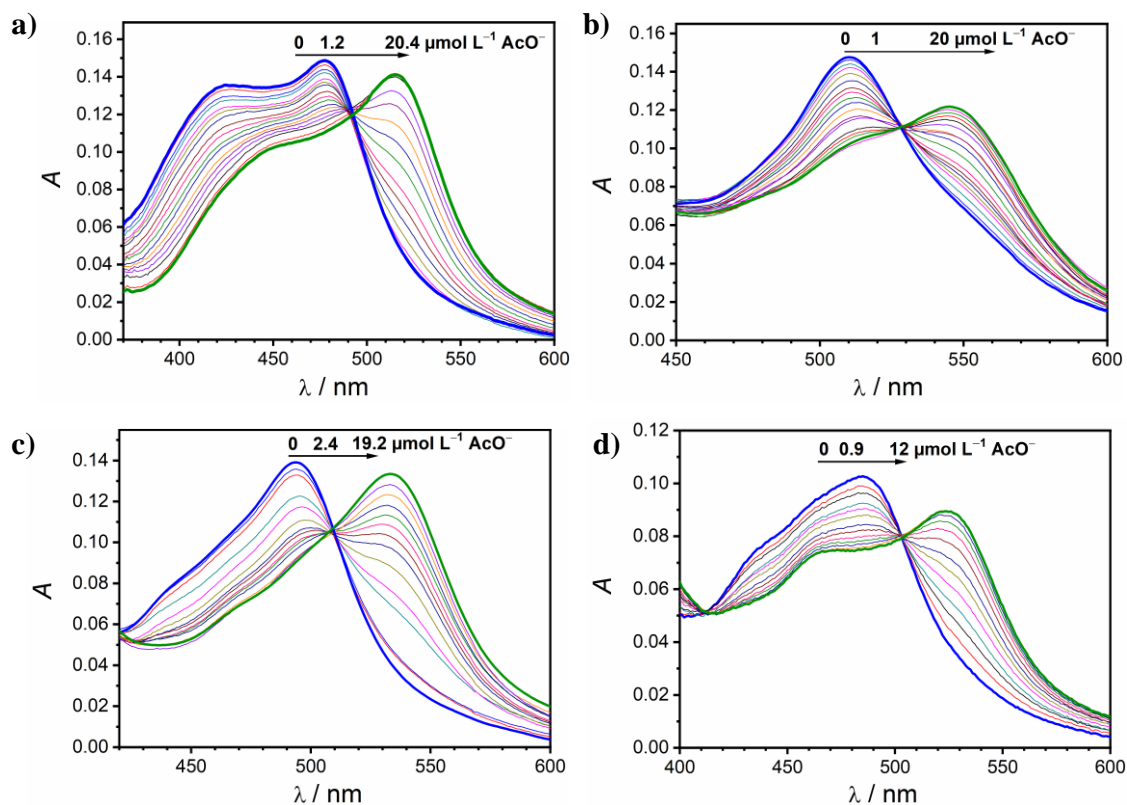
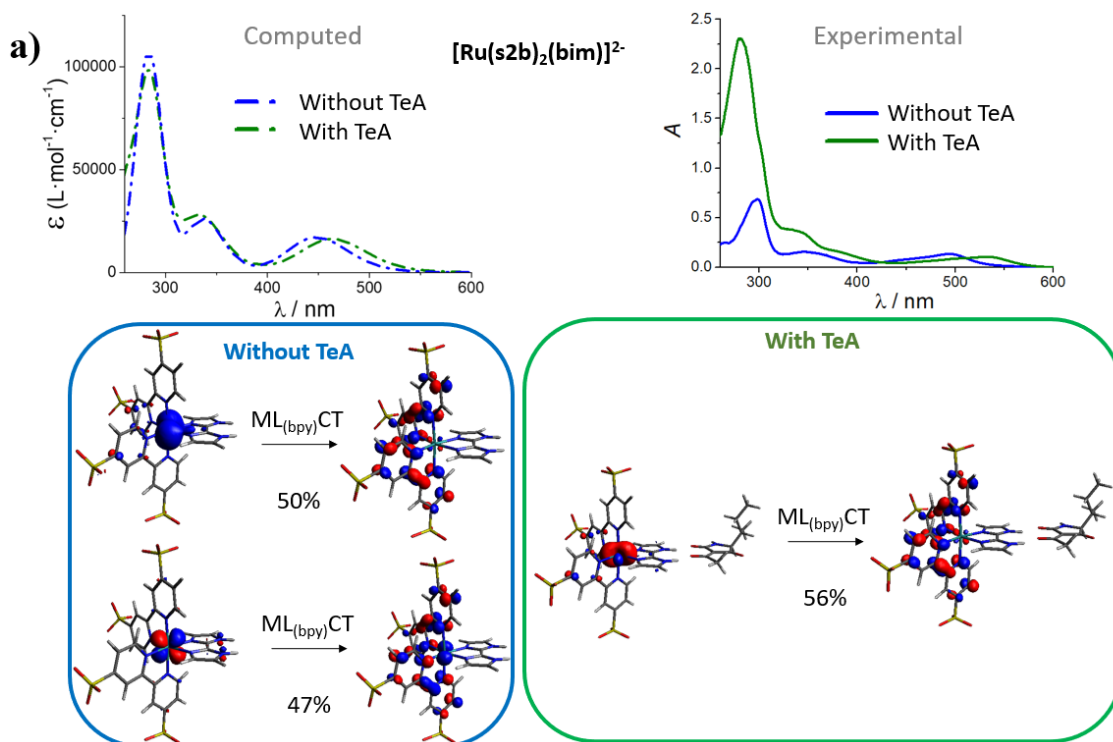


Figure S15. Changes in the UV-vis absorption for a) [Ru(phen)₂(bim)]²⁺ (12.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), b) [Ru(dcb)₂(bim)]²⁺ (10.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), c) [Ru(s2b)₂(bim)]²⁺ (12.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), and d) [Ru(dab)₂(bim)]²⁺ (9.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) in DMSO upon addition of increasing amounts of AcO⁻ (as TBA salt).



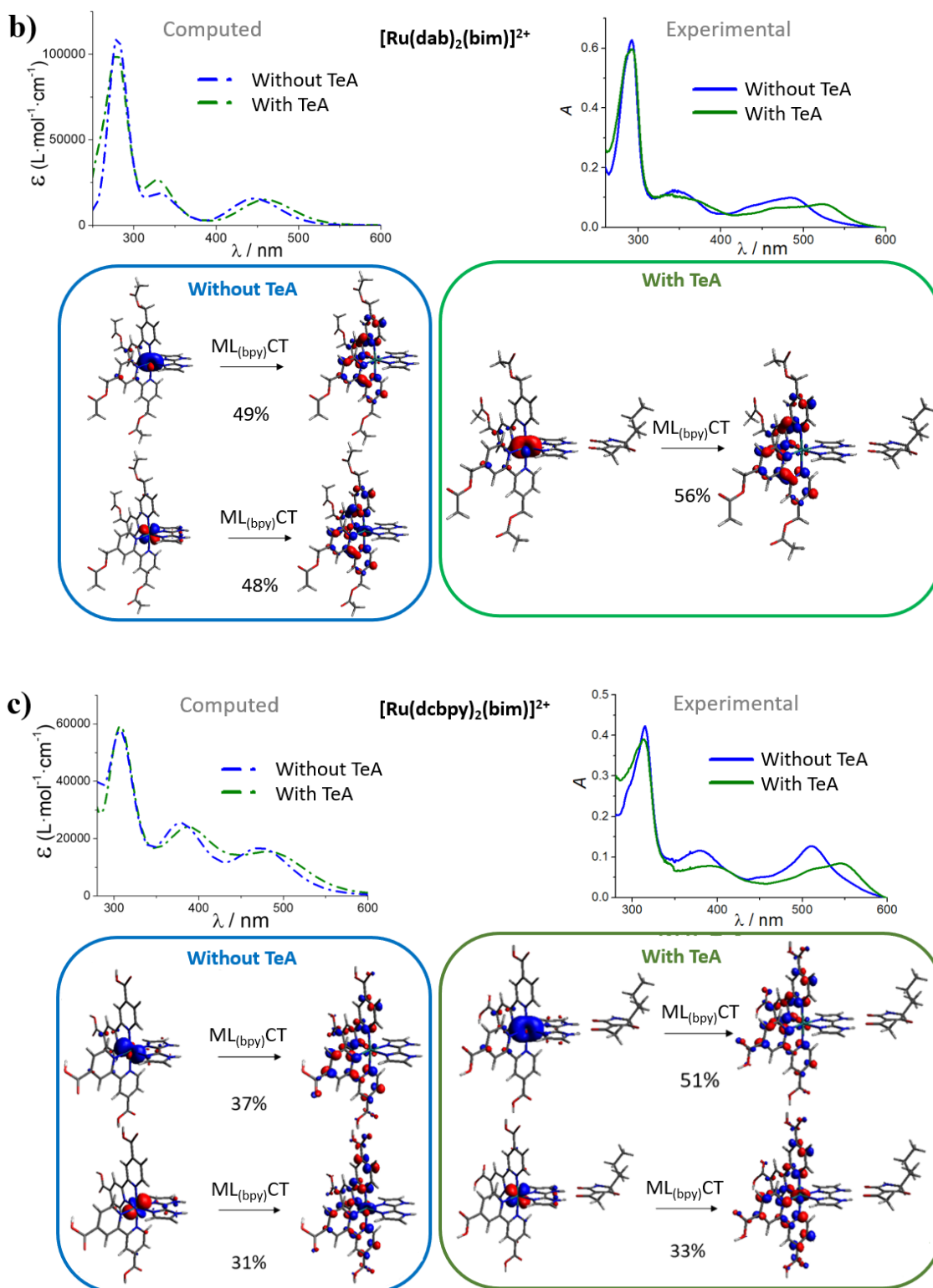


Figure S16. Calculated vs. experimental absorption spectra in the absence (blue lines) and in the presence (green lines) of TeA^- , and molecular orbitals involved in the electronic transition corresponding to the lowest energy band of a) $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{bim})]^{2+}$, b) $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$, and c) $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}$.

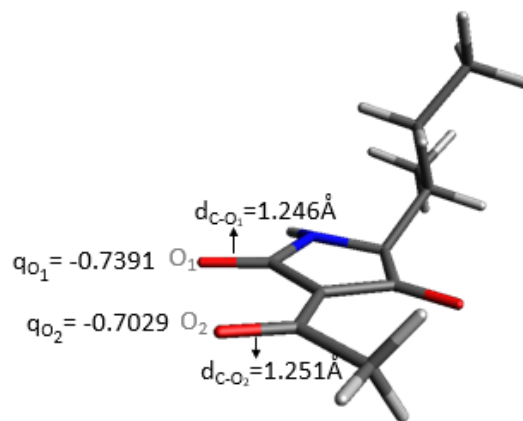


Figure S17. Structure of the ground state (S_0) minimum of TeA^- . The C–O distances and natural bond order (NBO) charges of the two oxygen atoms involved in the interaction with the Ru(II) complexes are depicted.

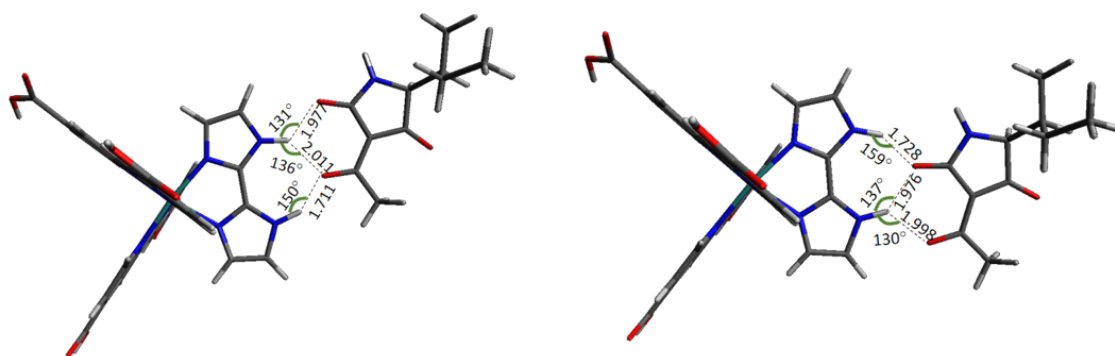


Figure S18. Structural parameters of the $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}-\text{TeA}^-$ adduct for the two similar most stable geometries.

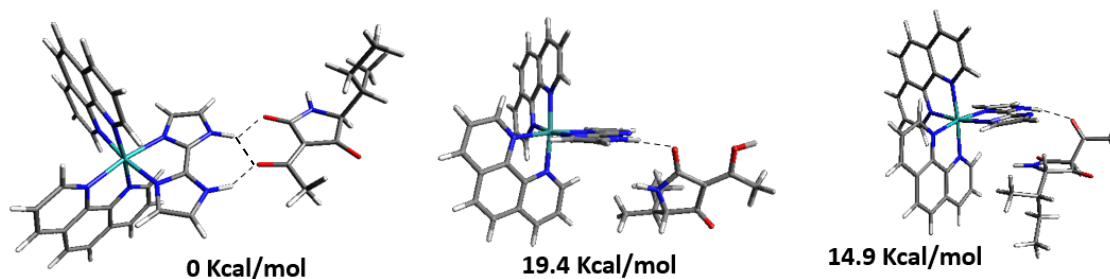


Figure S19. Calculated possible ground state geometries of the $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ system, depicting their energies relative to the most stable one (Figure 5b of the main text). The latter accounts for *ca.* 100% of the overall population at 298 K.

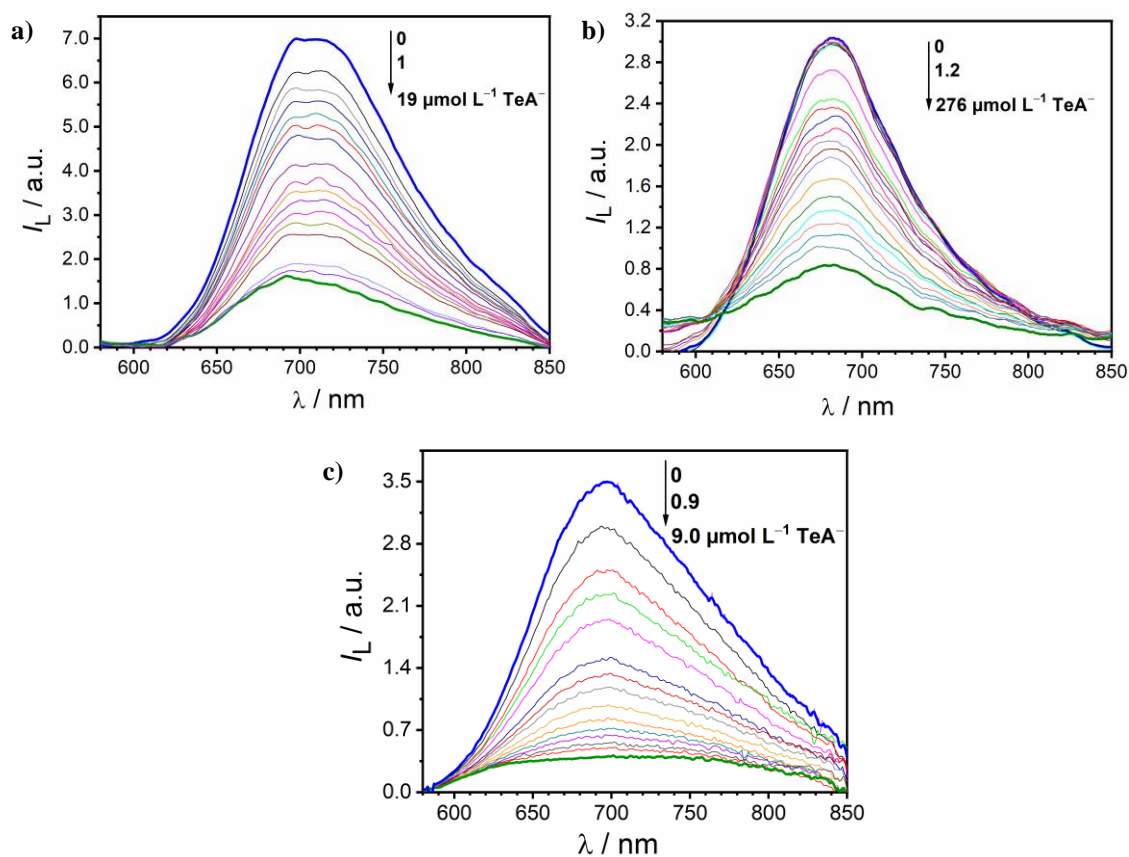


Figure S20. Changes in the luminescence spectra of a) $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}$ (corrected; $\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$, $10.0 \mu\text{mol L}^{-1}$), b) $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{bim})]^{2-}$ (corrected; $\lambda_{\text{exc}} = 510 \text{ nm}$, $12.0 \mu\text{mol L}^{-1}$), and c) $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ (corrected; $\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$, $9.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) in DMSO upon the addition of increasing amounts of TeA^- (as TBA salt).

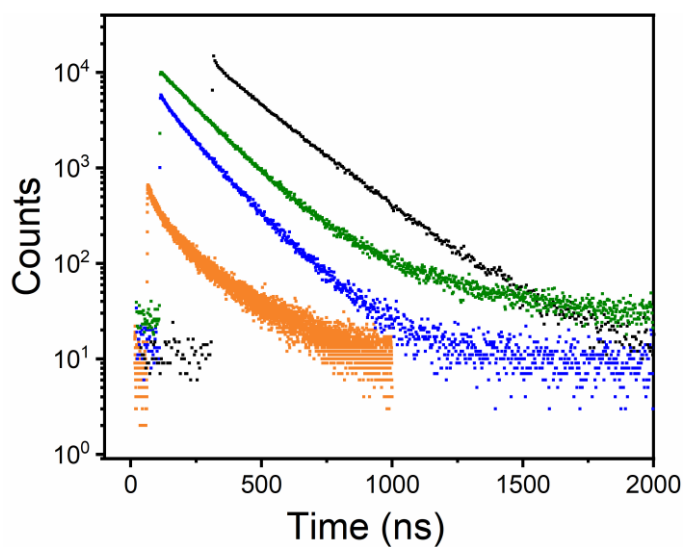


Figure S21. Luminescence decays of the photoexcited $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ (black line), $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}$ (blue line), $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ (orange line) and $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{bim})]^{2-}$ (green line) ($\lambda_{\text{exc}} = 463 \text{ nm}$).

Table S1. Energy difference (in kcal mol⁻¹) between the N⁻⋯TeAH/AcOH and NH⋯TeA⁻/AcO⁻ forms for different Ru-bim complexes.

Complex	[N ⁻ ⋯TeAH]–[NH⋯TeA ⁻]	[N ⁻ ⋯AcOH]–[NH⋯AcO ⁻]
[Ru(phen) ₂ (bim)] ²⁺	10.35124	3.73802
[Ru(s2b) ₂ (bim)] ²⁻	9.03663	3.60687
[Ru(dcb) ₂ (bim)] ²⁺	24.31312	3.66209

Table S2. Cartesian coordinates (in Å) of the ground state DFT-optimized structures.

[Ru(phen) ₂ (bim)] ²⁺ ⋯TeA ⁻				[Ru(dcb) ₂ (bim)] ²⁺ ⋯TeA ⁻			
44	1.425882	-0.043836	-0.034134	44	1.500681	-0.054309	-0.024124
6	2.461289	-4.446194	1.810149	6	2.330680	-4.455564	1.839468
6	3.148966	-3.902498	0.701624	6	3.035589	-3.967256	0.738492
6	2.763784	-2.614189	0.266582	6	2.758930	-2.684819	0.264086
7	1.772706	-1.893759	0.873104	7	1.813228	-1.905068	0.858182
6	1.138197	-2.431226	1.916509	6	1.134195	-2.378871	1.919537
6	1.458152	-3.707237	2.412681	6	1.363449	-3.644807	2.440384
6	3.418257	-2.004759	-0.849129	6	3.443122	-2.068942	-0.884858
6	4.455694	-2.687755	-1.523546	6	4.448126	-2.700037	-1.618627
6	5.063065	-2.030831	-2.617261	6	5.036366	-2.029433	-2.691326
6	4.623587	-0.768526	-2.975856	6	4.602833	-0.737667	-3.003429
6	3.582525	-0.161246	-2.252275	6	3.598431	-0.165984	-2.235728
7	2.990279	-0.758428	-1.216414	7	3.026749	-0.810060	-1.200835
1	2.724576	-5.433374	2.177544	6	2.578187	-5.819198	2.394768
1	0.359504	-1.827104	2.367206	1	0.397377	-1.712120	2.348649
1	0.910298	-4.094313	3.264711	1	0.799735	-3.995742	3.296231
1	5.864628	-2.519319	-3.162955	6	6.116965	-2.648274	-3.514790
1	5.067627	-0.234969	-3.808949	1	5.040439	-0.190392	-3.829447
1	3.216504	0.824511	-2.514229	1	3.229144	0.829886	-2.443108
6	4.205096	-4.579398	0.000438	1	3.785183	-4.584208	0.262468
6	4.831500	-3.996897	-1.064825	1	4.774856	-3.698905	-1.364238
6	4.420440	2.816074	2.552031	8	3.525543	-6.491008	1.717348
6	3.667667	3.293534	1.455562	8	6.431494	-3.890902	-3.109184
6	2.842448	2.365746	0.780303	8	6.656728	-2.089648	-4.452616
7	2.749236	1.051653	1.148572	8	1.987146	-6.275828	3.356533
6	3.472200	0.627997	2.186909	1	7.140612	-4.236905	-3.684946
6	4.319272	1.483676	2.912247	1	3.637592	-7.370494	2.127149
6	2.053616	2.784829	-0.336153	6	4.497876	2.687649	2.629363
6	2.094419	4.128341	-0.772492	6	3.742255	3.203689	1.575330
6	1.289522	4.476174	-1.880880	6	2.916122	2.358148	0.838437
6	0.509602	3.503487	-2.481776	7	2.815348	1.032687	1.145340

6	0.529039	2.188457	-1.984570	6	3.530831	0.539353	2.170652
7	1.281235	1.832877	-0.941501	6	4.385681	1.326729	2.932092
1	5.067825	3.494442	3.099250	6	2.099561	2.800397	-0.303691
1	3.371352	-0.418518	2.449150	6	2.062067	4.114685	-0.769258
1	4.882702	1.083397	3.747871	6	1.259113	4.427293	-1.867083
1	1.289676	5.497750	-2.248736	6	0.513693	3.412373	-2.473773
1	-0.120274	3.735862	-3.333394	6	0.594234	2.124726	-1.961527
1	-0.068619	1.404181	-2.434195	7	1.367263	1.820368	-0.902544
6	3.695141	4.654605	0.994525	6	5.368369	3.639375	3.395963
6	2.941172	5.054587	-0.072306	1	3.404608	-0.514465	2.381867
6	-0.611596	1.051999	2.286032	1	4.914165	0.862256	3.757473
6	-1.976339	0.968282	2.468643	6	1.172882	5.813733	-2.414433
7	-0.288336	0.406356	1.117024	1	-0.117930	3.623986	-3.328045
6	-1.438583	-0.058676	0.597321	1	0.037902	1.304150	-2.395890
7	-2.478594	0.266535	1.397588	1	3.815096	4.257987	1.342720
6	-1.340998	-0.781406	-0.642271	1	2.644880	4.889128	-0.289855
7	-0.117414	-0.927695	-1.178176	8	1.936532	6.687661	-1.735944
6	-0.278046	-1.639000	-2.343664	8	0.486023	6.121557	-3.371648
6	-1.619284	-1.918670	-2.507476	8	5.161026	4.836115	3.418890
7	-2.270384	-1.370132	-1.425901	8	6.411015	3.129852	4.079451
1	-3.477446	0.040833	1.256172	1	1.836818	7.570259	-2.142200
1	-3.281341	-1.365785	-1.190847	1	6.546202	2.180643	3.909631
1	0.139316	1.521231	2.903527	6	-0.516427	1.112176	2.281965
1	-2.625543	1.336450	3.246617	6	-1.883229	1.064358	2.458675
1	0.560299	-1.896623	-2.973102	7	-0.205907	0.438639	1.124772
1	-2.150167	-2.448681	-3.283002	6	-1.365500	-0.006147	0.606824
8	-5.068174	0.455246	2.376061	7	-2.398153	0.357817	1.397219
6	-6.228937	0.153753	2.028413	6	-1.281139	-0.748257	-0.622344
6	-6.685847	-0.534678	0.818821	7	-0.060339	-0.924359	-1.157098
8	-4.571512	-0.917442	-0.138866	6	-0.233441	-1.648378	-2.313460
6	-5.829347	-1.030549	-0.200008	6	-1.579608	-1.904401	-2.471903
6	-6.431507	-1.718002	-1.407292	7	-2.219593	-1.329659	-1.397806
7	-7.331923	0.437277	2.791541	1	-3.403489	0.157869	1.254379
6	-8.591370	0.111015	2.138746	1	-3.231570	-1.301925	-1.160549
6	-8.117879	-0.595484	0.852348	1	0.242080	1.574141	2.895527
8	-8.927915	-1.088634	0.046889	1	-2.526328	1.461097	3.227528
6	-9.499316	1.328738	1.852038	1	0.598473	-1.929265	-2.941195
6	-8.790409	2.383333	0.983141	1	-2.120360	-2.434346	-3.240513
6	-9.699662	3.533664	0.536137	8	-4.979445	0.648907	2.341728
1	-7.256453	1.041329	3.598954	6	-6.145689	0.360398	1.999341

1	-0.055086	-1.954510	-1.970703	1	0.471854	-1.420552	2.292026
1	-0.780008	-4.101250	-3.025218	1	0.953390	-3.607565	3.375415
1	-5.208422	0.632293	3.397931	1	5.082033	-0.110882	-3.957392
1	-3.030004	1.220576	2.337988	1	3.234264	0.919685	-2.658178
1	-4.280327	-3.997868	-0.536581	1	3.974500	-4.271977	0.392048
1	-5.304651	-2.899613	0.954541	1	4.937724	-3.456090	-1.264137
16	-3.160308	-5.761624	-2.555478	6	4.482918	3.137229	2.272039
8	-4.515455	-5.990257	-1.977184	6	3.730075	3.553552	1.176899
8	-2.142082	-6.763461	-2.120085	6	2.907297	2.641926	0.510466
8	-3.163110	-5.521991	-4.028841	7	2.821991	1.344167	0.910525
16	-6.971329	-1.690789	3.002178	6	3.552220	0.940741	1.967458
8	-6.627081	-1.959757	4.430364	6	4.386681	1.797710	2.669119
8	-7.404350	-2.902765	2.249512	6	2.077088	2.994498	-0.654791
8	-7.868621	-0.511968	2.820872	6	2.022657	4.275758	-1.209392
6	-3.009485	3.220528	-2.815522	6	1.210795	4.519085	-2.315654
6	-2.376160	3.587224	-1.633664	6	0.469590	3.451421	-2.837794
6	-1.871488	2.591409	-0.794641	6	0.564640	2.202339	-2.242166
7	-1.989008	1.272959	-1.117265	7	1.349968	1.969332	-1.173969
6	-2.609034	0.928667	-2.261554	1	3.451085	-0.100419	2.246986
6	-3.132657	1.868852	-3.139290	1	4.951354	1.417799	3.514489
6	-1.185393	2.866932	0.478580	1	-0.178851	3.583561	-3.698029
6	-0.964916	4.152572	0.980486	1	0.007996	1.351686	-2.615609
6	-0.308132	4.299417	2.195735	1	3.788622	4.582174	0.850064
6	0.117274	3.165862	2.891636	1	2.604343	5.083534	-0.787358
6	-0.132816	1.918190	2.337445	6	-0.523120	1.396197	2.062572
7	-0.769552	1.765537	1.160395	6	-1.885402	1.306565	2.260061
1	-2.678623	-0.132375	-2.465663	7	-0.196011	0.665672	0.945615
1	-3.631189	1.548864	-4.046700	6	-1.341827	0.144839	0.470921
1	0.629607	3.243783	3.843707	7	-2.382440	0.516088	1.250199
1	0.171302	1.004773	2.833253	6	-1.241039	-0.671158	-0.709182
1	-2.290878	4.635021	-1.376586	7	-0.019714	-0.837932	-1.244547
1	-1.295675	5.033778	0.446357	6	-0.178049	-1.641693	-2.348748
16	-3.626120	4.492626	-3.948879	6	-1.515401	-1.956680	-2.476092
8	-3.794583	5.712700	-3.108305	7	-2.166607	-1.335753	-1.434589
8	-4.904949	3.941911	-4.483964	1	-3.378125	0.262589	1.135163
8	-2.554741	4.621226	-4.982345	1	-3.174598	-1.335958	-1.186193
16	0.011230	5.949932	2.871257	1	0.223635	1.923760	2.636604
8	1.499631	6.071646	2.875332	1	-2.536077	1.724044	3.011475
8	-0.667377	6.893153	1.937082	1	0.658857	-1.933385	-2.965109
8	-0.584775	5.919923	4.239568	1	-2.043423	-2.555401	-3.201975

6	1.436889	0.615491	-1.679446	8	-4.965263	0.730288	2.239461
6	2.771000	0.268944	-1.629803	6	-6.109807	0.300728	1.983392
7	0.798873	0.042545	-0.605772	6	-6.542339	-0.607650	0.918474
6	1.731244	-0.637362	0.085687	8	-4.462243	-0.839203	-0.155741
7	2.936508	-0.518699	-0.514419	6	-5.691006	-1.130933	-0.090918
6	1.284552	-1.329073	1.264977	6	-6.262788	-2.067912	-1.134069
7	-0.016747	-1.229596	1.585708	7	-7.213608	0.638781	2.720924
6	-0.199363	-1.963072	2.734271	6	-8.429778	-0.040235	2.299861
6	1.013268	-2.505881	3.106422	6	-7.944301	-0.858241	1.085385
7	1.933127	-2.094238	2.168943	8	-8.723077	-1.574602	0.431179
1	3.834954	-0.931980	-0.212668	6	-9.601185	0.906384	1.961741
1	2.950118	-2.293093	2.102876	6	-9.224737	1.908535	0.855836
1	0.908166	1.222827	-2.398425	6	-10.400703	2.755951	0.357109
1	3.603644	0.505694	-2.272319	1	-7.117102	1.128631	3.600136
1	-1.166042	-2.050274	3.206788	1	-10.397798	0.254475	1.576317
1	1.290168	-3.134545	3.938405	6	-10.113400	1.597134	3.233397
8	5.647963	-0.815082	-1.016953	1	-7.086405	-1.590318	-1.675247
6	6.646852	-1.361145	-0.503069	1	-5.475866	-2.357127	-1.835668
6	6.729333	-2.212650	0.686925	1	-6.685376	-2.961442	-0.662507
8	4.461522	-2.105017	1.303289	1	-8.426005	2.565176	1.225163
6	5.628062	-2.541301	1.521676	1	-8.803348	1.357388	0.005413
6	5.846012	-3.441030	2.720066	1	-10.094306	3.385207	-0.486911
7	7.909155	-1.239375	-1.018423	1	-10.788683	3.419259	1.138159
6	8.917142	-1.996090	-0.292976	1	-11.228106	2.119714	0.016837
6	8.090453	-2.635088	0.842286	1	-11.030930	2.161913	3.040101
8	8.619348	-3.368656	1.696968	1	-9.368885	2.301326	3.627571
6	10.099733	-1.148825	0.224245	1	-10.334199	0.862791	4.017653
6	9.627727	-0.010946	1.147045	1	-8.762490	-0.746507	3.074415
6	10.769754	0.759128	1.819747	6	5.385081	4.071085	3.036861
1	8.068619	-0.783602	-1.906478	1	6.412885	3.693076	3.018015
1	10.711971	-1.841025	0.819455	1	5.055879	4.128834	4.079357
6	10.948289	-0.641327	-0.950202	6	1.101602	5.875314	-2.958640
1	6.581938	-3.003777	3.403291	1	0.071111	6.242282	-2.911094
1	4.897680	-3.589544	3.243271	1	1.391099	5.827384	-4.013470
1	6.254794	-4.408583	2.410514	6	6.273405	-2.520875	-3.485823
1	9.004332	0.683714	0.568670	1	5.962841	-2.708439	-4.518963
1	8.980115	-0.431459	1.926874	1	7.149070	-1.864377	-3.514030
1	10.374930	1.493222	2.532051	6	2.802545	-5.454568	2.585846
1	11.381913	1.303243	1.091951	1	1.943662	-6.119082	2.444478
1	11.431434	0.079273	2.372221	1	2.972382	-5.329717	3.660017

1	11.872008	-0.169063	-0.600968	8	1.965362	6.790746	-2.268023
1	10.400576	0.103967	-1.541855	6	1.984039	8.065417	-2.717060
1	11.228255	-1.465360	-1.617755	8	1.310723	8.441095	-3.660244
1	9.315582	-2.805907	-0.921283	6	2.925082	8.915247	-1.908089
				1	3.938883	8.505035	-1.962728
				1	2.918810	9.937214	-2.288476
				1	2.622971	8.908794	-0.855642
				8	5.330249	5.369141	2.426959
				6	5.996810	6.428417	2.950635
				8	5.908723	7.491017	2.363993
				6	6.790274	6.222424	4.214983
				1	7.287820	7.157054	4.473665
				1	6.134193	5.923735	5.040071
				1	7.540172	5.434995	4.086629
				8	3.968511	-6.018109	1.966342
				6	4.419419	-7.254447	2.296166
				8	5.419982	-7.654724	1.730641
				6	3.657590	-8.044531	3.328901
				1	4.170315	-8.992047	3.494264
				1	3.592443	-7.497224	4.275150
				1	2.634793	-8.243067	2.989953
				8	6.629295	-3.764147	-2.862428
				6	7.616698	-4.477302	-3.448375
				8	8.190140	-4.103038	-4.455895
				6	7.888515	-5.752010	-2.697802
				1	8.692802	-6.303283	-3.186016
				1	8.168040	-5.524711	-1.663826
				1	6.982913	-6.366805	-2.667013

Table S3. Global analysis of the luminescence lifetimes of [Ru(phen)₂(bim)]²⁺ (12.0 μmol L⁻¹) at (25 ± 1) °C in air-equilibrated DMSO upon the addition of increasing amounts of TeA⁻.^a

[TeA] (μmol L ⁻¹)	τ_1/ns (B_1) (%)	τ_2/ns (B_2) (%)	τ_m/ns^c
2.4	68 (1447) (6)	164 (8557) (94)	150
6.0	68 (1682) (8)	164 (8156) (92)	148
9.6	68 (2644) (14)	164 (6643) (86)	137
12.0	68 (3552) (30)	164 (3242) (70)	114
24.0	68 (2807) (40)	164 (2329) (60)	112

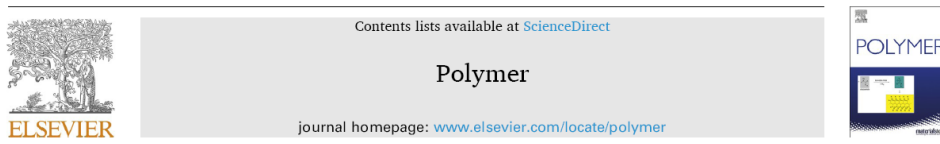
^a To determine the luminescence lifetimes, the decays are fitted to the function $I_L = B_0 + \sum_i B_i \tau_i$, being i the number of exponentials required to achieve a global $\chi^2 < 1.08$. ^b The relative contributions to the overall luminescence have been calculated as $\%_i = B_i \tau_i / \sum_i B_i \tau_i$. ^c Pre-exponentially weighted average luminescence lifetime: $\tau_m = \sum_i B_i \tau_i / \sum_i B_i$; estimated uncertainties of the lifetimes: $\tau_i \pm 3\%$; $\tau_m \pm 1.5\%$.

REFERENCE

(1) Orellana, G.; Álvarez-Ibarra, C.; Santoro, C. Hydrogen-1 and carbon-13 NMR coordination-induced shifts in a series of tris(α -diimine)ruthenium(II) complexes containing pyridine, pyrazine, and thiazole moieties. *Inorg. Chem.* **1988**, 27, 1025–1030.

2. Luminescent Molecularly Imprinted Polymer Nanocomposites for Emission Intensity and Lifetime Rapid Sensing of Tenuazonic Acid Mycotoxin

Polymer 230 (2021) 124041



Luminescent molecularly imprinted polymer nanocomposites for emission intensity and lifetime rapid sensing of tenuazonic acid mycotoxin

José Quílez-Alburquerque^a, Ana B. Descalzo^{a,*}, María C. Moreno-Bondi^b, Guillermo Orellana^{b,*}

^a Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid (UCM), 28040, Madrid, Spain
^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid (UCM), 28040, Madrid, Spain

Adapted with permission from: *Polymer* **2021**, 230, 124041.

<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124041>

Copyright © 2021 Elsevier

KEYWORDS: *luminescence, molecularly imprinted polymers, nanoparticles, ruthenium(II) complexes, tenuazonic acid.*

Abstract

Tenuazonic acid ((5*S*)-3-acetyl-5-[(2*S*)-butan-2-yl]-4-hydroxy-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-2-one, TeA) is a widespread *Alternaria* fungi mycotoxin in food produce. This toxin may be allergenic and provoke hay fever and asthma. Therefore, rapid methods to selectively detect TeA are needed. With this aim, we have engineered a novel trifunctional (red-luminescent, polymerizable, TeA-sensitive) ruthenium(II)-bipyridyl complex with 2,2'-biimidazole. Its peripheral N-H moieties recognize the enolate form of 1,3-dicarbonyl compounds (including TeA) in partially aqueous media. Such a binding decreases the luminescence intensity and lifetime (0.2 μ s) of the Ru(II) probe. The probe also bears acrylate groups that allow radical copolymerization with methacrylamide and ethylene glycol dimethacrylate in the presence of TeA, to yield 9-nm thick luminescent molecularly imprinted polymer (MIP) shells onto 200-nm silica cores. The SiO₂@Ru-MIP nanocomposite displays a very fast response (< 5 s) suitable for real-time detection of TeA. No cross-sensitivity to other common food mycotoxins that also contain a β -hydroxycarbonyl moiety (alternariol, β -zearanol, cyclopiazonic acid) is observed. Detection limits of 63.8 μ g L⁻¹ and 75.2 μ g L⁻¹ under steady-state and time-resolved luminescence detection, respectively, have been measured without further optimization. The use of emission lifetime variations to monitor the levels of a target analyte has never been reported for a luminescent MIP-based sensor.

1. Introduction

Tenuazonic acid, (5*S*)-3-acetyl-5-[(2*S*)-butan-2-yl]-4-hydroxy-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-2-one or TeA (Scheme 1a), is a widespread mycotoxin produced mainly by *Alternaria* fungi that grow on vegetables, oilseeds, fruits and cereal grains among other foods [1,2]. This ubiquitous species is often allergenic to humans, grow indoors and may cause hay fever or hypersensitivity reactions leading to asthma. In addition to TeA, *Alternaria* fungi produce other toxic secondary metabolites such as alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether and altenuene [3]. TeA is the most toxic chemical of the family (e.g. LD₅₀ 81–186 mg kg⁻¹ body weight for mice, 168–180 mg kg⁻¹ b.w. for rats, and 0.55 mg per egg for chicken embryos) [4]. Different studies have confirmed the co-occurrence of *Alternaria* toxins in high levels, from μg kg⁻¹ to mg kg⁻¹, in food [5,6]. No guideline limits for TeA in foods have been set so far by the regulatory authorities, despite this mycotoxin has been identified as toxicologically relevant for public safety [7].

Several methods for TeA quantification have been described. The simplest ones are those based on high performance liquid chromatography (HPLC) with UV absorption detection. Nevertheless, due to the faint absorption of TeA in this region, they display low detectability and reproducibility that are improved by addition of ZnSO₄ to the mobile phase to carry out metal complexation with the analyte [8]. Much more sensitive HPLC-mass spectrometry (MS) methods with double or even triple mass detector have been developed [9-11]; however, in addition to the cost of the instrumentation, they often require previous clean-up and preconcentration steps using solid phase extraction [10] or the so called ‘QuEChERS’ [11]. Therefore, the development of sensitive, selective, straightforward analytical methods for rapid inexpensive quantification of TeA, applicable to in situ determinations, is highly desirable.

Luminescence is arguably one of the best choices to develop novel chemosensing platforms, thanks to its high sensitivity, good selectivity, versatility (intensity, lifetime and polarization measurements are possible), and long-term stability (if ratiometric-intensity or emission lifetime-based measurements are used) [12,13]. In this regard, we have devoted significant efforts to the molecular tailoring, preparation and photochemical characterization of red-luminescent polypyridyl ruthenium(II) complexes for industrial, environmental and clinical sensing [14]. These dyes show unique properties such as high (photo)chemical stability, long emission lifetimes (up to 7 μs), large Stokes shifts (> 150 nm), and luminescence quantum yields between 0.4 and 0.04. Furthermore, their photochemical properties and polymer-supporting method may be finely tuned to the target analyte by a judicious selection of the ligands.

In order to recognize the target species, at least an analyte-selective ligand must be introduced in the Ru(II) complex coordination sphere. TeA displays keto-enol tautomerism because of its triple β -dicarbonyl structure (Scheme 1a, $pK_a = 3.5$) [15]. Considering the chemical structure and properties of TeA, we propose the 2,2'-biimidazole (bim) ligand as a suitable receptor. Its double bidentate feature allows incorporation to the metal coordination sphere while keeping its role as receptor of bidentate anions of adequate geometry by establishing two simultaneous hydrogen bonds (Scheme 1b) [16]. Several studies confirm the use of transition metal-bim complexes as luminescent probes for optical transduction upon molecular recognition [17], but their interaction with 1,3-diketonate anions has not been investigated so far. The use of Ru(II)-bim complexes as probes of β -diketonates may be of interest not just in the analysis of food contaminants (the above-mentioned TeA, the related cyclopiazonic acid, or the β -zearalenone and zearanol mycotoxins) [18], but also in other fields such as sensing of fluoroquinolone antibiotics [19] and sensitizers for photodynamic therapy (PDT) like curcumin and curcuminoids [20].

The probe selectivity towards TeA can be further improved through combination of the luminescent features of Ru(II) complexes with a molecularly imprinted polymer (MIP) as recognition element. MIPs are biomimetic materials synthesized in the presence of a template molecule, normally the target analyte or a structural surrogate of it, by copolymerization of complementary functional monomers and a cross-linker [21,22]. The template is removed after the polymerization, leaving behind empty cavities into a highly cross-linked matrix which are complementary in size, shape, and functional groups to the template. The MIPs long-term stability, high selectivity, low cost and robustness [23], have led to their success in different applications such as sensors [24,25], enzyme mimicking and catalysis [26], and solid-phase extraction [27]. Regarding their application to chemical sensing, one of the main handicaps of using MIPs is their highly cross-linked nature. While required to provide rigidity to the binding cavity, it yields slow analyte diffusion rates. A way to circumvent this problem is to increase the surface-to-volume ratio of the MIP materials, so that mass-transfer processes speed up. The latter can be achieved, for example, by using core-shell nanoparticles where the MIP is grown as a few-nm layer onto a non-imprinted core substrate such as a silica, quantum dot, or carbon dot nanoparticle [28–30]. Furthermore, the template is efficiently removed, an issue of utmost importance for the analysis of trace levels [31].

Incorporation of a luminescent probe in the MIP backbone allows detection of the target analyte if binding to the latter changes the probe emission features. Intensity-based luminescence measurements are very sensitive and straightforward to use. However, they may display poor reproducibility for particulate materials due to light scattering, probe

photobleaching or excitation light source drift. These drawbacks are suppressed if the probe luminescence lifetime as a function of the analyte concentration is monitored instead [32].

In this paper we describe a luminescent MIP based on a tailored multifunctional Ru(II) complex containing a biimidazole ligand as the β -diketonate recognition moiety. The polymerizable probe belongs to the MIP scaffold, grown as a nanolayer onto SiO₂ nanobeads for tenuazonic acid sensing. Fast diffusion of the analyte through the few nm-thick MIP shell provides a selective instantaneous optical response. The system allows detection of ng mL⁻¹ amounts of TeA in partially aqueous media by measuring changes in either the luminescence intensity or lifetime of the Ru(II)-doped material.

2. Experimental

2.1. Materials

The precursor 2,2'-biimidazole (bim) and 2,2'-bipyridin-4,4'-diylldimethyl diacrylate (dab) ligands were synthesized by literature procedures [33,34]. The intermediate *cis*-[Ru(dab)₂Cl₂] complex was prepared by adapting a general method (see below) [35]. All reactions involving Ru(II) were carried out under argon. The 'synthetic' tenuazonic acid, a mixture of the 5*S* and 5*R* (81:19) diastereoisomers (as per HPLC analysis of the diastereoisomers mixture), was obtained from L-isoleucine methyl ester by a reported procedure [36].

Lithium chloride and Ru(III) chloride trihydrate, were purchased from Acros Organics (Belgium). Butylhydroxytoluene (BHT), acryloyl chloride, tetrabutylammonium hydroxide, tetrabutylammonium fluoride, ethyleneglycol dimethacrylate (EDMA), tetraethyl orthosilicate (TEOS), carbon disulfide, and phenylmagnesium bromide (1 M solution in THF) were from Merck (Germany). 4,4'-Bis(hydroxymethyl)-2,2'-bipyridine was from TCI (Japan), whereas tetrabutylammonium acetate and 4-(chloromethyl)phenyltrichlorosilane were from Alfa Aesar (Germany). Methacrylamide (MAM) was supplied by Fluka (Switzerland). Ammonium hexafluorophosphate was from Fluorochem (UK). The initiator *N,N*-azobis(2,4-dimethyl)valeronitrile (ABDV) was purchased from Wako (Germany) and used as received. Alternariol (AOH) was from Apollo Scientific (UK), while cyclopiazonic acid (CPA) and β -zeranol (β -ZOL) were from Merck. The natural TeA was isolated from the commercial Cu(II) bis-chelate complex (Cayman Chemical, USA; +98%) by dissolving the complex in methylene chloride and slowly passing it through a column containing Dowex 50X8 resin. *m*-Xylene, anhydrous dimethylformamide (DMF) and anhydrous tetrahydrofuran (THF) were from Merck, whereas toluene, methanol (MeOH) and acetonitrile (MeCN) (all HiPerSolv Chromanorm HPLC grade) were from VWR (Germany). Trifluoroacetic acid (99%) was from Fluorochem, hydrochloric acid (37%) was from Fisher Scientific (UK), and ethylene glycol (+99%) from

Scharlau (Spain). Type I ultrapure water was produced with a Merck Millipore (US) Direct-Q-3UV system. Deuterated solvents with tetramethylsilane (TMS) as internal reference were from VWR.

2.2. Instrumentation

UV-vis absorption spectra were recorded with a Varian Cary 3-Bio spectrophotometer (CA, USA). Steady-state luminescence spectra of the indicator dyes in solution were measured with either a FluoroSENS (Gilden Photonics, UK) or a Horiba (Japan) Fluoromax-4TCSPC spectrofluorometer, both fitted with a red-sensitive R928 photomultiplier (Hamamatsu, Japan; response up to 850 nm) and equipped with a 150 W xenon lamp. The excitation wavelength was always set at 500 nm and the luminescence spectra have been corrected for the instrument response in all cases. Luminescence lifetime measurements were performed on an Edinburgh Instruments (UK) FLS980-Xd2-T spectrometer equipped with a Horiba 470LH diode laser (463 nm, <1 ns pulse width), an excitation 467-nm bandpass interference filter, a 500 nm-blazed double monochromator in the emission channel, and a Hamamatsu R928P photomultiplier thermoelectrically cooled at -21 °C.

2.3. Synthesis of *cis*-Ru(dab)₂Cl₂

143 mg (0.69 mmol) of ruthenium(III) chloride hydrate, 450 mg (1.39 mmol) of dab, 118 mg (2.77 mmol) of lithium chloride and 2 mg of BHT (9.07×10^{-3} mmol) were dissolved in 3 mL of anhydrous DMF. The solution was kept at 80 °C for 2 h under argon with stirring. When TLC in silica (MeCN–water–KNO₃ satd. aq. soln. 50:2:1 v/v/v) showed a complete consumption of the starting materials, the reaction mixture was cooled down and the dichloro Ru(II) complex was precipitated by slow addition of a mixture of dichloromethane and diethyl ether (1:1 v/v). The resulting deep purple solid was collected by filtration and dried overnight in a vacuum oven (30 °C, 0.01 Torr; 85% yield). UV–vis (MeCN): λ_{max} ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 498 (2950), 380 (4550), 300 nm (19200).

2.4. Synthesis of [Ru(dab)₂(bim)]²⁺

650 mg (0.79 mmol) of *cis*-Ru(dab)₂Cl₂, 108 mg (0.79 mmol) of 2,2'-biimidazole and 2 mg of BHT (9.07×10^{-3} mmol) were dissolved in 4 mL of ethylene glycol. The solution was kept at 80 °C for 1 h under argon until the TLC (silica; MeCN–water–KNO₃ satd. soln. 50:2:1 v/v/v) showed complete consumption of the starting materials. Then, the reaction mixture was cooled and 2 mL of water was added. The heteroleptic complex precipitated upon addition of a saturated aqueous solution of ammonium hexafluorophosphate and was collected and washed with water. The resulting solid was purified by column chromatography (silica gel; methylene chloride–methanol 9:1 v/v) to afford a deep red product in 30% yield. ¹H NMR (300 MHz,

CD₃CN, TMS) δ : 8.41 (s, 4H), 7.91 (d, J = 6 Hz; 2H), 7.81 (d, J = 6 Hz; 2H), 7.41 (d, J = 5 Hz; 2H), 7.30 (d, J = 5 Hz; 2H), 7.21 (s, 2H), 6.44 (m, 4H), 6.30 (m, 6H), 5.99 (m, 4H), 5.37 (s, 4H), 5.33 ppm (s, 4H). ¹³C NMR (500 MHz, CD₃CN, TMS) δ : 164.2, 164.1, 162.5, 161.7, 159.7, 158.7, 154.0, 153.5, 142.8, 142.7, 141.7, 135.5, 135.4, 128.8, 126.46, 125.8, 122.3, 122.1, 122.0, 116.28, 43.22 ppm. MS (ESI) m/z: [M⁺ – H] calcd. for C₄₂H₃₇N₈O₈Ru, 883.2; found, 883.3. UV–vis (MeCN): λ_{max} (ϵ / M⁻¹cm⁻¹) 485 (8448), 346 (10570), 292 nm (56932).

2.5. Preparation of the RAFT agent-bonded SiO₂ particles

200-nm dia. SiO₂ nanobeads were obtained by a modified Stöber method [37]. Briefly, TEOS (8.0 mL) was quickly added to a solution of ethanol (800 mL), water (200 mL) and 28% ammonia aq. solution (54 mL). The reaction mixture was kept for 24 h at room temperature under stirring (300 rpm). The nanobeads were isolated by centrifugation (11,000 rpm), washed with 20 mL of ethanol (3x), and resuspended in ethanol (54 mg mL⁻¹).

Before modifying the Stöber nanoparticles surface, an activation/re-hydroxylation step is needed. To achieve it, the ethanol was removed, and the nanoparticles were washed with 20 mL of water and resuspended in 30 mL of water. Then, 7.5 mL of 37% HCl was added, and the mixture was kept under reflux for 5 h. The reaction mixture was cooled down to room temperature and the particles were washed by centrifugation (11,000 rpm) with ca. 20 mL of water (3x), 20 mL of MeOH (3x) and 20 mL of toluene (2x), and resuspended in toluene. After activation of the nanobeads surface, the silanization procedure follows. 4-(Chloromethyl)phenyltrichlorosilane (3.0 mL) was added to 40 mL of an argon-sparged anhydrous toluene suspension of ca. 2 g of activated beads placed in a two-neck round-bottom flask. Then, a solution of triethylamine (1.86 mL) in dry toluene (10 mL) was incorporated dropwise, and the reaction mixture refluxed overnight under argon. Finally, the silanized nanoparticles were washed by centrifugation with toluene (3x), MeOH (3x) and THF (3x), using ca. 20 mL for each washing.

To covalently attach the RAFT agent, carbon disulfide (4.6 mL) was added dropwise to a solution of phenylmagnesium bromide (30 mL; 1.0 mol L⁻¹ in THF), previously sparged with argon for 15 min, to give a deep red solution. The reaction mixture was stirred at 50 °C for 1 h. Then, ca. 2 g of silane-modified SiO₂ nanobeads suspended in 40 mL of dry THF was added, and the mixture was stirred at 50 °C for 3 h. Finally, the functionalized particles were washed by centrifugation with THF (3x) and MeCN (3x), using ca. 20 mL for each washing.

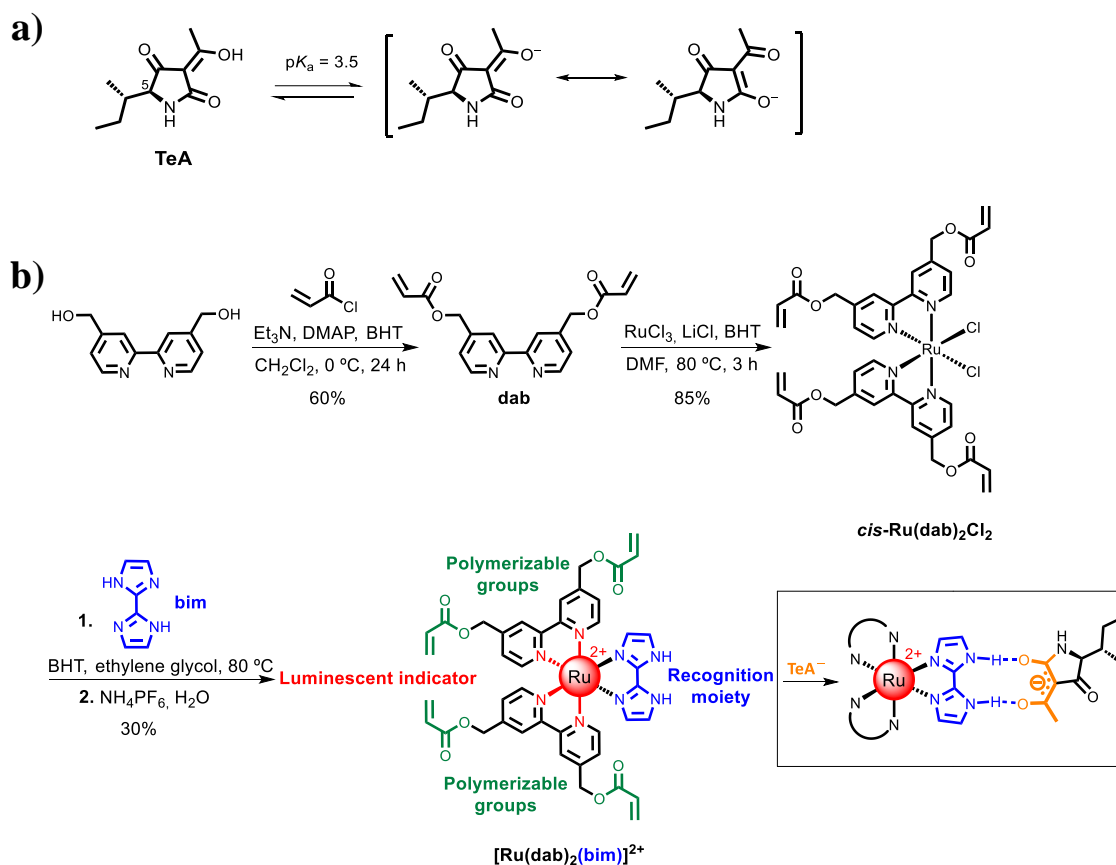
2.6. Preparation of SiO₂@Ru-MIP nanobeads

Synthetic tenuazonic acid (TeA, 1.0 mg; 0.005 mmol), tetrabutylammonium hydroxide solution in dry MeOH (5 μ L; 5 μ mol), and [Ru(dab)₂(bim)]²⁺ monomer (6.0 mg; 5 μ mol) were combined in 5 mL of MeCN. The mixture was cooled at 8 °C for 1 h to favor interactions between the functional monomer and the template molecule. Then, MAM (9.4 mg, 0.11 mmol), EDMA (90 μ L, 0.47 mmol), and ABDV (5 mg, 0.02 mmol) were added, plus a suspension of 7.5 mg of RAFT agent-functionalized SiO₂ beads in 5 mL of MeCN. The mixture was sparged with argon and kept at 70 °C for 24 h. For removing the template (TeA), the beads were washed with a MeOH–TFA mixture (9:1 v/v) (3 x 15 mL) and then with acetonitrile (3 x 15 mL). The non-imprinted polymer (NIP) particles were synthesized under the same conditions but without adding the template molecule.

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis of the [Ru(dab)₂(bim)]²⁺ Trifunctional Monomer

Scheme 1b depicts the chemical structure and procedure to prepare the luminescent [Ru(dab)₂(bim)]²⁺ dye containing four polymerizable acryloyl groups in two dab ligands to allow its covalent incorporation into the MIP matrix, and the bim ligand for recognizing TeA. The dab ligand was readily synthesized in 60% yield from commercial bipyridine-4,4'-dimethanol and acryloyl chloride [34]. The *cis*-Ru(dab)₂Cl₂ precursor was prepared by adapting a general procedure to synthesize *cis*-Ru(bpy)₂Cl₂ [35], in which the stoichiometric amount of dab was mixed with RuCl₃ in the presence of a small amount of butylhydroxytoluene (BHT) to inhibit the untimely radical polymerization, and a large excess of LiCl to prevent formation of the tris-dab complex. The target Ru(II) probe was synthesized by reacting *cis*-Ru(dab)₂Cl₂ and 2,2'-biimidazole (bim) in hot ethylene glycol for solubility reasons. The trifunctional metal complex was isolated by precipitation as its PF₆⁻ salt. Figure S1–S4 show the NMR, MS and FTIR data that confirm the identity of the [Ru(dab)₂(bim)](PF₆)₂ complex.



2.2 Spectroscopic Characterization of the $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ Luminescent Probe

Ru(II) complexes containing the 2,2'-biimidazole ligand have already been described as receptors for simple anions such as bromide, fluoride, phosphate or acetate based on hydrogen bonding interactions, but not for β -dicarbonyl compounds [17]. These studies show that their absorption, emission and redox properties depend on the protonation state of this ligand, as it includes two peripheral N-H moieties that may undergo double deprotonation with strong bases such as fluoride in organic media [38,39]. For acetate detection, Cui *et al.* employed luminescent $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (bpy stands for 2,2'-bipyridine) in neat acetonitrile and observed a 32-nm red shift of the absorption of the free complex at 475 nm upon addition of AcO^- , with an isosbestic point at 486 nm, and significant quenching of the probe emission (that moved from 635 to 648 nm) [40].

In the case of our $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ complex, addition of acetate leads to similar effects. Figure S5a-b shows that addition of increasing amounts of acetate (as its tetrabutylammonium or "TBA" salt) in neat acetonitrile induces a red shift of the $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ probe absorption

from 485 nm to 524 nm, with isosbestic points at 413 and 503 nm. When the same study was performed with the target anion, namely the TBA salt of the synthetic TeA (Figure 1a), very similar changes of the absorption profile were observed: the absorption band of the Ru(II) probe at 485 nm decreases gradually while a new peak at 524 nm appears upon the TeA⁻ addition, with isosbestic points at 412 nm and 500 nm. The clear isosbestic points obtained are indicative of a defined 1:1 stoichiometry for the [Ru(dab)₂(bim)]²⁺-TeA⁻ adduct. The titrations displayed in Figure S5a and Figure 1a have been employed to determine the binding constants (K_b) of the Ru(II) complex to AcO⁻ and TeA⁻ with the HypSpec software (v1.1.50, Protonic Software, www.hyperquad.co.uk) [41]. The best fit of the experimental spectroscopic titration data yields $\log K_b(\text{AcO}^-) = (6.08 \pm 0.01)$ and $\log K_b(\text{TeA}^-) = (6.83 \pm 0.03)$. These results evidence a stronger interaction between the Ru(II)-bim probe and the deprotonated 1,3-dicarbonyl toxin than that with the acetate anion in the same organic medium. This result suggests a more efficient hydrogen bonding of the biimidazole ligand to the 1,3-diketone anion.

Upon excitation at the 500 nm isosbestic point (Figure 1b), the free [Ru(dab)₂(bim)]²⁺ shows luminescence at 700 nm in acetonitrile. The emission is dramatically quenched upon addition of either AcO⁻ or TeA⁻ (Figure S5b and Figure 1b, respectively), with progressive band broadening. The latter suggests the existence of distinct emissive species that result from the interaction via hydrogen bonding and deprotonation of the Ru(II) complex. Favorable electrostatic interactions between RuL₂(bim)²⁺ and TeA⁻ or AcO⁻ also contribute to the probe association to these species in acetonitrile.

The emission quenching and band broadening of the [Ru(dab)₂(bim)]²⁺ indicator dye is also observed in acetonitrile solutions upon addition of small amounts of water (Figure S5c-d). As it is expected for a recognition system relying on hydrogen bonding interactions, an increase of the water content from 0 to 10% in acetonitrile leads to significant changes of the probe luminescence, since water is a strong hydrogen bond donor and acceptor. Water efficiently solvates [Ru(dab)₂(bim)]²⁺ and provokes its (partial) deprotonation, similarly to the effect of bases such as AcO⁻ (Figure S5a-b) and TeA⁻ (Figure 1a-b), yielding different emissive species. In order to confirm deprotonation of the bim complex, a test with fluoride (a well-known strong base in organic media) in dimethyl sulfoxide solution was carried out (Figure S6). Upon addition of a 10-fold excess of F⁻, the observed 50-nm blue shift of the [Ru(dab)₂(bim)]²⁺ emission confirms its deprotonation. Nevertheless, this hypsochromic shift of the luminescence is not paralleled by the expected blue-shift of the probe absorption (Figure S6). This is not without precedent for Ru(II) heteroleptic complexes: due to the combined solvent reorientation and geometry relaxation that occur after intersystem crossing to their luminescent ³MLCT triplet state, an increase of the downwards transition energy upon deprotonation may occur [42].

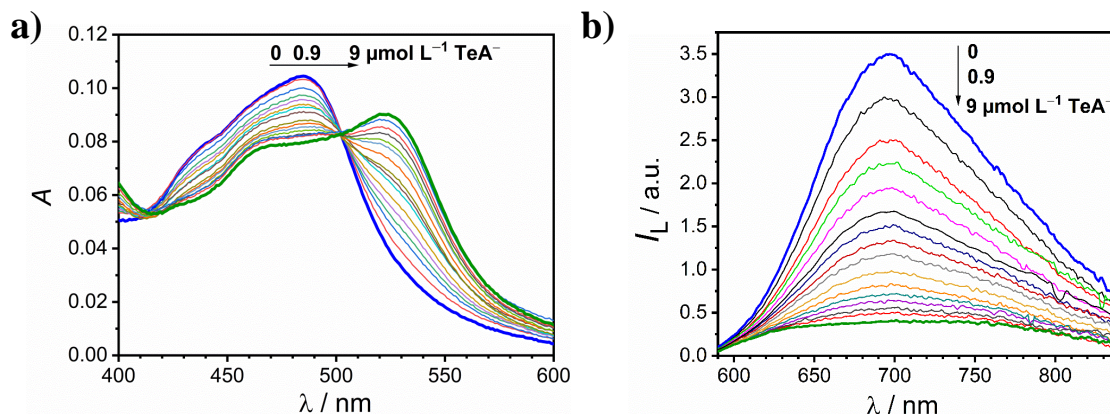


Figure 1. Changes in the UV-Vis absorption (a) and emission (b) spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) of $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($9.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) in acetonitrile upon addition of increasing amounts of the TeA^- anion (as TBA salt).

2.3 Preparation and Characterization of the Luminescent Core-Shell $\text{SiO}_2@$ Ru-MIP Nanoparticles

The procedure to prepare the MIP core-shell nanoparticles doped with the $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ luminophore is summarized in Figure 2. Monodisperse silica nanobeads of ca. 200 nm synthesized by the Stöber method [37] were used as the core material. Then, a MIP nanolayer was grown over the activated silica surface. To obtain a thin homogeneous MIP shell, growth of the latter on the spherical SiO_2 particles was performed by reversible addition-fragmentation chain-transfer (RAFT) polymerization [43]. Firstly, the silica cores were activated with 4-(chloromethyl)phenyltrichlorosilane and then functionalized by nucleophilic substitution with dithiobenzoate to yield a typical RAFT agent [44,45]. The silica-bonded alkyl dithiobenzoate (Figure 2a) promotes the controlled growth of the MIP around the silica nanobeads by sequential incorporation of monomer units until there are no free monomers left in the medium. RAFT polymerization allows the preparation of polymers with narrow molecular-weight distributions [46].

In this way, the luminescent MIP layer was grown in acetonitrile at $70 \text{ }^\circ\text{C}$ under an inert atmosphere using a mixture of the synthetic TeA^- (as TBA salt) as template, $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ as functional monomer, methacrylamide (MAM) as diluent monomer, and ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as cross-linker, in a 1:1:22:94 mole ratio (Figure 2a). This is a similar ratio to those employed for growing MIP layers onto silica nanoparticles [31,47]. 2,2'-Azobis(2,4-dimethyl)valeronitrile (ABDV) was used as the low-temperature radical initiator. Non-imprinted polymer (NIP) core-shell nanoparticles were also prepared by following the same procedure but without addition of the template. After 24 h at $70 \text{ }^\circ\text{C}$, the resulting MIP/NIP beads were thoroughly washed with a MeOH–TFA (9:1 v/v) mixture to remove the template molecule. Transmission electron microscopy (TEM) images (Figure 2) confirm the successful

growth of a homogenous 10-nm thick MIP layer onto the silica nanoparticles (8 nm in the case of the NIP material). In addition, the presence and homogeneous distribution of Ru in the SiO₂@Ru-MIP (and -NIP) nanoparticles was further confirmed by TEM elemental mapping (Figure S7).

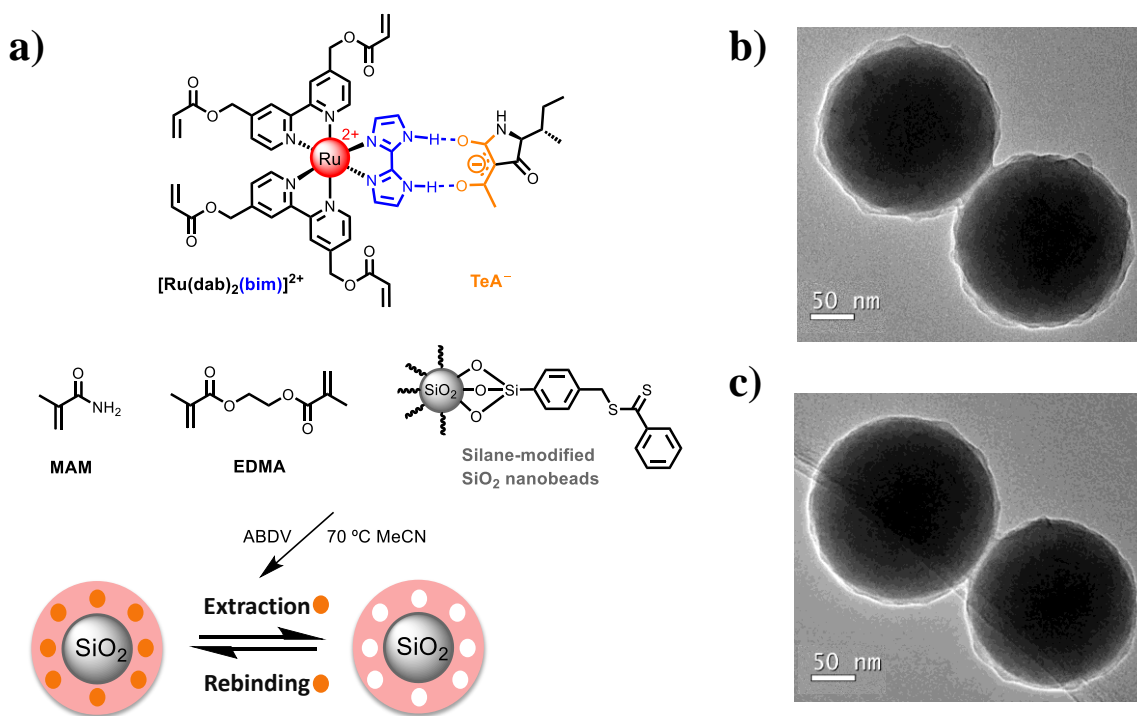


Figure 2. a) Scheme of the preparation of the luminescent SiO₂@Ru-MIP core-shell nanoparticles for TeA⁻ recognition (see text). The RAFT polymerization is initiated with ABDV (2,2'-azobis(2,4-dimethyl)valeronitrile) and heat; b) and c) are the TEM images of the obtained MIP and NIP core-shell nanoparticles, respectively. The orange circle represents the tenuazonic acid (TeA) molecules.

2.4 Spectroscopic Properties of the MIP and NIP Nanolayers and Their Response to TeA

In the first place, the luminescent SiO₂@Ru-MIP nanoparticles to recognize TeA were characterized in acetonitrile for the sake of comparison with the free [Ru(dab)₂(bim)]²⁺ probe. The emission spectrum of the nanoparticles suspended in acetonitrile (Figure 3) resembles that of the free [Ru(dab)₂(bim)]²⁺ ($\lambda_{em}^{max} = 700$ nm), displaying a broader band centered at 695 nm. In the case of the control NIP particles, very similar results are obtained, with their luminescence band peaking at 685 nm.

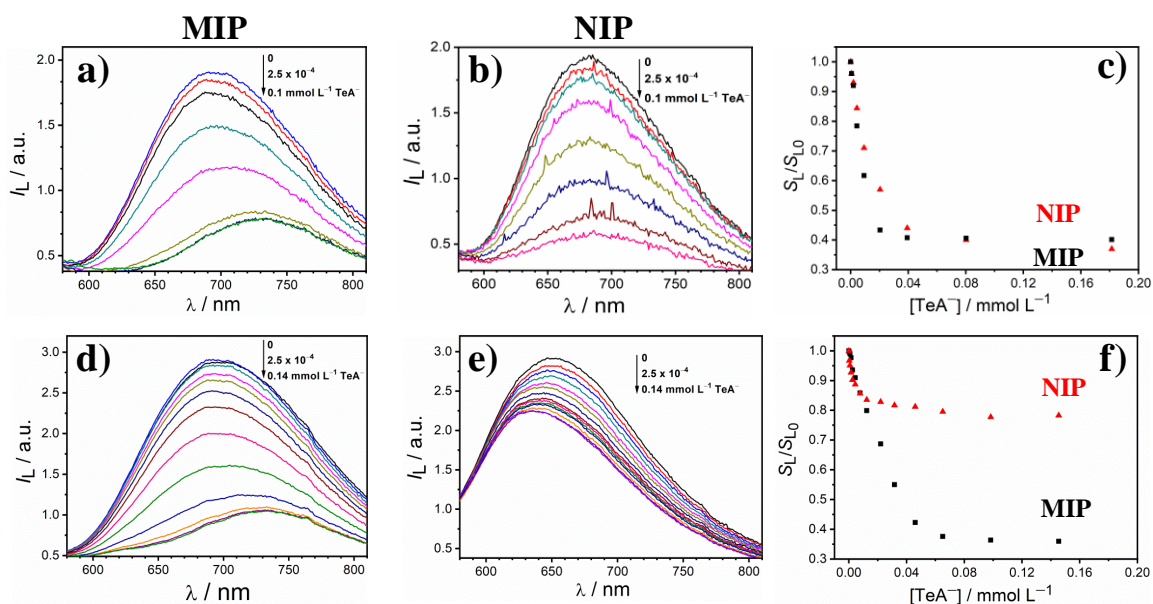


Figure 3. Changes of the luminescence spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) of 1.12 mg mL^{-1} suspensions of a) $\text{SiO}_2\text{@Ru-MIP}$ in acetonitrile (MeCN); b) $\text{SiO}_2\text{@Ru-NIP}$ in MeCN; d) $\text{SiO}_2\text{@Ru-MIP}$ in MeCN-H₂O (95:5 v/v); e) $\text{SiO}_2\text{@Ru-NIP}$ in MeCN-H₂O (95:5 v/v), upon addition of increasing amounts of TeA^- . Plots c) and f) depict the area under the emission curve, normalized to the area in the absence of TeA^- , as a function of the TeA^- concentration; black squares for $\text{SiO}_2\text{@Ru-MIP}$ and red triangles for $\text{SiO}_2\text{@Ru-NIP}$ in MeCN (c) and MeCN-H₂O (95:5 v/v) (f).

When increasing amounts of TeA^- (as TBA salt) are added, an important quenching of the luminescent MIP- and NIP-coated silica beads is observed (Figure 3). This quenching is accompanied by a 35-nm red shift of the emission of the $\text{SiO}_2\text{@Ru-MIP}$ nanoparticles, but only a 10-nm red shift for the control $\text{SiO}_2\text{@Ru-NIP}$. As it has been discussed above for the free dye in solution, these changes suggest hydrogen bonding between the Ru(II)-bim complex and the diketonate molecule also in the polymer matrix. Figure 3c shows the relative change of the luminescence as a function of the analyte concentration for the MIP and the NIP coatings. In acetonitrile, the TeA^- -imprinted sites of the MIP nanoparticles do not seem to provide any difference with respect to the unspecific NIP sites. It is important to underline that the sensor response is almost instantaneous: the observed luminescence quenching occurs within just a few seconds after adding TeA^- , showcasing the very fast diffusion of the target molecule through the MIP (or NIP) nanolayer.

Since the final application of the sensing system will probably require the use of some water, we also evaluated the response of the nanobeads to TeA^- in partially aqueous media. In this case, due to the presence of water in the solvent mixture, the use of the tetrabutylammonium tenuazonate was not necessary. The $\text{p}K_{\text{a}}$ of TeA is 3.5 [15], so that its anionic form is expected to occur in water. Preparation of water-compatible MIPs whose optical response relies on non-covalent interactions such as electrostatic attraction and hydrogen bonding is challenging. This is particularly relevant if we aim to bind a small molecule such as

TeA⁻, as water can efficiently compete with the substrate for the binding sites, potentially decreasing the sensitivity and selectivity of the MIP-based chemical sensor [48]. Furthermore, as we discussed above, the optical properties of the luminescent probe are dependent on the water content of the partially organic medium (Figure S5c-d).

Remarkably enough, addition of 5% water to the acetonitrile suspensions had no substantial effect on the luminescence maximum of the SiO₂@Ru-MIP nanobeads, remaining centered at 695 nm (Figure 3d). This fact suggests that the polymer backbone is preferentially solvated by the organic solvent. However, the addition of water induces a noticeable blue shift from 685 to 650 nm for the NIP nanoshells (Figure 3e). As it was discussed above for the free Ru(II) complex in organic solvents, the addition of water leads to significant deprotonation of its biimidazole ligand, resulting in a blue shift of the emission band as the water content increases. The dramatic effect of the presence of 5% water in acetonitrile on the Ru-NIP luminescence points out the very different nature of the TeA binding sites in the imprinted and non-imprinted materials, the latter displaying a higher exposure to the water leading to extensive deprotonation of the coordinated bim ligand.

The TeA dose-response profile of the imprinted luminescent beads is similar in neat acetonitrile and in 5% water–MeCN (Figure 3c and 3f); however, the response of the Ru-NIP is much weaker in the presence of water as a result of its loosened interaction with the TeA⁻ when the probe undergoes deprotonation. The imprinting effect enhancement was also tested with a higher water content (10%, Figure S8) but, despite the small additional decrease of the non-specific interactions with the NIP, the sensitivity of the MIP system drops significantly. Therefore, a solvent mixture with 5% water in MeCN was chosen for further assays as it provides the best compromise between sensitivity and imprinting effect.

Additionally, since Ru(II) dyes are appreciated for their advantageous long emission lifetimes, we also characterized the sensor system by time-resolved luminescence measurements (Table 1 and Figure S9). The free [Ru(dab)₂(bim)]²⁺ in aerated acetonitrile requires the sum of two exponentials to successfully fit its luminescence decay. This result suggests that the protonated (short lifetime component) and deprotonated (long lifetime component) forms of the photoexcited dye are contributing, and that there is no fast equilibration between them (otherwise just an exponential decay would be observed [49]). In the case of the Ru-MIP (or NIP) nanolayers, the microheterogeneity around the Ru(II) luminescent probe caused by the polymer scaffold leads to a more complex multi-exponential decay; in that case, a third component with a longer emission lifetime has to be added for a good multiexponential fit of the excited state decay profile for both the MIP and NIP materials.

Table 1. Luminescence lifetimes of photoexcited $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$, $\text{SiO}_2@ \text{Ru-MIP}$ and $\text{SiO}_2@ \text{Ru-NIP}$ core-shell nanoparticles at $(25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ in air-equilibrated media.^{a)}

Luminophore	Solvent (v/v)	τ_1/ns (B_1)	τ_2/ns (B_2)	τ_3/ns (B_3)	$\tau_m/\text{ns}^{\text{b)}$
$[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$	MeCN (100)	93 (19923)	248 (8827)	--	141
$[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$	MeCN + TFA	95 (26339)	259 (5689)	--	124
$[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$	MeCN–H ₂ O (95:5)	81 (5453)	253 (13943)	--	209
Ru-MIP	MeCN (100)	36 (5543)	126 (6173)	393 (754)	102
Ru-MIP	MeCN–H ₂ O (95:5)	20 (6673)	110 (2746)	650 (426)	72
Ru-NIP	MeCN (100)	55 (5893)	195 (5531)	582 (651)	147
Ru-NIP	MeCN–H ₂ O (95:5)	76 (3004)	283 (4220)	645 (768)	240

a) The luminescence decays are fitted to the equation $I_L = B_0 + \sum_i B_i \tau_i$, being i the number of required exponentials to achieve a $\chi^2 \leq 1.2$. b) Pre-exponentially weighted average luminescence lifetime: $\tau_m = \sum_i B_i \tau_i / \sum_i B_i$; estimated uncertainties of the individual lifetimes: bi-exponential fit, $\pm 2\%$; tri-exponential fit, $\pm 3\%$; of τ_m , $\pm 1.5\%$.

For the sake of comparison between the luminescence kinetics of $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ in different solvents and within the polymers, we calculated the so-called “pre-exponentially weighted” average lifetime (τ_m ; see Table 1 for its definition) of each decay profile. Similar values of τ_m were obtained for the free $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ dye and for the luminescent NIP beads in neat MeCN (141 ns and 147 ns, respectively, Table 1) pointing out to a similar solvation of the probe. A comparable situation occurs upon addition of 5% water (209 ns and 240 ns, respectively), being the increase of the excited state lifetime in agreement with the observed emission blue shift (see above) and the energy-gap rule. However, a significantly shorter τ_m occurs when the Ru(II) indicator is covalently tethered to the MIP (141 ns in neat MeCN *vs.* 102 ns for the MIP in the same solvent). A further lowering is observed when 5% water is added to the organic solvent (209 ns *vs.* 72 ns). These results are a consequence of the notably less polar microenvironment around the Ru(II) luminophore when intimately attached to the MIP backbone within its analyte-templated cavities. The decrease of the luminescence lifetime of Ru polypyridyls in going from highly polar organic solvents and water to non-polar media has been documented [50,51]. Interestingly, the probe emission lifetime shows again that the NIP does not provide the same degree of protection from solvation by water molecules than the MIP (Table 1), pointing out major differences between the structure of the MIP and NIP binding sites.

Regarding the luminescence lifetimes, the most remarkable aspect of the sensor material we have prepared is probably the fact that TeA induces changes in τ_m that can be correlated with its concentration (Figure 4a-b). To the best of our knowledge, the use of emission lifetime variations to monitor the levels of a target analyte has never been reported for a MIP-based luminescent sensor. Actually, accounts of a fluorescent MIP for cAMP recognition describing emission decays [52,53] did not measure any analyte-related lifetime change. Luminescence lifetime measurements are independent of common disturbances such as light source intensity

fluctuations, dye leaching or photobleaching, detector ageing, and interference of the light scattering from the indicator layer. Therefore, lifetime-based sensing is a much more robust analytical method than those relying on luminescence intensity changes, except when ratiometric measurements are used [32].

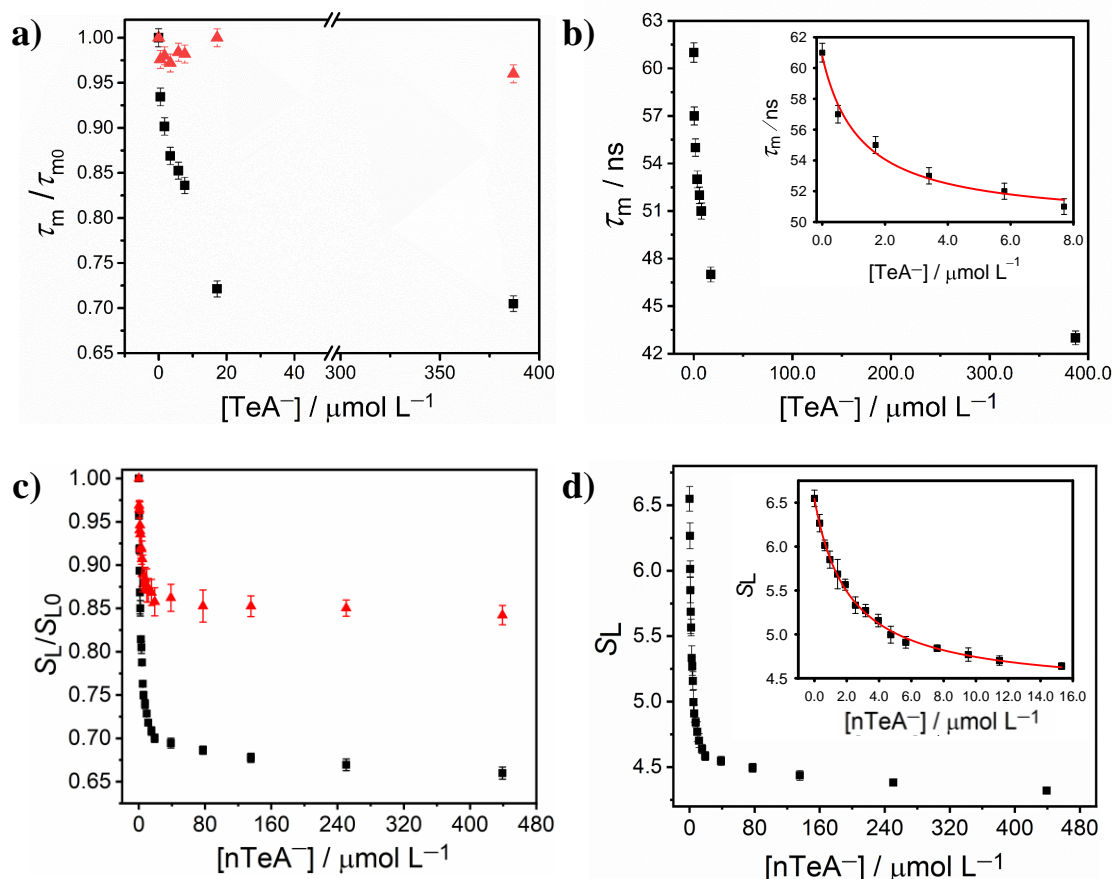


Figure 4. a) Luminescence lifetimes of $\text{SiO}_2\text{@Ru-MIP}$ (black squares) and $\text{SiO}_2\text{@Ru-NIP}$ (red triangles) ($\lambda_{\text{exc}} = 463 \text{ nm}$) upon addition of TeA^- in $\text{MeCN-H}_2\text{O}$ (95:5 v/v) (1.12 mg mL^{-1} of nanoparticles in both cases); the numerical values are collected in Tables S1 and S2. b) TeA^- dose-response plot ($n = 3$) of the luminescent $\text{SiO}_2\text{@Ru-MIP}$ particles. The red curve in the zoom inset is the best fit in this concentration range to a three-parameter rational function $f(x) = \frac{(a+bx)}{(1+cx)}$, being the best fit ($r^2 = 0.993$) defined by the following parameters: $a = (60.8 \pm 0.6)$, $b = (4 \pm 1) \times 10^4 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1}$ and $c = (8 \pm 2) \times 10^2 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1}$. c) Changes of the luminescence intensity ($\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$; S_L is the area under the emission band) upon addition of natural TeA (nTeA) to a suspension of $\text{SiO}_2\text{@Ru-MIP}$ (black squares) or $\text{SiO}_2\text{@Ru-NIP}$ (red triangles) nanoparticles in $\text{MeCN-H}_2\text{O}$ (95:5 v/v) (1.12 mg mL^{-1} of nanoparticles in both cases). d) nTeA dose-response plot ($n = 3$) of the luminescent $\text{SiO}_2\text{@Ru-MIP}$ particles. The red curve in the zoom inset is the best fit in this concentration range to a three-parameter rational function $f(x) = \frac{(a+bx)}{(1+cx)}$, being the best fit ($r^2 = 0.998$) defined by the following parameters: $a = (6.54 \pm 0.02)$, $b = (2.0 \pm 0.1) \text{ L } \mu\text{mol}^{-1}$ and $c = (0.46 \pm 0.03) \text{ L } \mu\text{mol}^{-1}$.

Figure 4a shows the τ_m values of the Ru-MIP and Ru-NIP nanoparticles upon addition of TeA^- in $\text{MeCN-H}_2\text{O}$ (95:5 v/v). These measurements differentiate between specific and non-specific polymer-analyte interactions more clearly than the emission intensity values (Figure 3f).

The presence of TeA⁻ does not induce any significant change of the τ_m of the SiO₂@Ru-NIP beads (245 ± 5 ns), while a 30% decrease of the average emission lifetime (from 61 ns to 43 ns) is observed for the MIP. Figure 4b depicts the TeA⁻ dose-response plot in the $0.50 - 400 \mu\text{mol L}^{-1}$ range for the SiO₂@Ru-MIP nanobeads, demonstrating the wider concentration range of the luminescence lifetime-based analytical measurements (compare to those in Figure 3f). The dose-response curve in the low concentration range was fitted to a 3-parameter rational function [54], and a 382 nmol L^{-1} limit of detection (LOD) was calculated thereof as three times the standard deviation of the blank measurements [55].

2.5 Analytical Performance of the SiO₂@Ru-MIP Luminescent Sensing Nanomaterial

Due to the high cost of the mycotoxin, up to this stage we carried out all titration experiments with the home-made TeA that contains ca. 80% of the natural toxin (see Experimental Section). However, to demonstrate the performance of the novel MIP-based TeA-sensitive nanomaterial, we also carried out measurements with the natural toxin. It is worth mentioning that TeA is most often sold as the Cu(II) bis-chelate complex due to the isolation procedure and its intrinsic instability in free form. Obviously, the copper complex cannot be used for our sensing purposes. Therefore, we have isolated natural TeA from the commercial (TeA)₂Cu complex after dissolution in methylene chloride and subsequent elution through a strong cation exchange column [9].

To perform the sensor calibration, the luminescent SiO₂@Ru-MIP nanobeads were suspended in MeCN–H₂O (95:5 v/v) and exposed to increasing concentrations of natural TeA in the 0 to 0.44 mmol L^{-1} range (Figure 4c-d). The sample luminescence was recorded immediately after mixing and shaking the cell for a few seconds (longer contact times did not change the results). The same experiments were carried out with the control Ru-NIP beads. The area under the luminescence spectrum against the TeA concentration (Figure 4d) was fitted to a 3-parameter rational function in the low concentration range [54], and a 324 nmol L^{-1} LOD was calculated thereof as three times the standard deviation of the blank measurements [55]. The reproducibility of the sensor response was evaluated by measuring three calibration curves for each one of the different batches of the SiO₂@Ru-MIP beads (Figure S10). No significant differences were observed between the dose-response plots, demonstrating the robustness of the photonic sensing material.

The potential cross-reactivity of the sensing system was evaluated in the presence of other mycotoxins that may also be present in food commodities as a consequence of fungi contamination. In this regard, cyclopiazonic acid (CPA), alternariol (AOH) and β -zeranol (β -ZOL), all of which contain a β -hydroxyenone moiety like that of TeA (Figure 5a), were tested

as potential interferents. The selectivity of the TeA-targeted Ru-MIP is demonstrated from the weaker response to those other mycotoxins (Figure 5b and S11): while natural TeA provoked up to a 35% quenching of the MIP emission, the tested related mycotoxins only caused less than a 10% signal change. The remarkably poor response towards CPA, the molecule with the closest characteristic structure (tetramic acid) to that of TeA, suggests the important contribution of the size selectivity in the target recognition process by the MIP. The same assay performed with the non-imprinted core-shell nanoparticles (Figure 5c) shows the residual non-specific interactions in the MeCN–H₂O (95:5 v/v) solvent mixture.

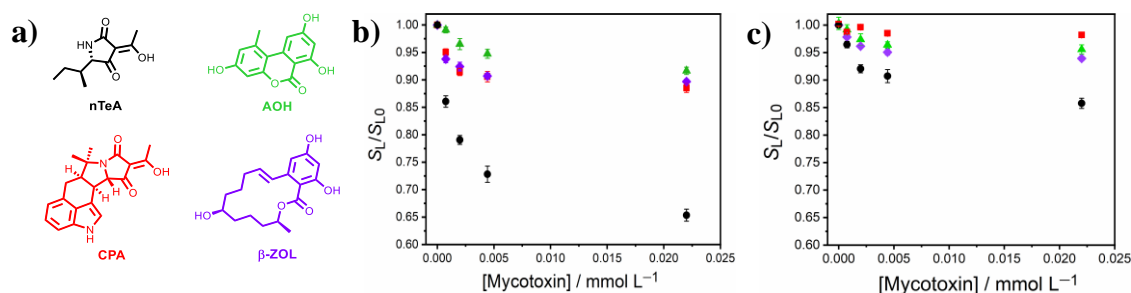


Figure 5. a) Chemical structure of the mycotoxins tested for cross-sensitivity (tenuazonic acid, cyclopiazonic acid, alternariol and β-zeranol) and variations of the area under the luminescence spectrum of SiO₂@Ru-MIP (b) and SiO₂@Ru-NIP (c) (1.12 mg mL⁻¹) suspended in MeCN–H₂O (95:5 v/v), in the presence of increasing amounts of each mycotoxin (nTeA, black circles; CPA, red squares; AOH, green triangles; β-ZOL, purple spades) ($n = 3$).

The difference between the maximum quenching of the Ru-MIP luminescence attained with the natural TeA (35%, Figure 5b) and the 65% quenching (Figure 3f) reached with the synthetic TeA demonstrates the exquisite recognition of the TeA molecule by the novel MIP material. Since the synthetic TeA that has been used as template for the Ru-MIP synthesis is an 81:19 mixture of the natural TeA and its diastereomeric 5*R* epimer (see Materials and Methods section), part of the recognition sites where the Ru indicator dwells remain empty in the presence of the natural TeA leading to lesser quenching of the luminescent material.

A number of optical sensors for TeA detection have been reported (Table S3). However, only one MIP has been described for this purpose. Even without a thorough analytical optimization (not the aim of this study), our TeA-sensitive material improves by an order of magnitude the detectability of that MIP-based luminescent sensor. Other reported sensors are based on immunoassays. In spite of their low LODs, immunosensors require the use of expensive fragile antibodies, diminishing their attractiveness.

4. Conclusions

Thanks to a novel MIP made of a trifunctional acrylate monomer that contains a luminescent Ru(II) complex with a biimidazole ligand in its coordination sphere, tenuazonic acid can be sensed with extraordinary selectivity and speed. Even in partially aqueous medium, the biimidazole moiety forms probably a double hydrogen-bonded adduct with the β -diketonate anionic form of the ionized TeA. Such interaction provides selectivity on top of that imparted by the molecular imprinting effect of the polymer material. Thanks to this feature, closely related toxins such as cyclopiazonic acid are barely recognized. A very fast response to the presence of TeA, achieved by the growth of the luminescent MIP nanoshell onto a 200-nm silica core, would allow real-time sensing of the mycotoxin. The novel optical sensor system can detect down to 63.8 and 75.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ of TeA by steady-state and time-resolved luminescence measurements, respectively, for utmost versatility and robustness of the measurements. We expect our first-of-type work will provide the basis for further MIP-based sensors that capitalize on luminescence lifetime rather than absolute emission determinations to free them from instrumental factors that affect the latter. Further work is in progress to exploit the powerful analytical applications of the novel nanomaterials.

Acknowledgment

This work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (grants CTQ2015-69278-C2-2-R and RTI2018-096410-B-C22/21). J. Q.-A. thanks the Ministry for an F.P.I. doctoral grant.

References

- [1] A. Kumari, N. N. Tirkey (Eds.), *Recent Trends in Human and Animal Mycology*, Springer Nature, Singapore, 2019.
- [2] S. Goyal, K. G. Ramawat, J. M. Mérillon (Eds.), *Fungal Metabolites*, Springer, Switzerland, 2017.
- [3] E. Pfeiffer, N. H. Schebb, J. Podlech, M. Metzler, Novel oxidative in vitro metabolites of the mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether, *Mol. Nutr. Food Res.* 51 (2007) 307–316.
- [4] S. Hickert, I. Krug, B. Cramer, H. U. Humpf, Detection and Quantitative Analysis of the Non-cytotoxic allo-Tenuazonic Acid in Tomato Products by Stable Isotope Dilution HPLC-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 10879–10884.
- [5] H. B. Lee, A. Patriarca, N. Magan, *Alternaria in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology*, *Mycobiology* 43 (2015) 93–106.
- [6] C. Mujahid, M. C. Savoy, Q. Baslé, P. M. Woo, E. C. Y. Ee, P. Mottier, T. Bessaire, Levels of *Alternaria* Toxins in Selected Food Commodities Including Green Coffee, *Toxins* 12 (2020) 1–17.
- [7] D. Arcella, M. Eskola, J. A. Gómez Ruiz, Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population, *EFSA J.* 14 (2016) 4654–4686.
- [8] Y. Man, G. Liang, A. Li, L. Pan, Analytical Methods for the Determination of *Alternaria* Mycotoxins, *Chromatographia* 80 (2017) 9–22.
- [9] D. Siegel, T. Rasenko, M. Koch, I. Nehls, Determination of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in cereals by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap multistage mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4582–4588.
- [10] T. Zwickel, H. Klaffke, K. Richards, M. Rychlik, Development of a high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry based analysis for the simultaneous quantification of various *Alternaria* toxins in wine, vegetable juices and fruit juices, *J. Chromatogr. A* 1455 (2016) 74–85.
- [11] A. K. Rausch, R. Brockmeyer, T. Schwerdtle, Development and Validation of a QuEChERS-Based Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Multi-Method for the Determination of 38 Native and Modified Mycotoxins in Cereals, *J. Agric. Food Chem.* 68

(2020) 4657–4669.

[12] N. Prodi, L.; Montalti, M.; Zaccheroni (Eds.), *Luminescence Applied in Sensor Science*, Springer, Germany, 2011.

[13] B. Pedras (Eds.), *Fluorescence in Industry*, Springer Nature, Switzerland, 2019.

[14] G. Orellana, D. García-Fresnadillo, in: R. Narayanaswamy and O. S. Wolfbeis (Eds.), *Optical Sensors: Industrial, Environmental and Diagnostic Applications*, Springer, Germany, 2004, pp. 309.

[15] H. Mikula, E. Horkel, P. Hans, C. Hametner, J. Fröhlich, Structure and tautomerism of tenuazonic acid - A synergetic computational and spectroscopic approach, *J. Hazard. Mater.* 250–251 (2013) 308–317.

[16] L. Chen, S. N. Berry, X. Wu, E. N. W. Howe, P. A. Gale, *Advances in Anion Receptor Chemistry*, *Chem* 6 (2020) 61–141.

[17] S. A. Rommel, D. Sorsche, M. Fleischmann, S. Rau, Optical Sensing of Anions via Supramolecular Recognition with Biimidazole Complexes, *Chem. - A Eur. J.* 23 (2017) 18101–18119.

[18] Á. R. Romero Bernal, C. M. Reynoso, V. A. García Londoño, L. E. Broggi, S. L. Resnik, Alternaria toxins in Argentinean wheat, bran, and flour, *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* 12 (2019) 24–30.

[19] J. Zdunek, E. Benito-Peña, A. Linares, A. Falcimaigne-Cordin, G. Orellana, K. Haupt, M. C. Moreno-Bondi, Surface-Imprinted Nanofilaments for Europium-Amplified Luminescent Detection of Fluoroquinolone Antibiotics, *Chem. - A Eur. J.* 19 (2013) 10209–10216.

[20] C. Santezi, B. D. Reina, L. N. Dovigo, Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections—A review, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 21 (2018) 409–415.

[21] G. Ertürk, B. Mattiasson, Molecular Imprinting Techniques Used for the Preparation of Biosensors, *Sensors* 17 (2017) 288–305.

[22] J. J. Belbruno, *Molecularly Imprinted Polymers*, *Chem. Rev.* 119 (2019) 94–119.

[23] L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, J. Li, Molecular imprinting: perspectives and applications, *Chem. Soc. Rev.* 45 (2016) 2137–2211.

[24] R. Gui, H. Jin, Recent advances in synthetic methods and applications of photoluminescent molecularly imprinted polymers, *J. Photochem. Photobiol. C* 41 (2019) 100315–

100353.

- [25] N. Y. Limaee, S. Rouhani, M. E. Olya, F. Najafi, Selective 2,4-dichlorophenoxyacetic acid optosensor employing a polyethersulfone nanofiber-coated fluorescent molecularly imprinted polymer, *Polymer* 177 (2019) 73–83.
- [26] T. Kajisa, T. Sakata, Molecularly Imprinted Artificial Biointerface for an Enzyme-Free Glucose Transistor, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10 (2018) 34983–34990.
- [27] A. Rico-Yuste, J. Walravens, J. L. Urraca, R. A. G. Abou-Hany, A. B. Descalzo, G. Orellana, M. Rychlik, S. De Saeger, M. C. Moreno-Bondi, Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether in foodstuffs by molecularly imprinted solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 243 (2018) 357–364.
- [28] A. B. Descalzo, C. Somoza, M. C. Moreno-Bondi, G. Orellana, Luminescent core-shell imprinted nanoparticles engineered for targeted Förster resonance energy transfer-based sensing, *Anal. Chem.* 85 (2013) 5316–5320.
- [29] H. Zhang, Molecularly Imprinted Nanoparticles for Biomedical Applications, *Adv. Mater.* 32 (2020) 1806328–1806351.
- [30] D. Refaat, M. G. Aggour, A. A. Farghali, R. Mahajan, J. G. Wiklander, I. A. Nicholls, S. A. Piletsky, Strategies for Molecular Imprinting and the Evolution of MIP Nanoparticles as Plastic Antibodies—Synthesis and Applications, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 6304–6325.
- [31] S. Wagner, J. Bell, M. Biyikal, K. Gawlitza, K. Rurack, Integrating fluorescent molecularly imprinted polymer (MIP) sensor particles with a modular microfluidic platform for nanomolar small-molecule detection directly in aqueous samples, *Biosens. Bioelectron.* 99 (2018) 244–250.
- [32] I. Urriza-Arsuaga, G. Ielasi, M. Bedoya, G. Orellana, in: B. Pedras (Eds.), *Fluorescence in Industry*, Springer Nature, Switzerland, 2019, pp. 1.
- [33] J. C. Xiao, J. M. Shreeve, Synthesis of 2,2-Biimidazolium-Based Ionic Liquids: Use as a New Reaction Medium and Ligand for Palladium-Catalyzed Suzuki Cross-Coupling Reactions, *J. Org. Chem.* 70 (2005) 3072–3078.
- [34] E. Puodziukynaite, J. L. Oberst, A. L. Dyer, J. R. Reynolds, Establishing Dual Electrogenerated Chemiluminescence and Multicolor Electrochromism in Functional Ionic Transition-Metal Complexes, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 968–978.

- [35] E. C. Johnson, B. P. Sullivan, D. J. Salmon, S. A. Adeyemi, T. J. Meyer, Synthesis and Properties of the Chloro-Bridged Dimer [(bpy)₂ RuCl]₂²⁺ and Its Transient 3+ Mixed-Valence Ion, *Inorg. Chem.* 17 (1978) 2211–2215.
- [36] A. Rico-Yuste, R. Abouhany, J. L. Urraca, A. B. Descalzo, G. Orellana, M. C. Moreno-Bondi, Eu(III)-Templated molecularly imprinted polymer used as a luminescent sensor for the determination of tenuazonic acid mycotoxin in food samples, *Sensors Actuators, B Chem.* 329 (2021) 129256–129268.
- [37] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range, *J. Colloid Interface Sci.* 26 (1968) 62–69.
- [38] H. J. Mo, Y. L. Niu, M. Zhang, Z. P. Qiao, B. H. Ye, Photophysical, electrochemical and anion sensing properties of Ru(II) bipyridine complexes with 2,2'-biimidazole-like ligand, *Dalt. Trans.* 40 (2011) 8218–8225.
- [39] H. J. Mo, H. Y. Chao, B. H. Ye, A ruthenium biimidazole-like anion receptor with two chelating N-H···O intramolecular hydrogen bonds, *Inorg. Chem. Commun.* 35 (2013) 100–103.
- [40] Y. Cui, H. J. Mo, J. C. Chen, Y. L. Niu, Y. R. Zhong, K. C. Zheng, B. H. Ye, Anion-Selective Interaction and Colorimeter by an Optical Metalloreceptor Based on Ruthenium(II) 2,2-Biimidazole: Hydrogen Bonding and Proton Transfer, *Inorg. Chem.* 46 (2007), 6427–6436.
- [41] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs, *Talanta* 43 (1996) 1739–1753.
- [42] G. Ielasi, G. Alcover, J. Casellas, C. de Graaf, G. Orellana, M. Reguero, Computer-aided design of short-lived phosphorescent Ru(II) polarity probes, *Dye. Pigment.* 162 (2019) 168–176.
- [43] S. Carrasco, E. Benito-Peña, F. Navarro-Villoslada, J. Langer, M. N. Sanz-Ortiz, J. Reguera, L. M. Liz-Marzán, M. C. Moreno-Bondi, Multibranched Gold-Mesoporous Silica Nanoparticles Coated with a Molecularly Imprinted Polymer for Label-Free Antibiotic Surface-Enhanced Raman Scattering Analysis, *Chem. Mater.* 28 (2016) 7947–7954.
- [44] G. Moad, A Critical Survey of Dithiocarbamate Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Agents in Radical Polymerization, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 57 (2019) 216–227.
- [45] S. Beyazit, B. Tse Sum Bui, K. Haupt, C. Gonzato, Molecularly imprinted polymer nanomaterials and nanocomposites by controlled/living radical polymerization, *Prog. Polym.*

Sci. 62 (2016) 1–21.

[46] G. Moad, RAFT polymerization to form stimuli-responsive polymers, *Polym. Chem.* 8 (2017) 177–219.

[47] S. Wagner, C. Zapata, W. Wan, K. Gawlitza, M. Weber, K. Rurack, On the Role of Counterions in Molecularly Imprinted Polymers for Anionic Species, *Langmuir* 34 (2018) 6963–6975.

[48] W. Wan, A. B. Descalzo, S. Shinde, H. Weißhoff, G. Orellana, B. Sellergren, K. Rurack, Ratiometric Fluorescence Detection of Phosphorylated Amino Acids Through Excited-State Proton Transfer by Using Molecularly Imprinted Polymer (MIP) Recognition Nanolayers, *Chem. - A Eur. J.* 23 (2017) 15974–15983.

[49] L. Tormo, N. Bustamante, G. Colmenarejo, G. Orellana, Can luminescent Ru(II) Polypyridyl dyes measure pH directly? *Anal. Chem.* 82 (2010) 5195–5204.

[50] Y. Sun, C. Turro, Highly Solvent Dependent Luminescence from $[\text{Ru}(\text{bpy})_n(\text{dppp})_{3-n}]^{2+}$ ($n = 0-2$), *Inorg. Chem.* 49 (2010) 5025–5032.

[51] A. M. Castro, J. Delgado, G. Orellana, Hydrocarbon in water sensing with PTFE membranes doped with a luminescent Ru(II) poly(pyridyl) complex, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 2952–2958.

[52] B. Wandelt, A. Mielniczak, P. Turkewitsch, S. Wysocki, Steady-state and time-resolved fluorescence studies of fluorescent imprinted polymers, *J. Lumin.* 102–103 (2003) 774–781.

[53] B. Wandelt, P. Turkewitsch, S. Wysocki, G. D. Darling, Fluorescent molecularly imprinted polymer studied by time-resolved fluorescence spectroscopy, *Polymer* 43 (2002) 2777–2785.

[54] P. L. Urban, Please Avoid Plotting Analytical Response against Logarithm of Concentration, *Anal. Chem.* 92 (2020) 10210–10212.

[55] E. Massarini, P. Wästerby, L. Landström, C. Lejon, O. Beck, P. O. Andersson, Methodologies for assessment of limit of detection and limit of identification using surface-enhanced Raman spectroscopy, *Sensors Actuators, B Chem.* 207 (2015) 437–446.

Supporting Information

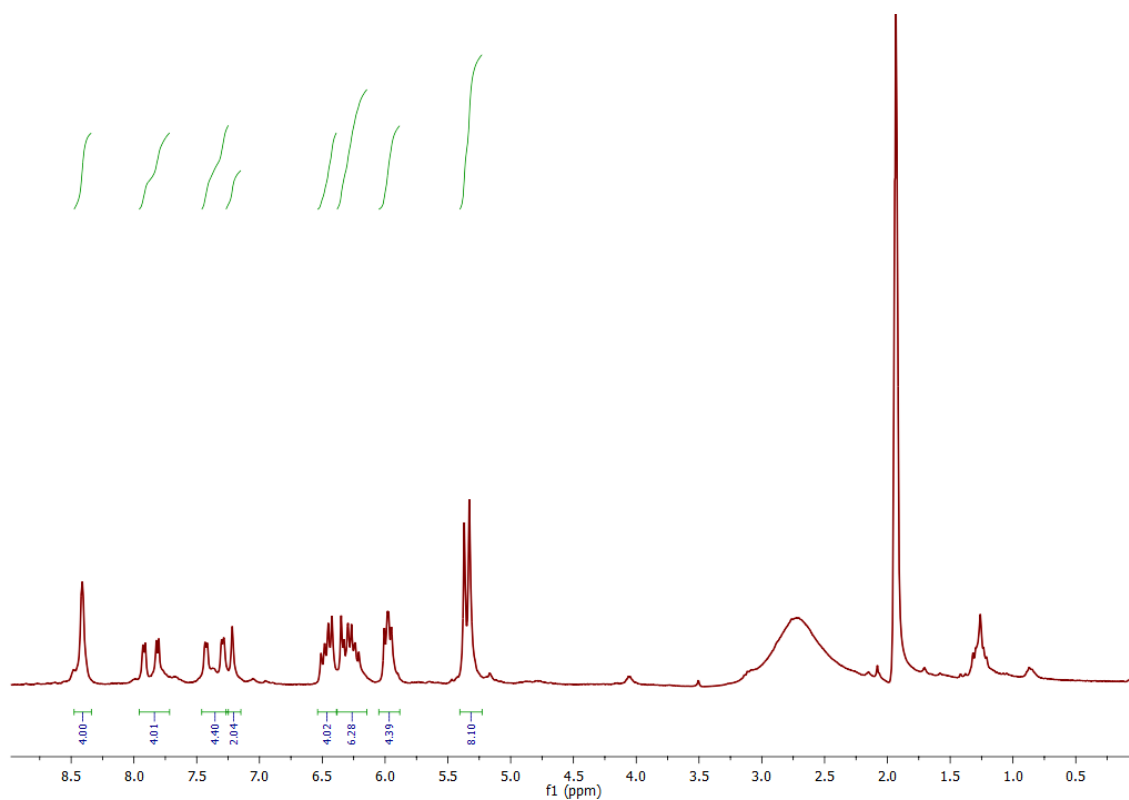


Figure S1. ^1H NMR spectrum of $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})](\text{PF}_6)_2$ in CD_3CN (300 MHz).

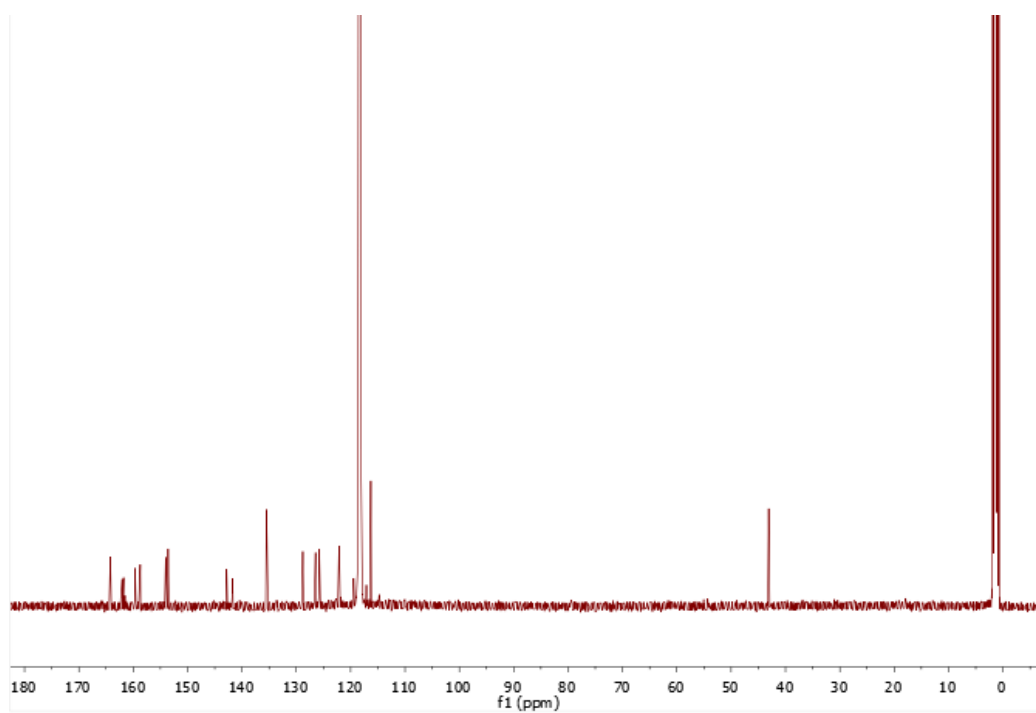


Figure S2. ^{13}C NMR spectrum of $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})](\text{PF}_6)_2$ in CD_3CN (500 MHz).

Acquisition Parameter					
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Enhanced	Scan Begin	150 m/z	Scan End	1500 m/z
Capillary Exit	6.0 Volt	Skimmer	40.0 Volt	Trap Drive	75.0
Accumulation Time	5239 μ s	Averages	7 Spectra	Auto MS/MS	off

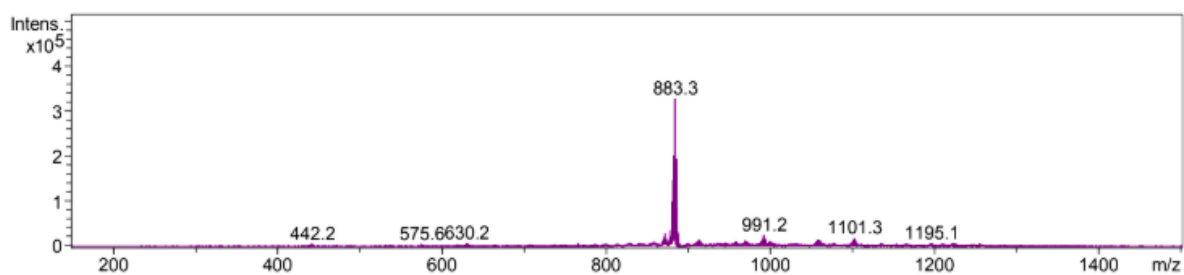


Figure S3. Mass spectrum of $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})](\text{PF}_6)_2$ recorded in MeOH by electrospray ionization in positive detection mode; $[\text{M}]^+$ calculated for $[\text{C}_{42}\text{H}_{37}\text{N}_8\text{O}_8\text{Ru}]^+$, 883.2; found, 883.3.

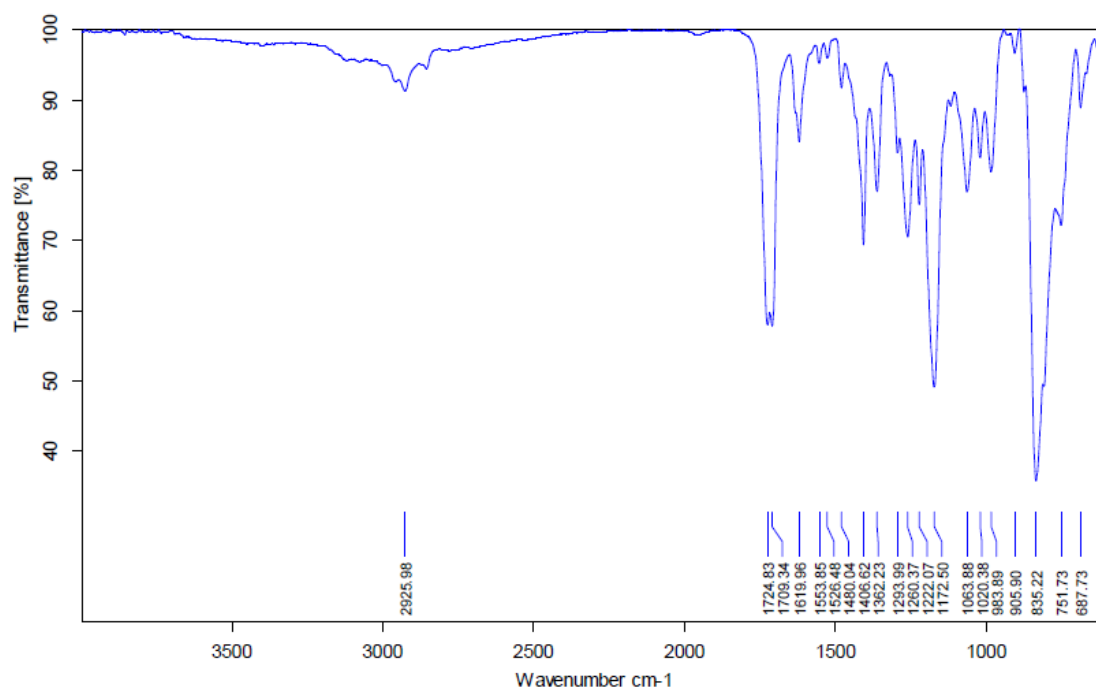


Figure S4. FTIR spectrum of $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})](\text{PF}_6)_2$.

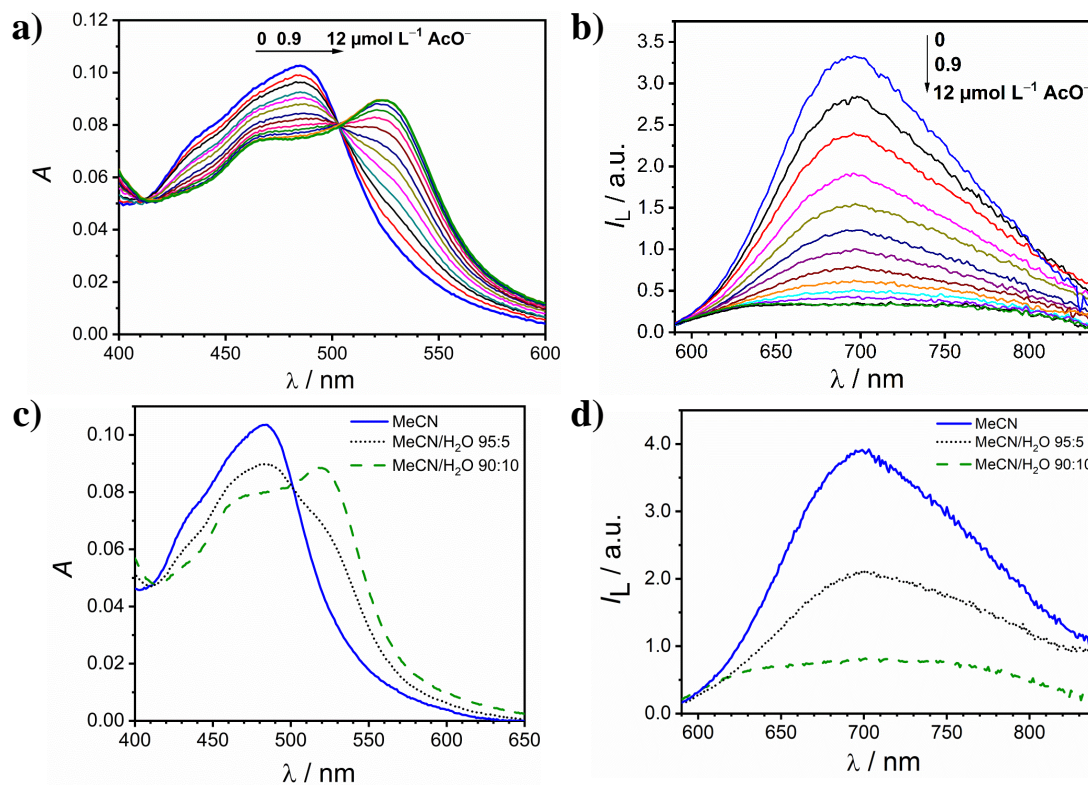


Figure S5. Absorption (a) and emission (b) spectra of $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) in acetonitrile (blue solid line) and in acetonitrile– H_2O mixtures (95:5 v/v, black dotted line; 90:10 v/v, green dashed line). Changes in the UV-Vis absorption spectrum (c) and in the emission spectrum (d) ($\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) of $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($9 \mu\text{mol L}^{-1}$) in acetonitrile solution upon the addition of increasing amounts of the AcO^- anion (as tetrabutylammonium salt).

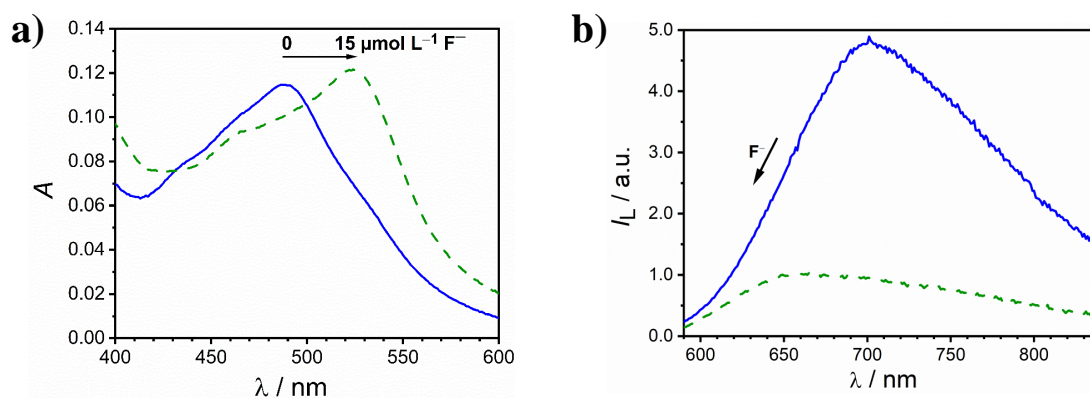


Figure S6. Absorption spectrum (a) and emission spectrum (b) ($\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) of $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) in dimethyl sulfoxide solution (blue solid line), and after incorporation of $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $105 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, of F^- (as tetrabutylammonium salt, green dashed line).

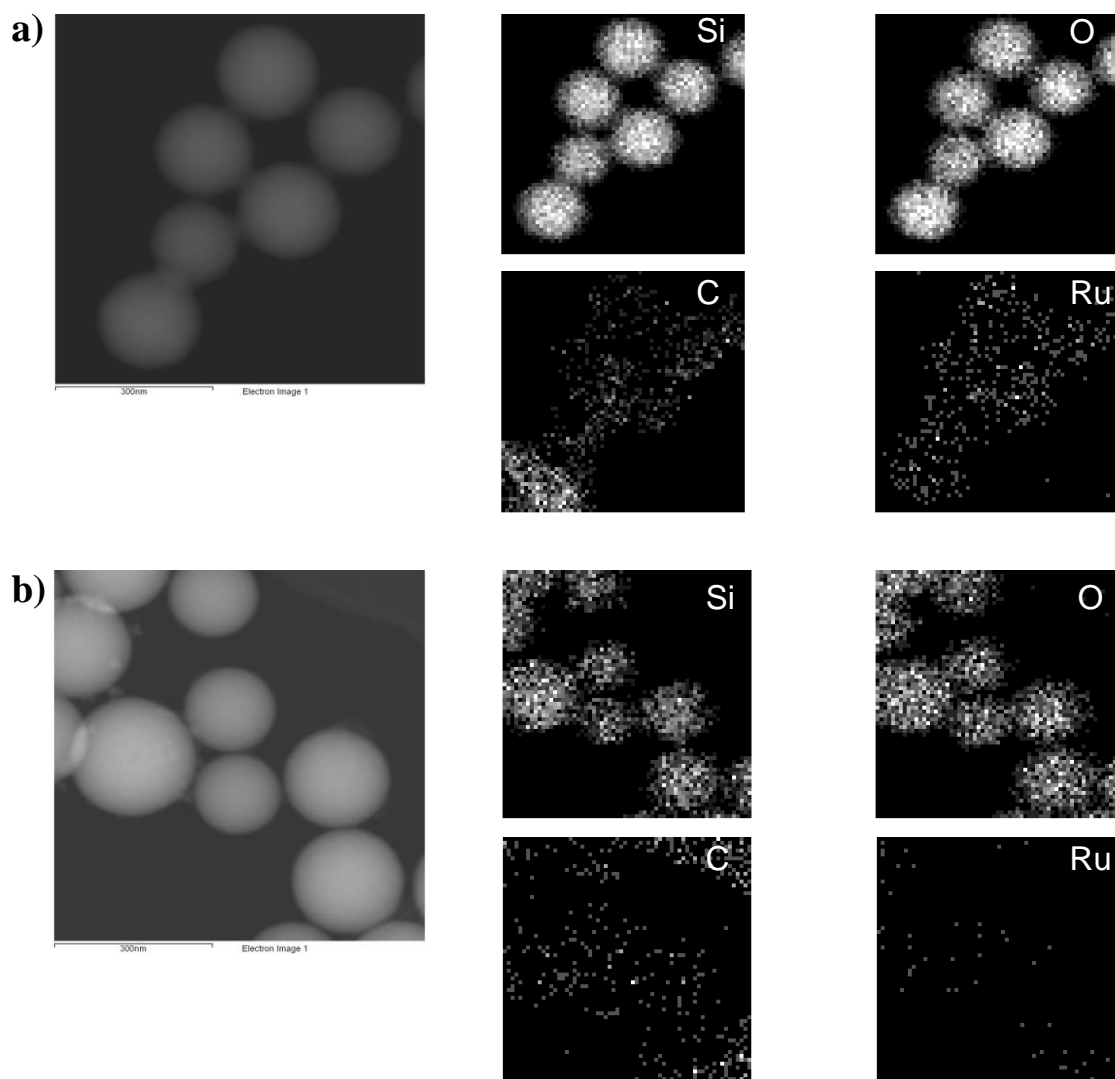


Figure S7. TEM elemental mapping of a) SiO₂@Ru-MIP; b) SiO₂@Ru-NIP.

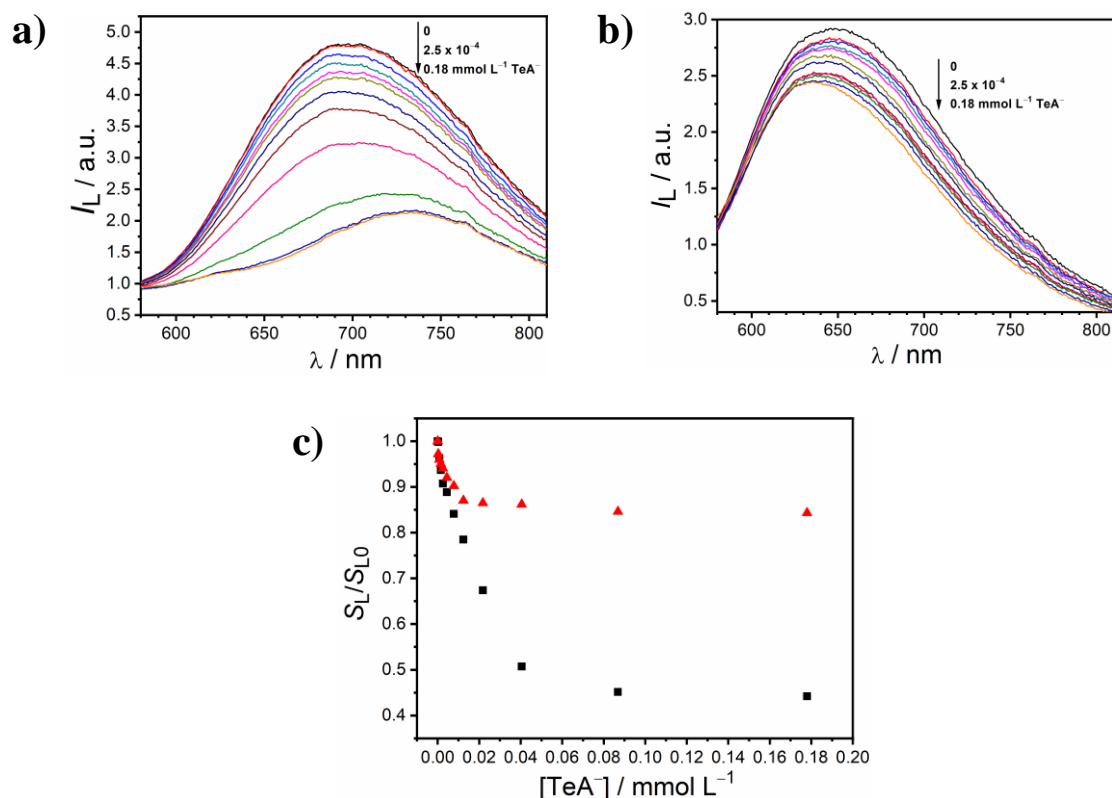


Figure S8. Changes in the luminescence spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) for 1.12 mg mL^{-1} suspensions in MeCN–H₂O (90:10 v/v) of a) SiO₂@Ru-MIP; b) SiO₂@Ru-NIP; upon addition of increasing amounts of TeA⁻. c) Area under the emission band (normalized to the value in the absence of TeA⁻) as a function of the TeA⁻ concentration; black squares depict SiO₂@Ru-MIP and red triangles depict SiO₂@Ru-NIP measurements in MeCN–H₂O (90:10 v/v).

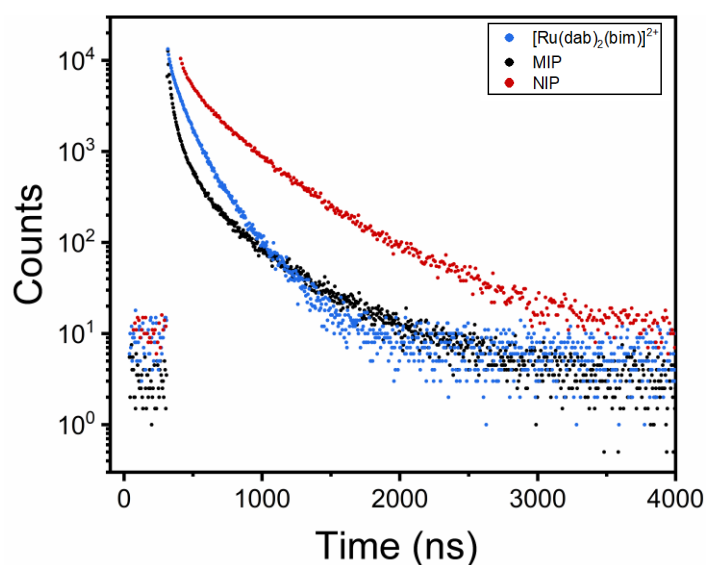


Figure S9. Luminescence decay of the photoexcited [Ru(dab)₂(bim)]²⁺ indicator dye (blue dots), the photoexcited SiO₂@Ru-MIP (black dots), and the photoexcited SiO₂@Ru-NIP (red dots) in air-equilibrated MeCN–H₂O (95:5 v/v) ($\lambda_{\text{exc}} = 463 \text{ nm}$).

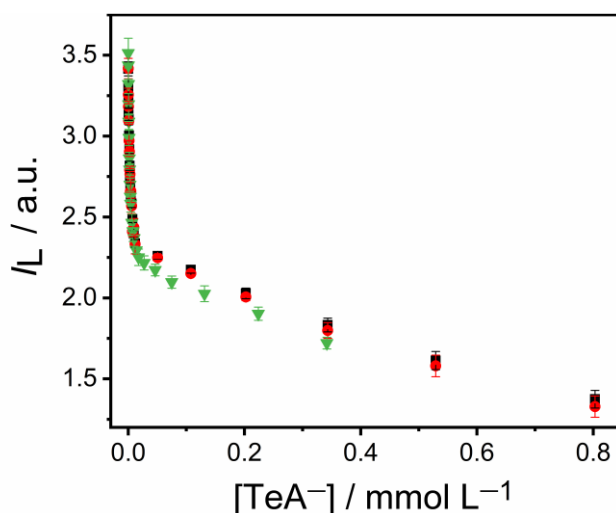


Figure S10. Reproducibility of the SiO₂@Ru-MIP luminescence in MeCN–H₂O (95:5 v/v) in the presence of various amounts of TeA. Dose-response curves measured (3 replicates each one) for three different nanoparticle batches ($\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 695 \text{ nm}$).

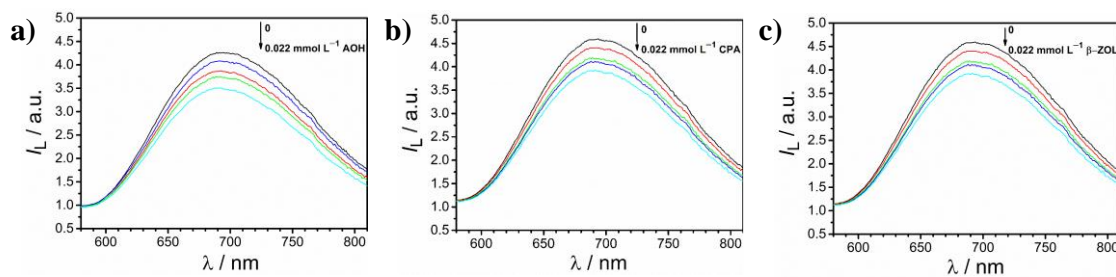


Figure S11. Changes in the luminescence spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) for 1.12 mg mL^{-1} suspensions in MeCN–H₂O (95:5 v/v) of SiO₂@Ru-MIP upon addition of increasing amounts of AOH (a), CPA (b) or β -ZOL (c).

Table S1. Luminescence lifetimes of the SiO₂@Ru-MIP nanoparticles at (25 ± 1) °C in air-equilibrated MeCN–H₂O (95:5 v/v) in the presence of various amounts of TeA.^{a)}

[TeA] (μmol L ⁻¹)	τ ₁ /ns (B ₁)	τ ₂ /ns (B ₂)	τ ₃ /ns (B ₃)	τ ₄ /ns (B ₄)	τ _m /ns ^{b)}
0	16 (2774)	50 (5061)	107 (2526)	416 (185)	61
0.5	16 (3510)	46 (5950)	107 (2400)	398 (240)	57
1.7	15 (2799)	53 (3978)	147 (845)	400 (120)	55
3.4	9 (997)	33 (3126)	89 (1801)	349 (159)	53
5.8	12 (2031)	41 (3413)	93 (1564)	370 (183)	52
7.7	14 (2341)	44 (3557)	112 (992)	428 (134)	51
17.2	7 (5000)	38 (7853)	97 (3608)	401 (248)	47
387.0	6 (1036)	27 (2942)	81 (1015)	384 (17)	43

a) To determine the luminescence lifetimes, the decays are fitted to the function $I_L = B_0 + \sum_i B_i \tau_i$, being i the number of exponentials required to achieve a $\chi^2 \leq 1.2$. b) Pre-exponentially weighted average luminescence lifetime: $\tau_m = \sum_i B_i \tau_i / \sum_i B_i$; estimated uncertainties of the lifetimes: $\tau_i, \pm 3\%$; $\tau_m, \pm 1.5\%$.

Table S2. Luminescence lifetimes of the SiO₂@Ru-NIP nanoparticles at (25 ± 1) °C in air-equilibrated MeCN–H₂O (95:5 v/v) in the presence of various amounts of TeA.^{a)}

[TeA] (μmol L ⁻¹)	τ ₁ /ns (B ₁)	τ ₂ /ns (B ₂)	τ ₃ /ns (B ₃)	τ _m /ns ^{b)}
0	90 (2894)	269 (4475)	593 (1185)	250
0.5	68 (3212)	232 (5884)	532 (2205)	244
1.7	84 (3386)	270 (4695)	579 (1292)	245
3.4	69 (3258)	248 (5681)	562 (1686)	243
5.8	77 (2893)	267 (4492)	604 (1099)	246
7.7	55 (2647)	232 (5325)	556 (1837)	245
17.2	67 (2325)	247 (3936)	564 (1175)	250
387.0	61 (3042)	236 (5249)	568 (1897)	240

a) To determine the luminescence lifetimes the decays are fitted to the function $I_L = B_0 + \sum_i B_i \tau_i$, being i the number of exponentials required to achieve a $\chi^2 \leq 1.2$. b) Pre-exponentially weighted average luminescence lifetime: $\tau_m = \sum_i B_i \tau_i / \sum_i B_i$; estimated uncertainties of the lifetimes: $\tau_i, \pm 3\%$; $\tau_m, \pm 1.5\%$.

Table S3. Optical sensors for tenuazonic acid detection.

Sensing approach	Detection	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ref.
SiO₂@Ru-MIP	Luminescence	63.80	This work
Eu-doped MIP	Luminescence	500.00	[1]
Immunoassay	Chemi/bioluminescence	0.65	[2]
ELISA^a	Absorbance	1.00	[3]
LFIA^b	Colorimetric	43.20	[4]

a) ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay b) LFIA: Lateral flow immunoassay

References

- [1] A. Rico-Yuste, R. Abouhany, J. L. Urraca, A. B. Descalzo, G. Orellana, M. C. Moreno-Bondi, Eu(III)-Templated molecularly imprinted polymer used as a luminescent sensor for the determination of tenuazonic acid mycotoxin in food samples, *Sensors Actuators B: Chem.* 329 (2021) 129256–129268.
- [2] F. Wang, Z. F. Li, Y. Y. Yang, D. B. Wan, N. Vasylieva, Y. Q. Zhang, J. Cai, H. Wang, Y. D. Shen, Z. L. Xu, B. D. Hammock, Chemiluminescent enzyme immunoassay and bioluminescent enzyme immunoassay for tenuazonic acid mycotoxin by exploitation of nanobody and nanobody–nanoluciferase fusion, *Anal. Chem.* 92 (2020) 11935–11942.
- [3] Y. F. Liang, , X. W. Zhou, F. Wang, Y. D. Shen, Z. L. Xiao, S. W. Zhang, Y. J. Li, H. Wang, Development of a monoclonal antibody-based elisa for the detection of alternaria mycotoxin tenuazonic acid in food samples. *Food Anal. Methods* 13 (2020) 1594–1602.
- [4] D. Kong, L. Liu, S. Song, Q. Zheng, X. Wu, H. Kuang, Rapid detection of tenuazonic acid in cereal and fruit samples using a lateral-flow immunochromatographic assay strip, *Food Agr. Immunol.* 28 (2017) 1293–1303.

En el tercer artículo de la Tesis Doctoral (enviado), “*Hyaluronic Acid–Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles with a Ruthenium Photosensitizer Cargo for Photodynamic Therapy of Oral Cancer Cells*”, se describe el diseño y síntesis de un nuevo complejo Ru(II)-bim como agente sensibilizador de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este complejo es encapsulado en nanopartículas (NPs) de ácido hialurónico–ácido poli(láctico-co-glicólico) (HA-PLGA) para su potencial aplicación en terapia fotodinámica en cáncer oral.

En el trabajo se describe la síntesis de un complejo de Ru(II) heteroléptico con un ligando bim y dos ligandos auxiliares 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina (tmp) con un marcado carácter hidrófobo. La caracterización espectroscópica y fotoquímica de esta molécula luminiscente, permitió estudiar la influencia del O₂ en el estado excitado triplete del fotosensibilizador (FS). Asimismo, se evaluó el rendimiento cuántico de producción de ¹O₂ en medio orgánico y acuoso, así como la habilidad del FS para generar otras especies como el O₂^{•-}. Seguidamente, el complejo de Ru(II) fue encapsulado en NPs de HA-PLGA para facilitar su disponibilidad en medio acuoso, selectividad de entrega en células tumorales y favorecer su liberación controlada para futuras aplicaciones *in vivo*. A continuación, se realizó una caracterización física y química del material, determinando el diámetro de partícula, su polidispersidad, su carga neta, el contenido de FS y la estabilidad fisiológica de las NPs a diferentes valores de pH. También se evaluó la degradación de las NPs en presencia la enzima hialuronidasa. Finalmente, se realizaron ensayos de colocalización celular y de fototoxicidad, tanto del complejo de Ru(II) como de la nanoformulación preparada, en células de cáncer oral (línea celular TR146).

Las etapas de las que consta este trabajo se pueden resumir en:

1. Diseño y síntesis de fotosensibilizadores basados en la estructura de complejos de Ru(II)-bim.
2. Caracterización espectroscópica y fotoquímica de los indicadores luminiscentes.
3. Evaluación de la eficiencia de producción de especies reactivas de oxígeno.
4. Encapsulación del fotosensibilizador hidrofóbico en la estructura de NPs de HA-PLGA.
5. Evaluación de la fototoxicidad *in vitro* del complejo de Ru(II) y su nanoformulación.

3. Hyaluronic Acid–Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles with a Ruthenium Photosensitizer Cargo for Photodynamic Therapy of Oral Cancer Cells

José Quílez-Alburquerque^{a,b}, Mohammad Ahsan Saad^b, Ana B. Descalzo^a,
Guillermo Orellana^{a,*} and Tayyaba Hasan^{b,c*}

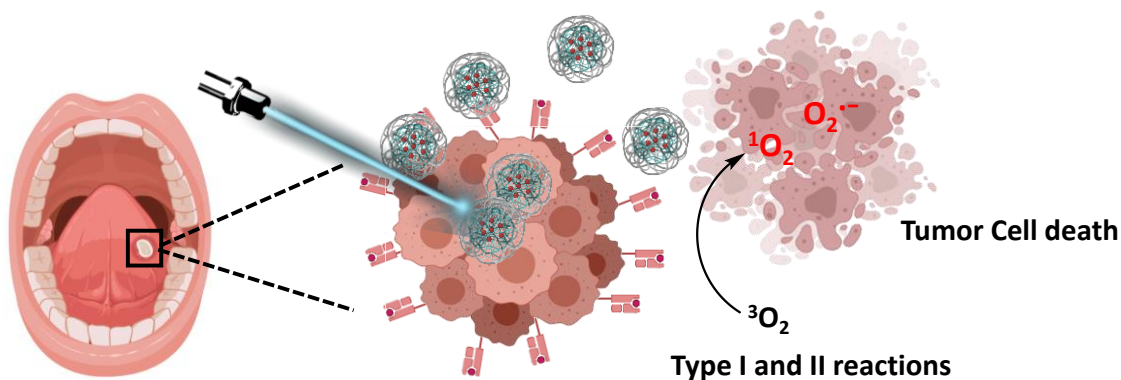
^a Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

E-mail: orellana@quim.ucm.es

^b Wellman Center for Photomedicine, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, 40 Blossom St, Boston, MA 02114, USA

^c Division of Health Sciences and Technology, Harvard University and Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA

E-mail: thasan@mgh.harvard.edu



KEYWORDS: *Photodynamic therapy, Ru(II) complex, hyaluronic acid-poly(lactic-co-glycolic acid), superoxide anion.*

Abstract

Photodynamic therapy (PDT), a combination of light, molecular oxygen and a photosensitizing dye, has gained attention as a promising technique to treat various types of cancers. Among all the photosensitizers reported so far, ruthenium(II) polypyridyl complexes exhibit unique photophysical and photobiological features owing to their photostability, μ -triplet excited states, and ability to undergo both 'type I' and 'type II' reactions in their photodynamic action. We report the preparation a novel Ru(II) complex containing one 2,2'-biimidazole (bim) and two tetramethylphenanthroline (tmp) ligands that sensitizes the simultaneous production of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and singlet oxygen (1O_2) upon irradiation with blue-green light. To improve its solubility and bioavailability, a zero-order degradation-controlled release formulation based on self-assembled hyaluronic acid (HA)-poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles (NPs) was prepared for its topical application in oral cancer cells (TR146 cell line). These NPs (152 nm diameter) showed 70% Ru-complex encapsulation efficiency, high physiological stability, low polydispersity index (0.12), and a sensitizer release enhanced by the hyaluronidase enzyme overexpressed in many cancer cells. Both the free complex and its nanocarrier are internalized by the TR146 cells, displaying >90% *in vitro* cytotoxicity under 470 nm activation (50 J cm^{-2}), highlighting their potential as PDT agents. To the best of our knowledge, this is the first example of a Ru(II) photosensitizer encapsulation into HA-PLGA NPs for targeted PDT of cancer.

1. Introduction

Photodynamic therapy (PDT) has emerged as an alternative for the treatment of different cancerous and non-cancerous malignancies [1–4]. PDT relies on the ability of a dye ('photosensitizer') to generate cytotoxic reactive oxygen species (ROS) upon light-activation at an absorption wavelength specific for the photosensitizer in the presence of molecular oxygen ($^3\text{O}_2$). If the dye is bound to the cell membrane or internalized, the ROS generation leads to significant cellular damage and, eventually, cell death. In most cases, upon collision, the triplet excited state of the photosensitizer transfers its energy to $^3\text{O}_2$ molecules yielding the highly reactive and short-lived singlet oxygen species ($^1\text{O}_2$), through the so-called 'Type II' mechanism [2]. However, Type II PDT is highly dependent on the surrounding oxygen concentration, which is very low ($\text{pO}_2 < 5 \text{ mm Hg}$) in the microenvironment of solid tumors [5]. Moreover, O_2 shortage is intensified during the PDT process [6]. By contrast, 'Type I' mechanism involving electron transfer from the surrounding biomolecules to the photoexcited photosensitizer with subsequent formation of superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) and other ROS from O_2 , has been established to be less dependent on the concentration of the latter [7,8]. In the presence of intracellular superoxide dismutase (SOD), $\text{O}_2^{\bullet-}$ can be transformed into hydrogen peroxide (H_2O_2) and $^3\text{O}_2$, relieving the hypoxic tumor microenvironment [9]. The accumulated H_2O_2 could be further transformed into the highly toxic hydroxyl radical (HO^{\bullet}) that aggravates oxidative damage enhancing PDT [10].

Among all the investigated photosensitizers, transition metal complexes offer advantages as potential PDT agents [11]. Several laboratories are engaged in exciting research related to the preclinical and clinical evaluation of such complexes [12,13]. In particular, luminescent Ru(II) polypyridyl complexes exhibit unique photophysical and photochemical features owing to their low toxicity in the dark, thermal inertia and photostability, μs -lived triplet excited states, near diffusion-controlled triplet quenching rate constants with $^3\text{O}_2$, and their ability to undergo Type I and Type II reactions for their photodynamic action [13,14]. Moreover, their photoactivated properties can be tuned by a judicious selection of their metal-chelating ligands. Noteworthy, the α -terthienyl imidazophenanthroline Ru(II) complex TLD1433 prepared by McFarland's group [12] has entered phase II clinical trials in Canada for Type I/Type II PDT of non-muscle invasive bladder cancer, underlining the potential usefulness of these transition metal complexes.

However, the poor selectivity for cancerous tissues limits the clinical application and poses challenges of using Ru(II) photosensitizers. To overcome this limitation, the quest for specific metal-chelating ligands is a necessity. In this context, imidazole derivatives have been identified as biologically active compounds in multiple applications [16]. Their antimycobacterial,

antifungal and anticancer activity, both in vivo and in vitro, have been demonstrated [17–19]. Furthermore, their imino moiety can coordinate the Ru(II) ion. Several Ru(II)-imidazolate complexes, such as NAMI-A or NKP-1339, have progressed to different stages in clinical trials as potential anticancer agents and alternative to cisplatin [20,21]. Notably, some studies have reported the use of 2,2'-biimidazole (bim) coordination complexes as possible antitumor agents [22]. Metal-bim complexes display anion-recognition features (sensing of acetates and diketonates has been demonstrated with luminescent Ru(II)-bim complexes) [23], anion transport through lipophilic membranes (luminescent Ir(III)-bim complexes) [24], lysosomal pH and DNA sensors (fluorometric and colorimetric Ru(II)-bim sensors, respectively) [25], G-quadruplex DNA-recognizing Ru(II)-bim complexes [26], and sensitizers for mitochondria-targeted PDT (cyclometalated Ir(III)-bim complexes) [27]. Moreover, the π -excessive character of the 2,2'-biimidazole ligand results in a more negative Ru^{3+/2+*} redox potential [28], which favors direct electron transfer from the photoexcited Ru(II)-bim complexes to O₂ generating O₂^{•-}, a variation of the type I PDT mechanism [29].

In this regard, we have designed and prepared a novel heteroleptic Ru(II)-bim complex (**Figures S1–S2**, Supporting Information), with potentially enhanced photodynamic activity owing to the synergistic effect of Type I and Type II mechanisms [30,31]. To enhance the photosensitizer solubility and bioavailability, a sustained release formulation is preferred [32]. Hyaluronic acid (HA) grafted with poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is a known polymer combination for fabrication of drug-loaded nanoparticles and has lately become a research hotspot due to its unique properties [33,34]. HA is a linear, anionic, biocompatible and biodegradable polysaccharide found mostly in the extracellular matrix [35]. Due to its specific affinity for the CD44 receptor [36], usually over-expressed in cancer cells, HA is an efficient encapsulation scaffold for hydrophilic drug delivery systems [37,38]. However, the loading of hydrophobic molecules in HA nanoparticles (NPs) is usually poor. To enhance it, HA is conjugated with hydrophobic moieties such as 5 β -cholanic acid [39] or PLGA [40] to yield high payloads of hydrophobic chemotherapeutic drugs [41] and photosensitizers [42,43] into self-assembled HA-NPs. The latter can be selectively taken up by tumor cells through receptor-mediated endocytosis and the internalized HA-NPs can be readily degraded by the action of intracellular hyaluronidase enzymes (HASE), over-expressed by tumor cells [44], releasing the encapsulated drug.

Herein, we describe the synthesis, spectroscopic and photochemical characterization of a novel ruthenium(II)-bim complex and its subsequent encapsulation in HA-PLGA NPs (**Scheme 1**) for topical application in oral cancer PDT. Besides the bim ligand, two ancillary 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline ligands are included in the coordination sphere of the Ru(II)

cation. The multiple methyl groups increase the hydrophobicity of the complex, thus improving its internalization into the cells. There are examples of physical encapsulation of Ru(II)-polypyridyl complexes into various scaffolds [45]; however, to the best of our knowledge, this is the first report of Ru(II)-loaded HA-PLGA nanoparticles for PDT. The photosensitizing NPs developed in our study exhibit high aqueous stability, low polydispersity, significant metallosensitizer encapsulation efficiency and a controlled release of the photosensitizer accelerated by hyaluronidases. We also report the evaluation of the novel Ru(II)-bim complex and its encapsulated nanoform as type I/type II PDT agent on oral cancer cells under blue light activation.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The precursor 2,2'-biimidazole (bim) ligand and ammonium hexafluorophosphate were from Fluorochem whereas the 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline (tmp) ligand was purchased from Merck. Lithium chloride and Ru(III) chloride trihydrate were from Acros Organics. Sodium hyaluronate (2×10^5 Da) was from Lifecore Biomedical (Chaska, MN). Lyophilized hyaluronidase (Type VIII, from bovine testes, 300-1,000 U/mg), dihydroethidium (DHE), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA), potassium dioxide, anhydrous dimethylformamide (DMF), formamide, *N*-hydroxysuccinimide (NHS), and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) were from Sigma-Aldrich, and poly(L-lactide-co-glycolide)-block-poly(ethylene glycol)-amine (PLGA-PEG-NH₂) (Mw ~ 12,000:5,000 Da) from PolySciTech (West Lafayette, IN). Dichloromethane, methanol, dimethyl sulfoxide, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), Hoechst, MitoTracker™ Deep Red FM and LysoTracker™ Red DND-99 were purchased from ThermoFisher Scientific. Acetonitrile (MeCN) (HiPerSolv Chromanorm HPLC grade), acetone, and deuterated solvents with tetramethylsilane (TMS) as internal reference were from VWR International Eurolab. Ethylene glycol (+99%) was from Scharlau (Sentmenat, Spain). Phosphate-buffered saline (PBS) (1X, pH 7.0) was from Corning (Corning, NY). Ultrapure water was obtained immediately before use from a Merck Direct-Q3-UV system.

2.2. Synthesis of *cis*-Ru(tmp)₂Cl₂

This precursor complex was synthesized by adapting a general protocol for the synthesis of *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂] [46]: 87.6 mg (0.42 mmol) of Ru(III) chloride hydrate, 200 mg (0.85 mmol) of tmp, and 106 mg (2.52 mmol) of lithium chloride were dissolved in 2 mL of anhydrous DMF. The reaction mixture was refluxed for 3 h under argon, then cooled down, and the Ru(II)

complex was precipitated by addition of acetone. The resulting black-purple solid was collected by filtration and dried overnight *in vacuo* (62% yield). UV-vis (MeOH): λ_{\max}/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) 500 (7540) 270 (131950).

2.3. Synthesis of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$

A mixture of 120 mg (0.18 mmol) of *cis*-Ru(tmp)₂Cl₂ and 30 mg (0.22 mmol) of 2,2'-biimidazole was dissolved in 2 mL of ethylene glycol. The solution was refluxed for 1 h under argon. The heteroleptic Ru(II) complex was precipitated by addition of a saturated aqueous solution of ammonium hexafluorophosphate, filtered out and washed with water. The resulting red-orange solid was purified by column chromatography (silica gel; dichloromethane–methanol 9:1 v/v) (30% yield). ¹H-NMR (300 MHz, MeCN-d₃, δ): 8.32 (d, $J = 5$ Hz, 4H), 8.04 (s, 2H), 7.74 (s, 2H), 7.19 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H), 6.26 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H), 2.83 (s, 6H), 2.72 (s, 6H), 2.44 (s, 6H), 2.18 (s, 6H). ¹³C-NMR (300 MHz, MeCN-d₃, δ): 154.13, 154.12, 148.61, 147.89, 144.18, 144.03, 141.17, 135.45, 134.73, 129.97, 129.90, 129.30, 124.87, 124.84, 121.58, 18.18, 17.61, 14.93, 14.78. MS (ESI): $[\text{M}]^+$ calculated for RuC₃₈H₃₇N₈, 707.2; found, 707.2; $[\text{M}]^{2+}$ calculated for RuC₃₈H₃₈N₈, 354.1; found, 354.0. UV-vis (PBS): λ_{\max}/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) 460 (12711), 270 (87482).

2.4. Time-resolved luminescence measurements

Emission lifetime determinations were performed by single photon timing (SPT) on an Edinburgh Instruments (UK) FLS980-Xd2-T spectrometer, using a Horiba 470LH diode laser (463 nm, < 1 ns pulse width), an excitation 467-nm bandpass interference filter, a 500 nm-blazed double monochromator in the emission path, and a Hamamatsu R928P photomultiplier thermoelectrically cooled at -21 °C. Due to the presence of different species in the excited state as a result of the deprotonated forms of bim, we always report the so-called pre-exponentially weighted mean lifetime ($\tau_m = \sum_i B_i \tau_i / \sum_i B_i$) for each luminescence decay profile, calculated from the biexponential fit of the experimental points ($I_L(t) = A + \sum_1^2 B_i \tau_i$).

2.5. Singlet oxygen luminescence measurements

Quantum yields of singlet oxygen production (Φ_Δ) were measured with an Edinburgh Instruments LP-900 laser kinetic spectrometer equipped with a frequency-tripled Nd:YAG laser (Minilite II, Continuum, CA) for excitation at 355 nm, and a Hamamatsu H10330-45 NIR PMT module for singlet oxygen emission monitoring at 1265 nm (Bentham TM300 monochromator with a 600 grooves mm⁻¹ NIR grating). The PMT is fitted with a 10 K Ω resistor at the signal output for proper amplification of the signal. A pyroelectric Gentec QE12LP-S-MB energy meter was employed to monitor the energy of the laser pulse, which was varied from 100 to 600

$\mu\text{J pulse}^{-1}$ to avoid (partial) saturation of the $^1\text{O}_2$ emission signal and keep it in the linear region. Absorbance-matched ($A_{355} = 0.25$) solutions of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ and the reference photosensitizers $[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}$ ($\Phi_{\Delta} = 0.94 \pm 0.07$ in air-equilibrated MeCN at room temperature measured against a 1*H*-phenalen-1-one standard in the same solvent, $\Phi_{\Delta} = 0.98 \pm 0.07$ [47]) or $[\text{Ru}(\text{dpds})_3]^{4+}$ ($\Phi_{\Delta} = 0.43 \pm 0.04$ in air equilibrated D_2O at room temperature [48]) were used for the measurements. Typically, 40 laser shots were summed for each signal to improve the *s/n* ratio.

2.6. Superoxide radical anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) detection

The specific $\text{O}_2^{\bullet-}$ probe dihydroethidium (DHE) was used. DHE is converted by $\text{O}_2^{\bullet-}$ into 2-hydroxiethidium, a red-fluorescent product ($\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 620 \text{ nm}$) [49]. The $\text{O}_2^{\bullet-}$ trapping experiments used $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ photosensitizer ($9.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) and DHE ($5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) dissolved in air-equilibrated MeCN– H_2O 1:1 (v/v). The solution was irradiated with a temperature-stabilized 25-mW 405-nm diode laser (PTG-PPMT25, Laser 2000, France) under continuous stirring. Steady-state fluorescence spectra (corrected for the instrument response) were measured with a Horiba Fluoromax-4TCSPC spectrofluorometer fitted with a red-sensitive R928 photomultiplier (Hamamatsu, Japan) and equipped with a 150-W xenon lamp. The fluorescence spectrum of 2-hydroxiethidium was recorded ($\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$) at different irradiation times. For control purposes, the emission of DHE was measured at different irradiation times in the absence of the Ru(II) photosensitizer and in the presence of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ after deoxygenation with argon before irradiation.

2.7. Synthesis of HA-PLGA

Hyaluronic acid (HA; 40 mg, 0.2 μmol) was dissolved in formamide (2.5 mL) with gentle heating under vigorous stirring. After HA was completely dissolved, 9 mg (0.047 mmol) of EDC and 5 mg (0.05 mmol) of NHS were added at room temperature. The reaction mixture was kept under stirring for 2 h. Then, a solution of 10 mg PLGA-PEG-NH₂ (0.6 μmol) and DIPEA (1 μL) in 0.5 mL of formamide was added dropwise. The reaction mixture was maintained at room temperature for 24 h. Finally, it was dialyzed against water for two days (Spectra/Por[®] cellulose ester membrane, MWCO 100 kD, Repligen, Waltham, MA) and the resulting solution was lyophilized.

2.8. Synthesis and characterization of the Ru-loaded HA-PLGA NPs

$[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ -loaded HA-PLGA nanoparticles were prepared by dialysis [50]. Briefly, HA-PLGA (10 mg) and $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ (0.1 mg) were dissolved in 1 mL of 3:1 (v/v) DMSO–DMF mixture. Then, 9 mL of deionized water was added dropwise at room temperature

under stirring, followed by 20 min of sonication over an ice bath with a micro-tip sonicator (Fisher Scientific, Waltham, MA). Thereafter, the solution was dialyzed (Spectra/Por® cellulose ester membrane MWCO 3.5–5 kD) against water for 24 h to remove the organic solvent. Finally, the Ru-HA-PLGA NPs were filtered through a 0.45- μm syringe filter to discard aggregates. The amount of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ loaded into the HA-PLGA NPs was determined by measuring the luminescence of the encapsulated photosensitizer. In brief, 1 mg of lyophilized Ru-HA-PLGA NPs were dissolved in 1 mL of DMSO, followed by sonication for 20 min. Then, the luminescence spectrum of the Ru(II) complex was recorded ($\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$) and compared with a calibration curve previously plotted in DMSO ($1\text{--}80 \mu\text{mol L}^{-1}$). A blank was measured with the unloaded HA-PLGA NPs. The hydrodynamic diameter, polydispersity and zeta potential of the NPs were determined by a Zetasizer Nano ZS dynamic light scattering apparatus (Malvern Instruments, Houston, TX). The NP size and morphology were also evaluated with a Philips CM10 Transmission Electron Microscopy (TSS Microscopy, Hillsboro, OR).

2.9. Drug release assay

Ru-HA-PLGA NPs in PBS (7.0 mg mL^{-1}) were placed in a dialysis bag (Spectra/Por® cellulose ester membrane, MWCO 100 kD, Repligen, Waltham, MA) and immersed in 9 mL phosphate buffer (PBS, pH 7.0) in the presence of 0 or 150 units mL^{-1} of hyaluronidase (HASE) at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ under mild shaking. At different time points, 200 μL aliquots of the media were withdrawn and the same volume was replaced with an equal volume of PBS with similar concentration of HASE to maintain a constant sink condition. The $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ release from Ru-loaded-HA-PLGA NPs was determined by measuring the luminescence of the aliquots ($\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$) and the corresponding calibration curve in PBS ($1\text{--}80 \mu\text{mol L}^{-1}$).

2.10. Cell culture

The human buccal carcinoma cell line TR146 was obtained from ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures). TR146 cells were cultured in DMEM/F12 medium (Fisher Scientific, Waltham, MA), supplemented with 10% FBS and antibiotic mixture containing penicillin (100 I.U./mL) and streptomycin ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Mediatech, Manassas, VA), and incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in a 5% CO_2 atmosphere.

2.11. Cellular uptake

TR146 cells were seeded in a 6-well plate at a cell density of 200,000 cells per well in 2000 μL of media and allowed to grow overnight. Thereafter, the cells were treated with $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($0.25 \mu\text{mol L}^{-1}$) and Ru-HA-PLGA NPs ($1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$

equivalent). At different time points (3 h, 6 h, 12 h and 24 h), the medium was removed, and the cells were washed with PBS (2 x 2.0 mL), trypsinized, and analyzed with a flow cytometer (BD FACSAria™ Cell Sorting System, Biosciences).

2.12. Colocalization assay

Colocalization analysis was performed as reported previously [51]. Briefly, TR146 cells were plated in 35-mm glass bottom dishes (Cellvis, Mountain View, CA) at a cell density of 50,000 cells per dish in 2000 μL of media and allowed to grow overnight at 37 °C under 5% CO_2 . Cells were treated with $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ complex (0.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and Ru-HA-PLGA NPs (1.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ equivalent) for 12 h and incubated with MitoTracker® Red for 30 min prior to fixation. Cells were then washed with PBS (2 x 2.0 mL), fixed with 4% paraformaldehyde solution in PBS for 15 min, washed with PBS (2 x 2.0 mL) and counterstained with Hoechst at a concentration of 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cells were visualized using an Olympus FLUOVIEW FV1000 confocal laser scanning microscope (Olympus America, Center Valley, PA). Image analysis was performed using Image-J software (National Institute of Health, Bethesda, MD).

2.13. *In vitro* (photo)cytotoxicity

Dark and light-induced cytotoxicity was assessed by the colorimetric MTT assay. TR146 cells were plated in triplicates in 96-well plates at a density of 5,000 cells per well in 200 μL of media and allowed to grow. For assessing dark cytotoxicity of the compounds, TR146 cells were treated with increasing concentrations (0.25 to 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ or Ru-HA-PLGA NPs for 12 h. For phototoxicity assessment, cells were treated with $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ (0.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) or Ru-HA-PLGA NPs (1.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ equivalent) for 12 h. After incubation, the culture media was replaced with fresh medium, and irradiated with a 470 nm 650 mW (min) mounted LED (Thorlabs, Newton, NJ) with increasing radiant energy fluences (2.5, 5, 10, 25 and 50 J cm^{-2}) and further incubated in dark at 37 °C under 5% CO_2 for 24 h. Finally, a freshly prepared MTT solution (0.25 mg mL^{-1}) in culture media was added to each well and incubated at 37 °C for 30 min. After removal of the medium containing MTT, the formazan crystals formed by viable cells were dissolved in DMSO (200 μL) and the absorbance was recorded at 570 nm using a SpectraMax M5 multimode microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA).

3. Results and Discussion

With the aim of maximizing the cellular uptake and the photogeneration of superoxide anion, a series of Ru(II)-complexes containing a single 2,2'-biimidazole (bim) ligand were

prepared by chelating two 2,2'-bipyridine (bpy), 1,10-phenanthroline (phen) or 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline (tmp) as ancillary ligands in the pseudooctahedral Ru(II) coordination sphere, following a reported procedure [26]. The uptake of the dyes in TR146 cells was studied by incubating the dyes with the cells for 24 h, followed by analysis using flow cytometry. As shown in **Figure S1** (Supporting Information), a strong luminescence signal was observed when the cells were treated with the hydrophobic Ru(II) complex $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$. However, a two-order of magnitude lower signal was observed for the other two hydrophilic Ru(II)-bim dyes. These results are in agreement with literature results that show higher uptake for hydrophobic Ru(II) complexes [52,53]. Therefore, $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ was selected as potential candidate for type I / type II PDT.

3.1. Synthesis of the $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ photosensitizer

The chemical structure of the heteroleptic complex $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ containing two 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline (tmp) and one 2,2'-biimidazole (bim) ligands is depicted in **Scheme 1**. The metal-organic Ru(II) photosensitizer was prepared in a two-step synthesis. Briefly, the precursor *cis*-Ru(tmp)₂Cl₂, was obtained according to the general procedure for the synthesis of *cis*-Ru(bpy)₂Cl₂ [46], in which a stoichiometric amount of tmp was mixed with RuCl₃ in the presence of a large excess of lithium chloride to avoid the formation of unwanted homoleptic $[\text{Ru}(\text{tmp})_3]^{2+}$ complex. Then, a mixture of *cis*-Ru(tmp)₂Cl₂ and the bim ligand in ethylene glycol was heated to reflux (**Figure S2**, Supporting Information). **Figures S3–S5** (Supporting Information) document the spectroscopic characterization of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$, isolated as PF₆⁻ salt, by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and ESI-MS. The four methyl groups on the phenanthroline moiety significantly increase the lipophilicity of the cationic photosensitizer reducing its solubility in water.

3.2. UV-light triggered ROS generation

To determine whether or not molecular oxygen had a significant influence on the luminescence of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$, we measured the luminescence lifetimes in air-equilibrated and deoxygenated acetonitrile (MeCN) under 463 nm excitation. $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ showed a pre-exponentially weighted average lifetime (τ_m , see Experimental section) of 18 ns and 104 ns in aerated and O₂-free MeCN, respectively. These results confirm that molecular oxygen quenches the (triplet) excited state of the complex. Therefore, we evaluated the ability of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ to photosensitize the production of singlet oxygen (¹O₂) by monitoring the ¹O₂ emission decay at 1265 nm in air-equilibrated solution (**Figure 1a**). The luminescence of the unquenched metal-to-ligand charge transfer triplet (³MLCT) excited state is also visible at 1265 nm [48]. The production of singlet oxygen (¹O₂) was also measured in D₂O (used as a surrogate of H₂O as the emission of ¹O₂ in H₂O is extremely weak [53]). The quantum yield of ¹O₂

production (Φ_{Δ}) was determined by using two reference photosensitizers of the same family namely, tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)ruthenium(II) dication ($[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}$, $\Phi_{\Delta} = 0.94 \pm 0.07$) in aerated MeCN, and tris[(1,10-phenanthroline-4,7-diyl)-bis(benzenesulfonato)]ruthenate ($[\text{Ru}(\text{dpds})_3]^{4-}$, $\Phi_{\Delta} = 0.43 \pm 0.04$) in aerated D_2O solution [48]. Φ_{Δ} for $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ (**Figure S6**, Supporting Information) was found to be 0.22 ± 0.05 in aerated MeCN. However, $^1\text{O}_2$ generation in aqueous environment was negligible ($\Phi_{\Delta} < 0.01$) possibly due to ca. 10-fold lower oxygen concentration in water as compared to organic solvents, taking into account the similar excited state lifetime in those solvents (95 ns). The analogous homoleptic complex $[\text{Ru}(\text{tmp})_3]^{2+}$ exhibits a Φ_{Δ} value of 0.80 ± 0.04 in aerated acetonitrile. This higher Φ_{Δ} is presumably due to the longer excited-state lifetime of $[\text{Ru}(\text{tmp})_3]^{2+}$ (463 ns) than that of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ (103 ns) in deoxygenated MeCN, since the excited state oxidation potential of those complexes is identical (-1.03 V/NHE and -1.05 V/NHE, respectively). This logical result is a consequence of the higher energy of π^* orbital of bim due to its π -excessive electron density compared to phenanthroline. The excited state oxidation potentials ($E^{3+/2+*}$) have been calculated from the measured ground state oxidation potentials (1.04 V/NHE and 0.86 V/NHE, respectively, **Figure S7a**, Supporting Information) and the approximate energy of the $\pi^* \rightarrow d_{t2g}$ transition (600 nm and 650 nm, equivalent to 2.06 eV and 1.90 eV, respectively, **Figure S7b**, Supporting Information.). The high energy of the TMP and bim π^* orbitals will favor the superoxide anion $\text{O}_2^{\bullet-}$ generation by photoinduced electron transfer quenching from $^*[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ to O_2 ($E^{0/-} = -0.33$ V/NHE [54]) [29].

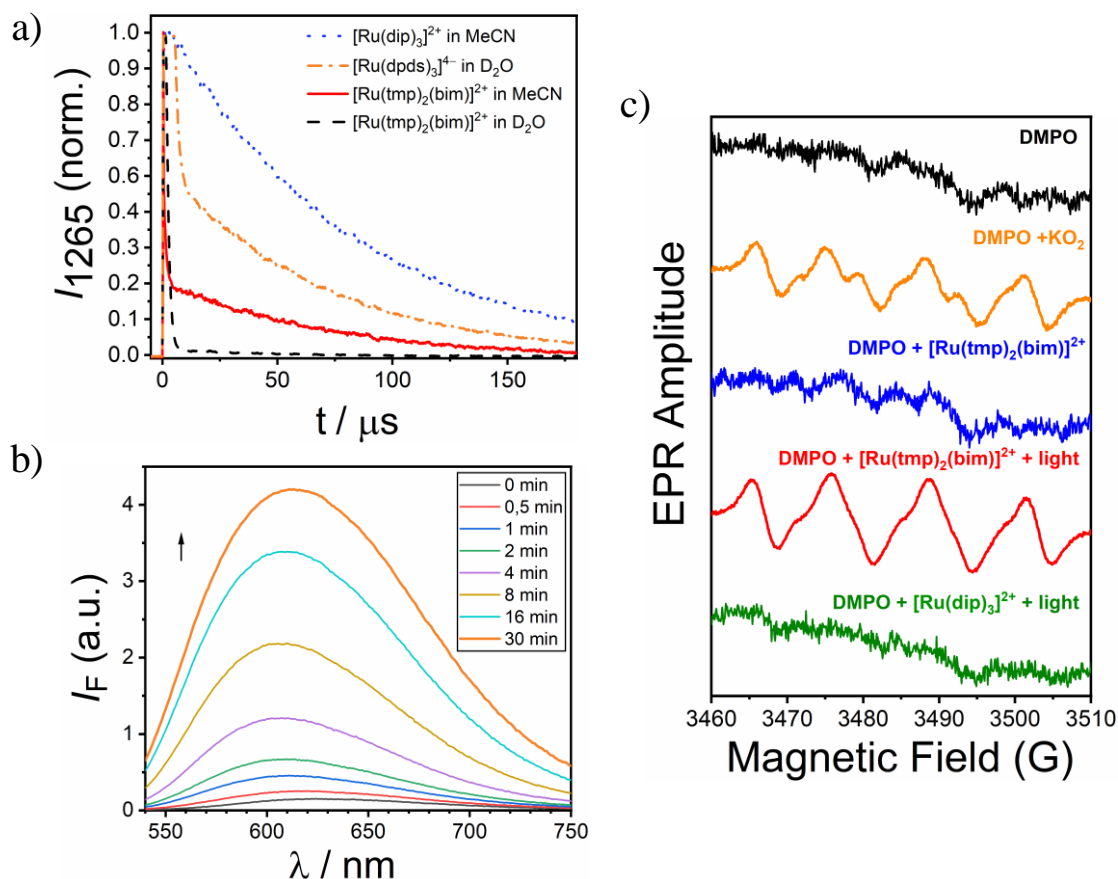
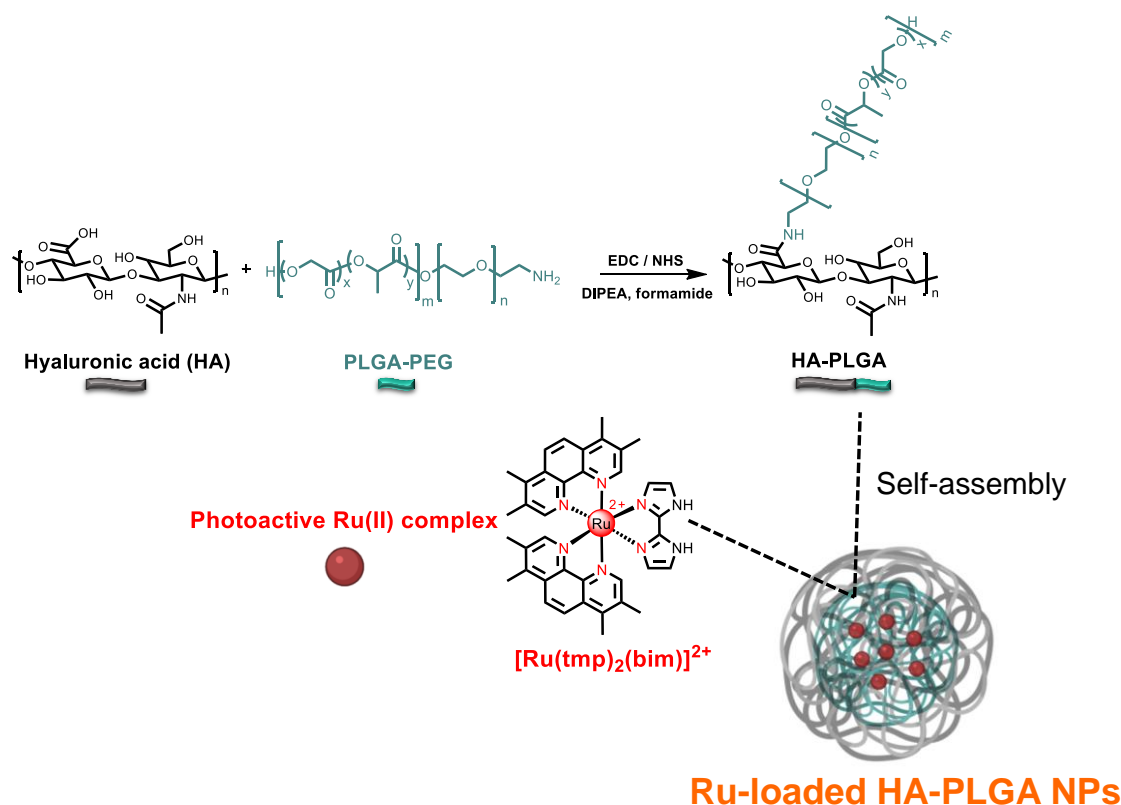


Figure 1. **a)** Decay of the ¹O₂ luminescence at 1265 nm upon excitation with 3-ns 0.5-Hz 355-nm Nd:YAG laser pulses (the depicted decays are the sum of 40 pulses) of solutions of [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ in air-equilibrated MeCN (red solid line; $\tau = 77 \pm 3 \mu\text{s}$) or D₂O (black dashed line; $\tau = 67 \pm 1 \mu\text{s}$) ($A_{355} = 0.25$). The quantum yield of singlet oxygen production (Φ_{Δ}) was measured using absorbance-matched solutions of the reference photosensitizers [Ru(dip)₃]²⁺ in MeCN (blue dotted line; $\Phi_{\Delta} = 0.94 \pm 0.07$) or [Ru(dpds)₃]⁴⁻ in D₂O (orange dashed-dotted line; $\Phi_{\Delta} = 0.43 \pm 0.04$) (see text for the photosensitizer names). **b)** Fluorescence spectrum of HOE⁺ ($\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$) under continuous irradiation with a 50-mW 405-nm diode laser of [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ (9.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) in the presence of DHE (50.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), in 1:1 (v/v) MeCN–water. **c)** EPR spectra in 1:1 (v/v) MeCN–water solution of (from top to bottom) DMPO (44.2 mmol L^{-1}), DMPO with excess of KO₂, DMPO with 10.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺, DMPO with 10.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ after 300-s illumination, and DMPO with 2.1 mmol L^{-1} of [Ru(dip)₃]²⁺ after 300-s illumination.

To confirm the production of O₂^{•-}, we used dihydroethidium (DHE) which specifically reacts with O₂^{•-} [49]. The latter is a non-fluorescent molecule that can be oxidized by superoxide yielding the red-fluorescent product 2-hydroxiethidium (HOE⁺, $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 620 \text{ nm}$ in water) [55,56]. A [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ solution irradiated in the presence of DHE with a 405-nm diode laser (a wavelength where the photosensitizer dye has a high absorption but that of DHE and the HOE⁺ being generated is negligible, **Figure S8a**, Supporting information) showed a dramatic increase in its fluorescence (**Figure 1b**) as compared to when it is excited at 520 nm (a wavelength where only HOE⁺ has a significant absorption, **Figure S8a**, Supporting information). The fluorescence intensity decreased significantly when DHE was irradiated for

the same period of time in the absence of photosensitizer or in the presence of latter but in deoxygenated solution (sparged with argon before irradiation; **Figure S8b**, Supporting information).

We further proved the generation of $O_2^{\bullet-}$ by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy using 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) as the spin-trap agent [57]. As shown in **Figure 1c**, no EPR signals were observed when DMPO and $[Ru(tmp)_2(bim)]^{2+}$ were incubated in dark. In contrast, after 5 min illumination, a characteristic paramagnetic DMPO- $O_2^{\bullet-}$ adduct was observed with an EPR spectrum similar to that of potassium superoxide (KO_2) in DMPO solution. For comparison, the same experiment was carried out in the presence of the longer lived $^3[Ru(dip)_3]^{2+}$ ($\tau_0 = 6 \mu s$) [48], a photosensitizer dye which exclusively generates 1O_2 (see above). In this case, no EPR signal was observed after irradiation (**Figure 1c**), thus confirming the photogeneration of $O_2^{\bullet-}$ by $[Ru(tmp)_2(bim)]^{2+}$.



Scheme 1. Preparation of $[Ru(tmp)_2(bim)]^{2+}$ photosensitizer-loaded hyaluronic acid (HA)–poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) NPs for PDT.

3.3. Preparation and Characterization of Ru-HA-PLGA NPs

To increase the bioavailability of the hydrophobic $[Ru(tmp)_2(bim)]^{2+}$, it was encapsulated in HA-PLGA nanoparticles. HA-PLGA nanoparticles have been previously demonstrated to efficiently encapsulate hydrophobic drugs in the PLGA core while the hydrophilic HA shell

assists in stabilizing the nanoparticles in aqueous environments [34,37]. The procedure followed for the synthesis of the Ru-loaded HA-PLGA NPs is depicted in **Scheme 1**. Briefly, an amine-terminated PEGylated PLGA (PLGA-PEG-NH₂) was conjugated to hyaluronic acid by EDC/NHS coupling. The successful chemical functionalization of HA was confirmed by ¹H-NMR (**Figure S9**, Supporting Information). The presence of PLGA chains is essential for promoting self-assembly and encapsulation of the hydrophobic [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺. Encapsulation of the dye was carried out firstly by dispersing both entities, the HA-PLGA scaffold and [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺, in a DMF-DMSO (3:1 v/v) mixture followed by slow addition of deionized water until the solution turned turbid. In order to facilitate the diffusion of dye molecules into the polymer core, the suspension was ultrasonicated and, finally, the obtained nanoparticles were subjected to dialysis for removing non-encapsulated photosensitizer molecules and the DMF-DMSO solvent mixture, as reported previously [50]. The absorption spectrum of the prepared Ru-HA-PLGA NPs was recorded and compared to that of the free complex in aqueous solution (**Figure 2a**). The characteristic Ru(II)-broad absorption band at 470 nm assigned to an allowed MLCT transition was also observed in the Ru-HA-PLGA NPs, suggesting that the spectroscopic properties of the photosensitizer were not affected after encapsulation.

Table 1. Physico-chemical characterization of Ru-HA-PLGA NPs.

Ru complex/ HA-PLGA (mg/mg)	TEM mean diameter (nm)	DLS mean diameter (nm) ^a	PDI ^{a,b}	ζ (mV) ^a	Ru complex encapsulation efficiency (%) ^a	Ru complex content (%) ^c
0/10	50 ± 10	143 ± 2	0.07 ± 0.02	-9.8 ± 0.6	--	--
0.1/10	70 ± 20	152 ± 6	0.12 ± 0.05	-9 ± 1	70 ± 9	0.15 ± 0.03

^a In phosphate buffer (1X) at pH 7.0. ^b Polydispersity index. ^c By weight.

Transmission electron microscopy (TEM) images confirmed the successful synthesis of the HA-PLGA NPs (**Figure S10**, Supporting Information) and their properties are depicted in **Table 1**. While the diameter of the NPs in the absence of the photosensitizer, as analyzed by TEM, was 50 nm, a larger hydrodynamic diameter was observed by dynamic light scattering (143 ± 2 nm; **Table 1**). This significant difference might be ascribed to shrinkage of the NPs due to dehydration during sample preparation and TEM imaging, performed under high vacuum, as has been reported previously for nanoparticles synthesized with hydrophilic polymers [58]. The addition of 0.1 mg of [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ per 10 mg of HA-PLGA resulted in a slight increase in size to 152 ± 6 nm (DLS). Preparations with higher amounts of [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ led to an increase in nanoparticle size (> 200 nm) (data not shown). All the

nanoformulations described above showed a negative zeta potential (**Table 1**) demonstrating the presence of the ionized HA on their surface, at pH 7.0. PLGA nanoparticles synthesized from PLGA-PEG-NH₂ showed a lower zeta-potential (0 to -2 mV), further confirming the presence of HA on the surface on the nanoparticles. This is in agreement with previous studies where the PEGylated PLGA has been reported to have close to neutral zeta-potential [59]. For further studies, Ru-HA-PLGA NPs prepared with 0.1 mg Ru(II) complex per 10 mg HA-PLGA were used as they showed the “ideal” size (diameter < 200 nm) required for in vivo applications [32]. The photosensitizer encapsulation efficiency and the loading content in NPs were determined by luminescence analysis of the extracted complex after generating a calibration curve in DMSO. A (70 ± 9) % encapsulation efficiency of [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ in the HA-PLGA NPs was achieved, highlighting the high efficiency of the preparation procedure, as compared to previous studies which have reported lower encapsulation efficiencies, ranging from 10–45 % [60,61].

To evaluate the stability of the Ru-HA-PLGA NPs, the NPs were suspended in PBS with pH 7.0 and in acetate buffer with 5.0, respectively, for 4 days at 37 °C, to imitate healthy tissue and acidic microenvironment of the tumor. **Figure 2b** shows that the environmental pH significantly alters the NP size, and a larger diameter was observed in acidic medium (152 ± 6 and 219 ± 7 nm at pH 7.0 and pH 5.0, respectively). This is not without precedent for HA-PLGA NPs [50], and is due to the protonation of carboxylic acid groups in HA at lower pH values leading to decrease in electrostatic repulsion and hence aggregation of the NPs. Despite this effect, the NP size did not change significantly for 4 days, demonstrating good physical stability in that pH range. This increased stability may be ascribed to the presence of the biodegradable PLGA chemically conjugated to the HA backbone [33].

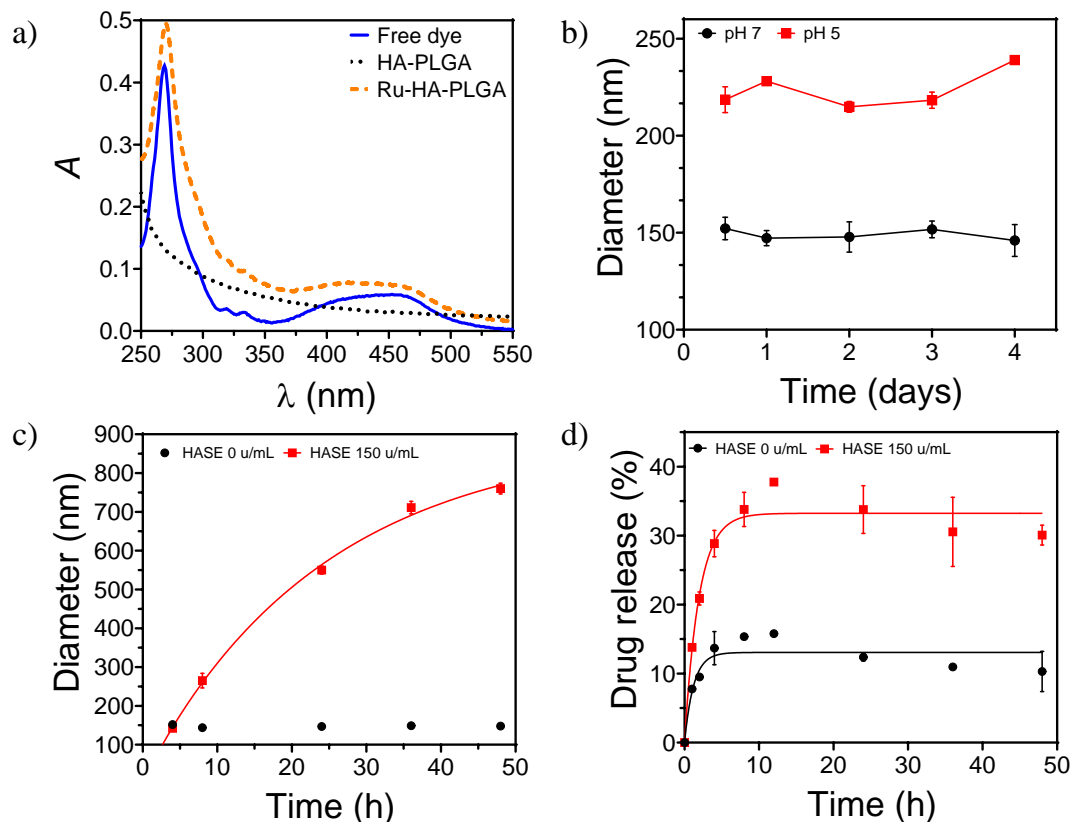


Figure 2. **a)** UV-Vis absorption spectra of the $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($7.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) (blue solid line), HA-PLGA NPs (black dotted line), and Ru-HA-PLGA NPs in water. The Ru-HA-PLGA NPs showed absorption bands characteristic of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$. **b)** Evolution of the Ru-HA-PLGA particle size in PBS (pH = 7.0) and acetate buffer (pH = 5.0) at 37 °C for 4 days, as monitored by DLS. While the particle size at pH 5 was found to be higher, there was no significant change in size, over a period of 4 days, under both the conditions. Data are presented as mean \pm S.D ($n \geq 3$). **c)** Evolution of the Ru-HA-PLGA particle size in PBS (pH = 7.0) at 37 °C for 48 h, in the absence and in the presence of 150 units mL^{-1} of hyaluronidase (HASE), monitored by DLS. Non-linear fit (red curve, $r^2 = 0.998$) to the exponential association function $f(x) = y_{\text{max}} \times (1 - e^{-kx})$ with the following parameters: $y_{\text{max}} = (874 \pm 34) \text{ nm}$; $k = (40 \pm 4) \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ is shown for the HASE treated Ru-HA-PLGA NPs. **d)** Release of the $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ from the Ru-HA-PLGA NPs, as studied for 48 h, in the absence and presence of 150 units mL^{-1} of HASE in PBS (pH = 7.0) at 37 °C. Non-linear fit to an exponential association function $f(x) = y_{\text{max}} \times (1 - e^{-kx})$, defined by the following parameters: $y_{\text{max}} = (33 \pm 1) \text{ nm}$ and $k = (51 \pm 7) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ ($r^2 = 0.965$) and $y_{\text{max}} = (13.1 \pm 0.8) \text{ nm}$ and $k = (0.8 \pm 0.3) \text{ h}^{-1}$ ($r^2 = 0.849$) are shown as red and black lines, respectively.

The degradation of the HA-PLGA scaffold in the presence of hyaluronidase enzyme (HASE) and the release of the $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$, was also evaluated. Upon incubation with HASE, the mean diameter dramatically increased to $(615 \pm 11) \text{ nm}$ within 48 h (**Figure 2c**), suggesting partial HA degradation and nanoparticle loosening, as reported previously [50]. These results are in good agreement with the drug release profile measured in the presence of HASE (**Figure 2d**): in the first 12 h, $12.4 \pm 0.6 \%$ of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ was released under physiological conditions. However, the release rate of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ from the NPs was much higher in the presence of HASE ($38 \pm 1 \%$). Both, the degradation and drug release

curves, were successfully fitted to an exponential association function (**Figure 2c** and **2d**). While conventional nanoformulations might undergo hydrolytic degradation, the NPs developed in our study rely on the action of hyaluronidase enzymes overexpressed and secreted by cancer cells which could facilitate $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ release in the tumor microenvironment and in the tumor cells thereby enhancing tumor specificity and activity [62].

3.4. Cellular Uptake and Subcellular Localization

The intracellular uptake and subcellular localization of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ and the Ru-HA-PLGA NPs in TR146 cells were analyzed by flow cytometry and confocal fluorescence microscopy, respectively. The cells were incubated with $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ or Ru-HA-PLGA NPs for 3, 6, 12 and 24 h and were subsequently analyzed by flow cytometry (**Figure 3**) or confocal fluorescence microscopy (**Figure S11**, Supporting Information). A gradual increase in the intracellular $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ luminescence intensity was observed, for both the $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ treated and Ru-HA-PLGA NP treated cells over the 24 h incubation period. To further investigate if the internalization of Ru-HA-PLGA NPs is mediated by the CD44 receptor, a competitive assay with free HA was performed and analyzed by flow cytometry. As shown in **Figure S12** (Supporting Information), a 22% reduction ($P < 0.01$) in the cellular uptake of Ru-HA-PLGA NPs was observed in the presence of free HA. However, the decrease in luminescence was observed to be just 10% ($P < 0.05$) when the cells were treated with $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ in the presence of free HA. These results suggest that the Ru-HA-PLGA-NPs are being taken up by TR146 cells through CD44 receptor-mediated endocytosis [50]. These results highlight the CD44 targeting potential of Ru-HA-PLGA NPs.

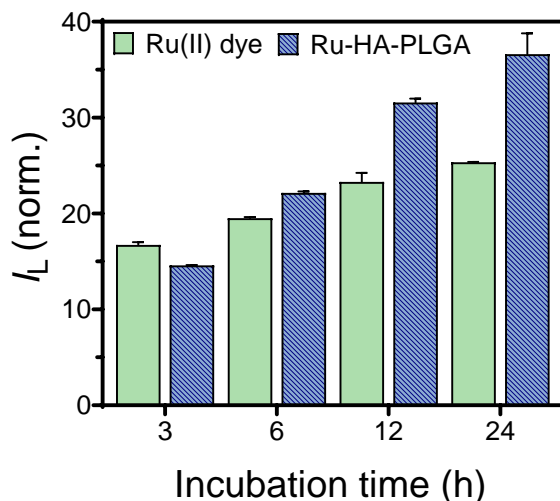


Figure 3. Flow cytometry analysis of TR146 cells treated with free $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($0.25 \mu\text{mol L}^{-1}$) or Ru-HA-PLGA NPs ($1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ equivalent) performed at different times. Luminescence values are normalized to the non-treated control for the respective time points. Data are presented as mean \pm S.D ($n \geq 3$).

As shown in **Figure 3**, a strong $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ luminescence signal was observed even for short incubation times. The high lipophilicity and the cationic character of the $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ determines its rapid uptake and, possibly, its intracellular localization. For instance, some reports have demonstrated that those features lead to an increased accumulation of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ in the mitochondria [63]. Therefore, confocal fluorescence microscopy with commercial MitoTracker[®] Red was performed to evaluate the accumulation of the dye and the Ru-HA-PLGA NPs in mitochondria. The fluorescence emission from the $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ complex, depicted in **Figure 4**, overlaps with the fluorescence of MitoTracker[®] Red, suggesting mitochondrial co-localization. To corroborate it, the Pearson's correlation coefficient (r) was determined for the Ru(II) dye (0.73) and the Ru-HA-PLGA NPs (0.64). In contrast, a significantly lower co-localization ($r = 0.35$ and 0.40 , respectively) was observed with LysoTracker[®] (**Figure S13**, Supporting Information). These results confirm that $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ preferentially accumulates in the mitochondria even when encapsulated in the HA-PLGA NPs. This is of special interest due to the key role that mitochondria plays in the cells including ATP generation, regulation of cell proliferation and apoptosis [64]. In this context, several studies have confirmed the enhancement of apoptosis by mitochondria-targeted PDT through photoinactivation of antiapoptotic proteins (Bcl2 and Bcl-xL) [65,66], thus underlining the promising potential of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ as PDT agent.

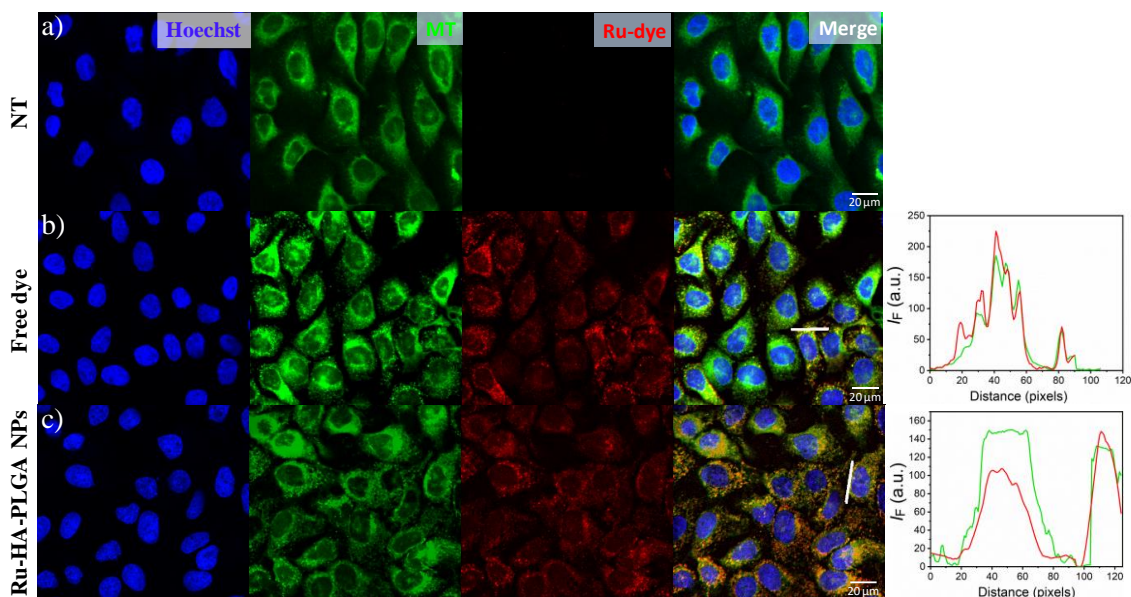


Figure 4. Confocal microscopy analysis of subcellular localization of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ dye and Ru-HA-PLGA NPs in TR146 cells. **a)** Non-treated TR146 cells (NT); **b)** TR146 cells treated with the $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($0.25 \mu\text{mol L}^{-1}$); **c)** TR146 cells treated with Ru-HA-PLGA NPs ($1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ equivalent). Right: Fluorescence intensity profile plots were generated to study colocalization along the white line on the merged images. Nuclear staining (Hoechst) (blue); Mitochondria staining (green); $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ (red). Incubation time, 24 h; scale bar, 20 μm .

3.5. (Photo)cytotoxicity of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ and Ru-HA-PLGA NPs

The *in vitro* dark cytotoxicity of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ and Ru-HA-PLGA NPs was firstly evaluated on TR146 cells. **Figure 5a** shows the cell viability with increasing concentrations of free $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ and Ru-HA-PLGA NPs, as determined by the MTT cell viability assay. Ru-HA-PLGA NPs displayed a significantly lower cytotoxicity throughout the investigated concentration range with 12 h incubation of incubation. IC_{50} values of $(0.65 \pm 0.14) \mu\text{mol L}^{-1}$ and $(2.7 \pm 0.3) \mu\text{mol L}^{-1}$ (Ru) were measured in the dark for $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ and the Ru-HA-PLGA NPs, respectively. These values are lower than those observed under similar conditions for other Ru(II) polypyridyl complexes, for which typical IC_{50} values in the range of 10 to $>100 \mu\text{mol L}^{-1}$ have been reported [67,68]. The higher dark toxicity of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ might be attributed to the biimidazole ligand, that has been shown to confer cytotoxicity due to the metal complexes [21,22,26]. The lower toxicity of the Ru-HA-PLGA NPs suggests improved biocompatibility when encapsulated into the hydrophobic core of the PLGA-HA formulation. It can therefore be concluded that the encapsulation in HA-PLGA NPs increases the stability of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$, enhancing its circulation time and releasing it specifically in the tumor microenvironment by the action of HASE, thereby significantly reducing off target effects.

The viability was dramatically reduced when the TR146 cells incubated with the free and NP-encapsulated photosensitizer were irradiated with blue light (470 nm) at radiant energy

fluences ranging from 2.5 to 50 J cm⁻² (**Figure 5b**). No significant toxicity was detected when the TR146 cells were exposed to the highest light dose in the absence of the photosensitizer. A significant reduction in cell viability ($P < 0.0001$) was observed even when the lowest fluence (2.5 J cm⁻²) was applied. Interestingly, when a 50 J cm⁻² fluence was used, a (93 ± 2)% reduction in cell viability was measured, underlying the photoactivity of the photosensitizer and its nanoformulation. The notable phototoxicity of [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ and the Ru-HA-PLGA NPs might be attributed to their accumulation in the mitochondria and its mode of action by combined Type I/Type II mechanisms. This fact allows us to work at sub-μM photosensitizer concentration, a value 10- to 100-fold lower than those of other Ru(II) polypyridyl complexes reported in the literature [68,69]. Our findings suggest that the encapsulation of [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ in the HA-PLGA NPs not only improves the water solubility of the hydrophobic photosensitizer, but also facilitates its accumulation in the tumor cells potentially enhancing its selectivity.

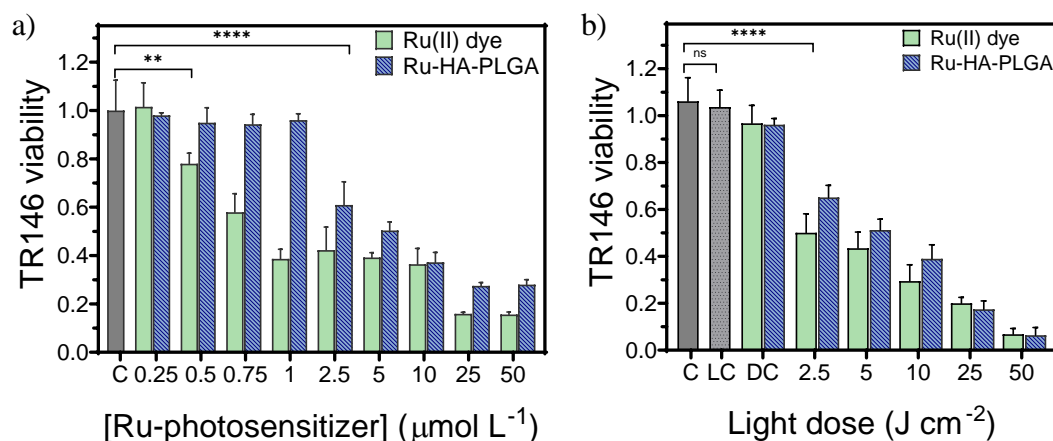


Figure 5. a) Relative viability of TR146 cells treated with different doses of [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ or Ru-HA-PLGA NPs in the dark. Data are presented as mean ± S.D ($n \geq 3$), analyzed using one-way ANOVA. P-values < 0.05 were considered to be significant and are indicated by asterisks as follows: nsP > 0.05, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001. b) Phototoxicity of the non-encapsulated (0.25 μmol L⁻¹) and encapsulated (1.0 μmol L⁻¹) photosensitizer on TR146 cells upon irradiation with different radiant energy fluences (470 nm LED, 70 mW/cm²). Cell viability was evaluated by the MTT assay at 24 h after irradiation. Data are presented as mean ± S.D ($n \geq 3$), analyzed using one-way ANOVA. P-values < 0.05 were considered to be significant and are indicated by asterisks as follows: nsP > 0.05, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001.

4. Conclusions

A novel ruthenium(II) complex containing 2,2'-biimidazole and tetramethylated phenanthroline was synthesized as a potential PDT agent for oral cancer management. This complex has the uncommon ability to simultaneously photosensitize the generation of $^1\text{O}_2$ and $\text{O}_2^{\bullet-}$ reactive oxygen species, through type I and II PDT, upon blue light irradiation, highlighting its utility as a photosensitizing agent in hypoxic tumor microenvironments. Superoxide generation is a consequence of the π -rich character of the bim ligand, that raises the HOMO of the photoexcited dye promoting electron transfer to nearby O_2 . The high lipophilicity of the cationic photosensitizer leads to an increased intracellular uptake as studied in TR146 oral cancer cells, with preferential accumulation in the mitochondria. The uptake selectivity could be further improved by encapsulating the Ru(II) dye into hyaluronic acid–poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles targeting the overexpressed hyaluronic acid receptors (CD44) in different tumor types. The encapsulation was successfully achieved without loss of the photodynamic activity of the photosensitizer. Furthermore, the release of the encapsulated PS was facilitated by the action of hyaluronidase, an enzyme overexpressed by many cancer cells. Following its release, the photosensitizer localized in the mitochondria and its phototoxicity was found to be comparable to the free complex. Although, the biimidazole moiety confers $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ a higher dark toxicity as compared to the related Ru(II) polypyridyl photosensitizers reported in literature [67–69], its encapsulation in hyaluronic acid–poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles significantly reduced its dark toxicity while providing the selectivity necessary to target tumor cells. These features, together with its high phototoxicity under blue light, call for further investigations on the photodynamic activity of new Ru(II)-bim complexes on different cancer cell lines and photodisinfection procedures.

Acknowledgments

This work was supported by grants from U.S. National Institutes of Health (NIH), UH2CA189901 and UH3CA189901, P01CA084203 and R01CA231606 to TH. This work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (grant RTI2018-096410-B-C22). J. Q.-A. thanks the Ministry for an F.P.I. doctoral grant. We thank Prof. S. Campuzano and Prof. M. Pedrero (Dpmt. of Analytical Chemistry, UCM) for their help with the electrochemical measurements in their equipment.

REFERENCES

- [1] Obaid G, Broekgaarden M, Bulin A.L, Huang H.C, Kuriakose J, Liu J, Hasan T, Photonanomedicine: A convergence of photodynamic therapy and nanotechnology, *Nanoscale* **2016**, 8, 12471–12503. <https://doi.org/10.1039/c5nr08691d>.
- [2] De Silva P, Saad M.A, Thomsen H.C, Bano S, Ashraf S, Hasan T, Photodynamic therapy, priming and optical imaging: Potential co-conspirators in treatment design and optimization, *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2020**, 24, 1320–1360. <https://doi.org/10.1142/S1088424620300098>.
- [3] Tonon C.C, Ashraf S, Quilez-Albuquerque J, de Souza Rastelli A.N, Hasan T, Lyons A.M, Greer A, Antimicrobial photodynamic inactivation using topical and superhydrophobic sensitizer techniques: A perspective from diffusion in biofilms, *Photochem. Photobiol.*, **2021**, 97, 1266–1277. <https://doi.org/10.1111/php.13461>
- [4] Wiehe A, O'brien J.M, Senge M.O, Trends and targets in antiviral phototherapy, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2019**, 18, 2565–2612. <https://doi.org/10.1039/c9pp00211a>.
- [5] Brown J.M, Wilson W.R, Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 437–447. <https://doi.org/10.1038/nrc1367>.
- [6] Mallidi S, Watanabe K, Timerman D, Schoenfeld D, Hasan T, Prediction of tumor recurrence and therapy monitoring using ultrasound-guided photoacoustic imaging, *Theranostics* **2015**, 5, 289–301. <https://doi.org/10.7150/thno.10155>.
- [7] Li M, Shao Y, Kim J.H, Pu Z, Zhao X, Huang H, Xiong T, Kang Y, Li G, Shao K, Fan J, Foley J.W, Kim J.S, Peng X, Unimolecular photodynamic O₂-economizer to overcome hypoxia resistance in phototherapeutics, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142, 5380–5388. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c00734>.
- [8] Li M, Xiong T, Du J, Tian R, Xiao M, Guo L, Long S, Fan J, Sun W, Shao K, Song X, Foley J.W, Peng X., Superoxide radical photogenerator with amplification effect: surmounting the achilles' heels of photodynamic oncotherapy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, 141, 2695–2702. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b13141>.
- [9] Soares H.T, Campos J.R.S, Gomes-Da-Silva L.C, Schaberle F.A, Dabrowski J.M, Arnaut L.G, Pro-oxidant and antioxidant effects in photodynamic therapy: cells recognise that not all exogenous ros are alike, *ChemBioChem.*, **2016**, 17, 836–842. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500573>.
- [10] Zhang K, Yu Z, Meng X, Zhao W, Shi Z, Yang Z, Dong H, Zhang X, A bacteriochlorin-based metal-organic framework nanosheet superoxide radical generator for photoacoustic imaging-guided highly efficient photodynamic therapy, *Adv. Sci.*, **2019**, 6, 1–9. <https://doi.org/10.1002/advs.201900530>.
- [11] McKenzie L.K, Bryant H.E, Weinstein J.A, Transition metal complexes as photosensitisers in one- and two-photon photodynamic therapy, *Coord. Chem. Rev.*, **2019**, 379, 2–29. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.020>.
- [12] Monroe S, Colón K.L, Yin H, Roque J, Konda P, Gujar S, Thummel R.P, Lilge L, Cameron C.G, McFarland S.A, Transition metal complexes and photodynamic therapy from a tumor-centered approach: challenges, opportunities, and highlights from the development of TLD1433, *Chem. Rev.*, **2019**, 119, 797–828. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00211.F>.
- [13] Lo P.C, Rodríguez-Morgade M.S, Pandey R.K, Ng D.K.P, Torres T, Dumoulin F, The

- unique features and promises of phtalocyanines as advanced photosensitizers for photodynamic therapy of cancer, *Chem. Soc. Rev.*, **2020**, *49*, 1041–1056. <https://doi.org/10.1039/c9cs00129h>.
- [14] Heinemann F, Karges J, Gasser G, Critical overview of the use of Ru(II) polypyridyl complexes as photosensitizers in one-photon and two-photon photodynamic therapy, *Acc. Chem. Res.*, **2017**, *50*, 2727–2736. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00180>.
- [15] Poynton F.E, Bright S.A, Blasco S, Williams D.C, Kelly J.M, Gunnlaugsson T, The development of ruthenium(II) polypyridyl complexes and conjugates for: In vitro cellular and in vivo applications, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, *46*, 7706–7756. <https://doi.org/10.1039/c7cs00680b>.
- [16] Anderson E.B, Long T.E, Imidazole- and imidazolium-containing polymers for biology and material science applications, *Polymer* **2010**, *51*, 2447–2454. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.02.006>.
- [17] Haegler P, Joerin L, Krähenbühl S, Bouitbir J, Hepatocellular toxicity of imidazole and triazole antimycotic agents, *Toxicol. Sci.*, **2017**, *157*, 183–195. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx029>.
- [18] Sharma D, Narasimhan B, Kumar P, Judge V, Narang R, De Clercq E, Balzarini J, Synthesis, antimicrobial and antiviral evaluation of substituted imidazole derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*, 2347–2353. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.08.010>.
- [19] Hu M.H, Yu B.Y, Wang X, Jin G, Drug-like biimidazole derivatives dually target c-MYC/BCL-2 G-quadruplexes and inhibit acute myeloid leukemia, *Bioorg. Chem.*, **2020**, *104*104264–104272. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104264>.
- [20] Bergamo A, Sava G, Ruthenium anticancer compounds: Myths and realities of the emerging metal-based drugs, *Dalton Trans.*, **2011**, *40*, 7817–7823. <https://doi.org/10.1039/c0dt01816c>.
- [21] Mital M, Ziora Z, Biological applications of Ru(II) polypyridyl complexes, *Coord. Chem. Rev.*, **2018**, *375*, 434–458. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.02.013>.
- [22] Liu Y, Chen T, Liu J, Wong Y.S, Identification of fluorescent ruthenium complexes containing imidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers by living cell real-time imaging, *MedChemCom* **2013**, *4*, 865–869. <https://doi.org/10.1039/c3md20237b>.
- [23] Rommel S.A, Sorsche D, Fleischmann M, Rau S, Optical sensing of anions via supramolecular recognition with biimidazole complexes, *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, 18101–18119. <https://doi.org/10.1002/chem.201605782>.
- [24] Chen M.H, Zheng Y, Cai X.J, Zhang H, Wang F.X, Tan C.P, Chen W.H, Ji L.N, Mao Z.W, Inhibition of autophagic flux by cyclometalated Iridium(III) complexes through anion transportation, *Chem. Sci.*, **2019**, *10*, 3315–3323. <https://doi.org/10.1039/C8SC04520H>.
- [25] Yu H.-J, Hao Z.-F, Peng H.-L, Rao R.-H, Sun M, Ross A.W, Ran C, Chao H, Yu L, Near-infrared lysosome pH tracker and naked-eye colorimetric nucleic acids sensor based on ruthenium complexes [Ru(bim)₂(dppz)]²⁺ and [Ru(bim)₂(pip)]²⁺, *Sens. Actuators B: Chem.*, **2017**, *252*, 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.05.164>.
- [26] Xia Y, Chen Q, Qin X, Sun D, Zhang J, Liu J, Studies of Ruthenium(II)-2,2'-bisimidazole complexes on binding to G-quadruplex DNA and inducing apoptosis in HeLa cells, *New J. Chem.*, **2013**, *37*, 3706–3715. <https://doi.org/10.1039/c3nj00542a>.

- [27] Ouyang M, Zeng L, Qiu K, Chen Y, Ji L, Chao H, Cyclometalated Ir^{III} Complexes as Mitochondria-Targeted Photodynamic Anticancer Agents, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2017**, 1764–1771. <https://doi.org/10.1002/ejic.201601129>.
- [28] Orellana G, Quiroga M.L, De Dios C, Spectroscopy, electrochemistry, and photochemistry of Ruthenium(II) complexes containing five-membered heterocyclic chelating ligands, *Trends Inorg. Chem.*, **1993**, 3, 109–130.
- [29] Lv Z, Wei H, Li Q, Su X, Liu S, Zhang K.Y, Lv W, Zhao Q, Li X, Huang W, Achieving efficient photodynamic therapy under both normoxia and hypoxia using cyclometalated Ru(II) photosensitizer through type I photochemical process, *Chem. Sci.*, **2018**, 9, 502–512. <https://doi.org/10.1039/c7sc03765a>.
- [30] Wang Y.Y, Liu Y.C, Sun H, Guo D.S, Type I photodynamic therapy by organic–inorganic hybrid materials: From strategies to applications, *Coord. Chem. Rev.*, **2019**, 395, 46–62. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.05.016>.
- [31] Du J, Shi T, Long S, Chen P, Sun W, Fan J, Peng X, Enhanced photodynamic therapy for overcoming tumor hypoxia: From microenvironment regulation to photosensitizer innovation, *Coord. Chem. Rev.*, **2021**, 427, 213604–213621. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213604>.
- [32] Lucky S.S, Soo K.C, Zhang Y, Nanoparticles in photodynamic therapy, *Chem. Rev.*, **2015**, 115, 1990–2042. <https://doi.org/10.1021/cr5004198>.
- [33] Tripodo G, Trapani A, Torre M.L, Giammona G, Trapani G, Mandracchia D, Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2015**, 97, 400–416. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.032>.
- [34] Huang G, Huang H, Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery, *Drug Deliv.*, **2018**, 25, 766–772. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1450910>.
- [35] Collins M.N, Birkinshaw C, Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review, *Carbohydr. Polym.*, **2013**, 92, 1262–1279. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>.
- [36] Misra S, Hascall V.C, Markwald R.R, Ghatak S, Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer, *Front. Immunol.*, **2015**, 6, 1–31. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00201>.
- [37] Huang G, Huang H, Hyaluronic acid-based biopharmaceutical delivery and tumor-targeted drug delivery system, *J. Control. Release.*, **2018**, 278, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.015>.
- [38] Dosio F, Arpicco S, Stella B, Fattal E, Hyaluronic acid for anticancer drug and nucleic acid delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2016**, 97, 204–236. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.011>.
- [39] Choi K.Y, Min K.H, Na J.H, Choi K, Kim K, Park J.H, Kwon I.C, Jeong S.Y, Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential drug carrier for cancer therapy: Synthesis, characterization, and in vivo biodistribution, *J. Mater. Chem.*, **2009**, 19, 4102–4107. <https://doi.org/10.1039/b900456d>.
- [40] Saneja A, Arora D, Kumar R, Dubey R.D, Panda A.K, Gupta P.N, CD44 targeted PLGA nanomedicines for cancer chemotherapy, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, 121, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.05.012>.

- [41] Choi K.Y, Yoon H.Y, Kim J.H, Bae S.M, Park R.W, Kang Y.M, Kim I.S, Kwon I.C, Choi K, Jeong S.Y, Kim K, Park J.H, Smart nanocarrier based on PEGylated hyaluronic acid for cancer therapy, *ACS Nano* **2011**, *5*, 8591–8599. <https://doi.org/10.1021/nn202070n>.
- [42] Li W, Zheng C, Pan Z, Chen C, Hu D, Gao G, Kang S, Cui H, Gong P, Cai L, Smart hyaluronidase-activated theranostic micelles for dual-modal imaging guided photodynamic therapy, *Biomaterials* **2016**, *101*, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.019>.
- [43] Gao S, Wang J, Tian R, Wang G, Zhang L, Li Y, Li L, Ma Q, Zhu L, Construction and evaluation of a targeted hyaluronic acid nanoparticle/photosensitizer complex for cancer photodynamic therapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 32509–32519. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b09331>.
- [44] Buhren B.A, Schrupf H, Hoff N.P, Bölke E, Hilton S, Gerber P.A, Hyaluronidase: From clinical applications to molecular and cellular mechanisms, *Eur. J. Med. Res.*, **2016**, *21*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40001-016-0201-5>.
- [45] Villemin E, Ong Y.C, Thomas C.M, Gasser G, Polymer encapsulation of ruthenium complexes for biological and medicinal applications, *Nat. Rev. Chem.*, **2019**, *3*, 261–282. <https://doi.org/10.1038/s41570-019-0088-0>.
- [46] Johnson E.C, Sullivan B.P, Salmon D.J, Adeyemi S.A, Meyer T.J, Synthesis and properties of the chloro-bridged dimer [(bpy)₂RuCl]₂²⁺ and its transient 3+ mixed-valence ion, *Inorg. Chem.*, **1978**, *17*, 2211–2215. <https://doi.org/10.1021/ic50186a038>.
- [47] Schmidta R, Tanielian C, Dunsbach R, Womb C, Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O₂ (¹Δ_g) sensitization, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **1994**, *79*, 11–17.
- [48] García-Fresnadillo D, Georgiadou Y, Orellana G, Braun A.M, Oliveros E, Singlet-oxygen (¹Δ_g) production by ruthenium(II) complexes containing polyazaheterocyclic ligands in methanol and in water, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1222–1238. <https://doi.org/10.1002/hlca.19960790428>.
- [49] Debowska K, Debski D, Hardy M, Jakubowska M, Kalyanaraman B, Marcinek A, Michalski R, Michalowski B, Ouari O, Sikora A, Smulik R, Zielonka J, Toward selective detection of reactive oxygen and nitrogen species with the use of fluorogenic probes - Limitations, progress, and perspectives, *Pharmacol. Reports* **2015**, *67*, 756–764. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.03.016>.
- [50] Huang J, Zhang H, Yu Y, Chen Y, Wang D, Zhang G, Zhou G, Liu J, Sun Z, Sun D, Lu Y, Zhong Y, Biodegradable self-assembled nanoparticles of poly(D,L-lactide-co-glycolide)/hyaluronic acid block copolymers for target delivery of docetaxel to breast cancer, *Biomaterials* **2014**, *35*, 550–566. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.089>.
- [51] Saad M.A, Xavierselvan M, H. Sharif A, Selfridge S, Pawle R, Varvares M, Mallidi S, Hasan T, Dual function antibody conjugates for multimodal imaging and photoimmunotherapy of cancer cells, *Photochem. Photobiol.* **2021**, <https://doi.org/10.1111/php.13501>
- [52] Puckett C.A, Barton J.K, Methods to explore cellular uptake of ruthenium complexes, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 46–47. <https://doi.org/10.1021/ja0677564>.
- [53] Komatsu H, Yoshihara K, Yamada H, Kimura Y, Son A, Nishimoto S.I, Tanabe K,

- Ruthenium complexes with hydrophobic ligands that are key factors for the optical imaging of physiological hypoxia, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 1971–1977. <https://doi.org/10.1002/chem.201202809>.
- [54] Nonell S, Flors C, in: Nonell S, Flors C, (Eds.), *Steady-State and Time-Resolved Singlet Oxygen Phosphorescence Detection in the Near-IR*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **2016**, pp 7–26. <https://doi.org/10.1039/9781782626992-00007>
- [55] Chen J, Rogers S.C, Kavdia M, Analysis of kinetics of dihydroethidium fluorescence with superoxide using xanthine oxidase and hypoxanthine assay, *Ann. Biomed. Eng.*, **2013**, *41*, 327–337. <https://doi.org/10.1007/s10439-012-0653-x>.
- [56] Michalski R, Michalowski B, Sikora A, Zielonka J, Kalyanaraman B, On the use of fluorescence lifetime imaging and dihydroethidium to detect superoxide in intact animals and ex vivo tissues: A reassessment, *Free Radic. Biol. Med.*, **2014**, *67*, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.816>.
- [57] Clément J.L, Ferré N, Siri D, Karoui H, Rockenbauer A, Tordo P, Assignment of the EPR spectrum of 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) superoxide spin adduct, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 1198–1203. <https://doi.org/10.1021/jo048518z>.
- [58] Saad M.A, Ch M. R, Condition responsive nanoparticles for managing infection and inflammation in keratitis, *Nanoscale*, **2017**, *9*, 9946–9959. <https://doi.org/10.1039/C7NR00922D>
- [59] Cu Y, Saltzman M, Controlled surface modification with poly(ethylene)glycol enhances diffusion of PLGA nanoparticles in human cervical mucus, *Mol. Pharmaceutics* **2009**, *6*, 173–181. <https://doi.org/10.1021/mp8001254>
- [60] Uthaman S, Mathew A.P, Park H.J, B. Lee Il, Kim H.S, Huh K.M, Park I.R, IR 780-loaded hyaluronic acid micelles for enhanced tumor-targeted photothermal therapy, *Carbohydr. Polym.*, **2018**, *181*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.033>.
- [61] Mitra K, Samsó M, Lyons C.E, Hartman M.C.T, Hyaluronic acid grafted nanoparticles of a platinum(II)-silicon(IV) phthalocyanine conjugate for tumor and mitochondria-targeted photodynamic therapy in red light, *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 7373–7377. <https://doi.org/10.1039/C8TB02533A>.
- [62] Bayer I.S, Hyaluronic acid and controlled release: a review, *Molecules* **2020**, *25*, 2649–2687. <https://doi.org/10.3390/molecules25112649>.
- [63] Pierroz V, Joshi T, Leonidova A, Mari C, Schur J, Ott I, Spiccia L, Ferrari S, Gasser G, Molecular and cellular characterization of the biological effects of ruthenium(II) complexes incorporating 2-pyridyl-2-pyrimidine-4-carboxylic acid, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 20376–20387. <https://doi.org/10.1021/ja307288s>.
- [64] Wang X, Peralta S, Moraes C.T, in: Kenneth D. Tew, Paul B. Fisher (Eds.), *Mitochondrial alterations during carcinogenesis: A review of metabolic transformation and targets for anticancer treatments*, Academic Press, **2013**. pp. 127–160. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407190-2.00004-6>.
- [65] Xu J, Zeng F, Wu H, Hu C, Wu S, Enhanced photodynamic efficiency achieved via a dual-targeted strategy based on photosensitizer/micelle structure, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 4249–4259. <https://doi.org/10.1021/bm501270e>.
- [66] Mahalingam S.M, Ordaz J.D, Low P.S, Targeting of a photosensitizer to the mitochondrion enhances the potency of photodynamic therapy, *ACS Omega* **2018**, *3*, 6066–6074. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00692>.

- [67] Estalayo-Adrián S, Blasco S, Bright S.A, McManus G.J, Orellana G, Williams D.C, Kelly J.M, Gunnlaugsson T, Water-soluble amphiphilic ruthenium(II) polypyridyl complexes as potential light-activated therapeutic agents, *Chem. Comm.*, **2020**, *56*, 9332–9335. <https://doi.org/10.1039/d0cc04397d>.
- [68] Karges J, Heinemann F, Jakubaszek M, Maschietto F, Subecz C, Dotou M, R, Blacque O, Tharaud M, Goud B, Viñuelas Zahínos E, Spingler B, Ciofini I, Gasser G, Rationally designed long-wavelength absorbing Ru(II) polypyridyl complexes as photosensitizers for photodynamic therapy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*, 6578–6587. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b13620>.
- [69] Karges J, Heinemann F, Maschietto F, Patra M, Blacque O, Ciofini I, Spingler B, Gasser G, A Ru(II) polypyridyl complex bearing aldehyde functions as a versatile synthetic precursor for long-wavelength absorbing photodynamic therapy photosensitizers, *Bioorganic Med. Chem.*, **2019**, *27*, 2666–2675. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.05.011>.

Supporting Information

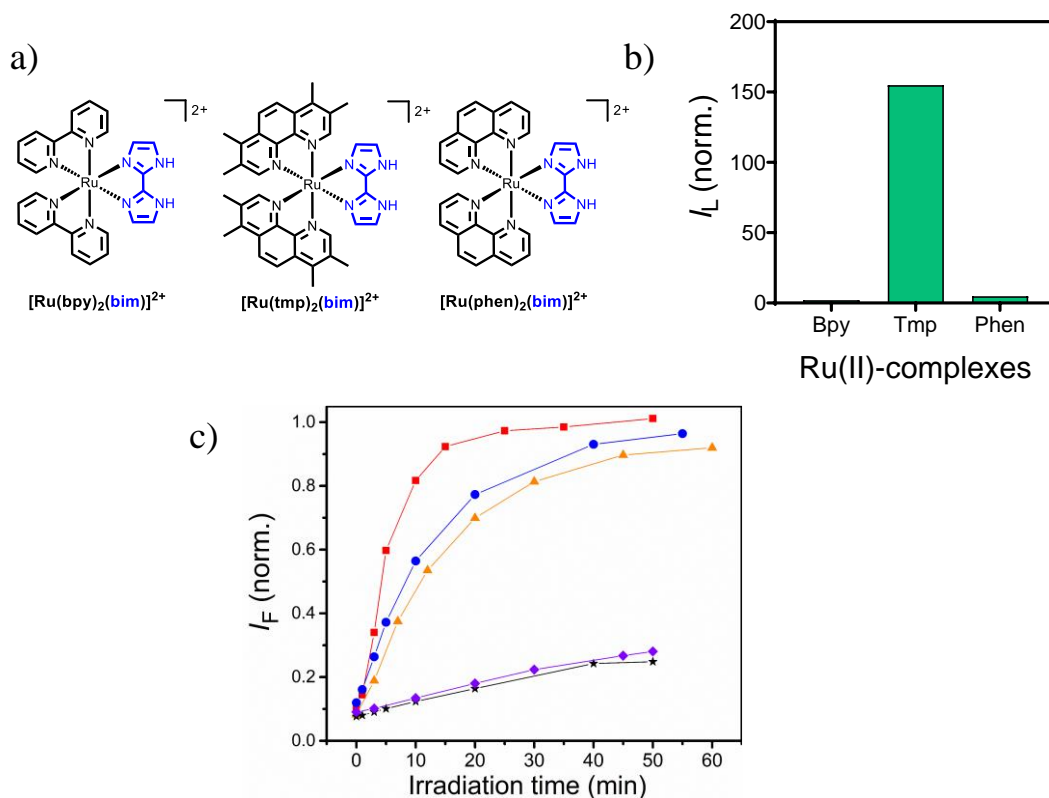


Figure S1. a) Chemical structures of Ru(II)-bim complexes including the novel $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ dye. b) FACS analysis of TR146 cells treated with Ru(II)-bim complexes ($0.25 \mu\text{mol L}^{-1}$) for 24 h. Luminescence values are normalized to the non-treated control for the respective points. c) Evolution of the fluorescence intensity of HOE⁺ at 608 nm upon irradiation with a 405-nm diode laser of the air-equilibrated DHE solution alone (black stars), and in the presence of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (blue circles) $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ (red squares) and $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ (orange triangles). The absorption of all the sensitizers were matched at 405 nm to 0.05. The violet diamonds depict the same experiment performed in the presence of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ but deoxygenating the solution with Ar before the irradiation.

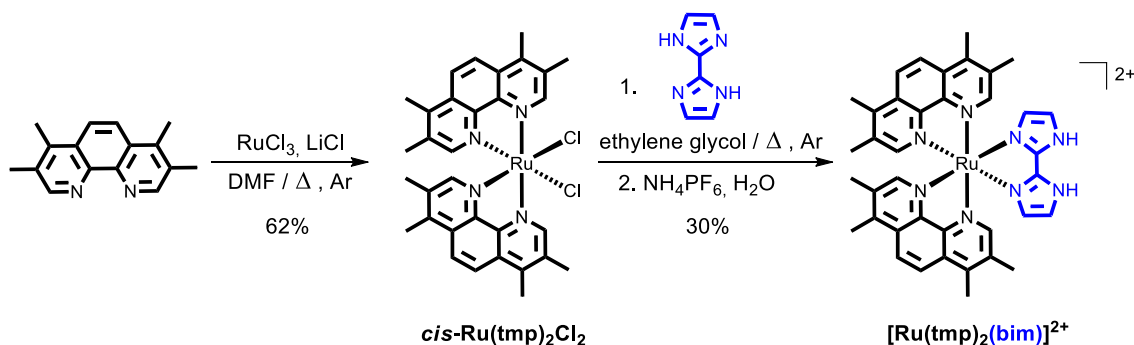


Figure S2. Synthesis of the photoactive $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ complex.

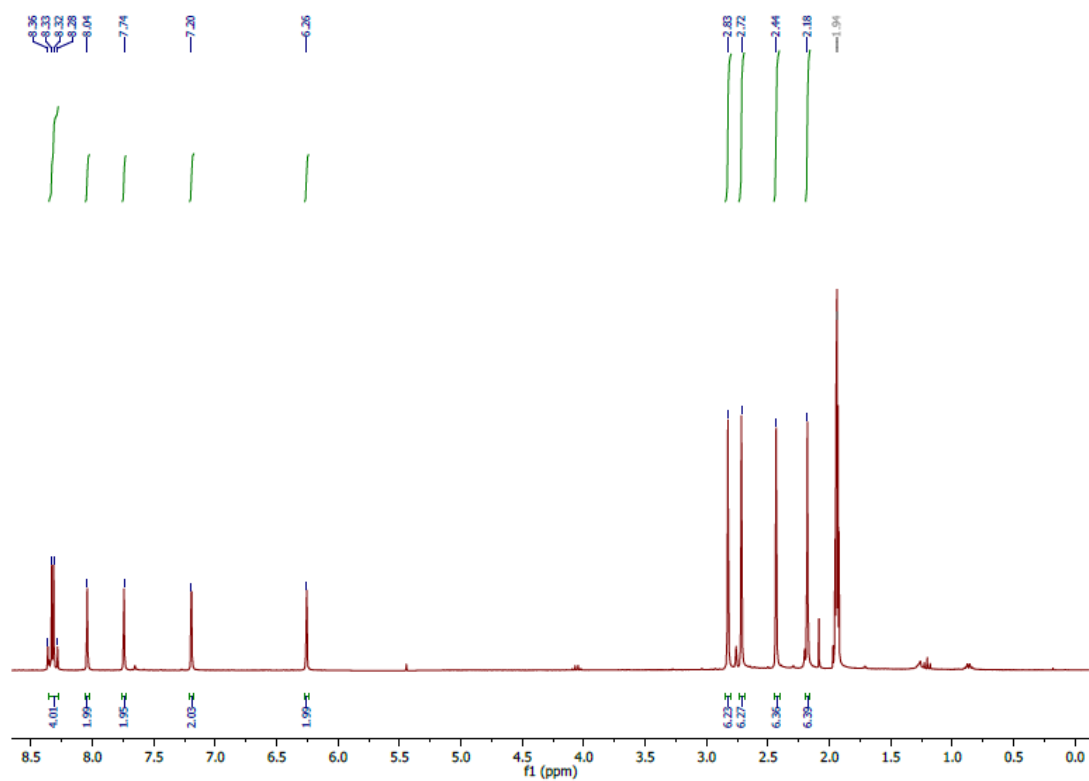


Figure S3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})](\text{PF}_6)_2$ in CD_3CN (300 MHz).

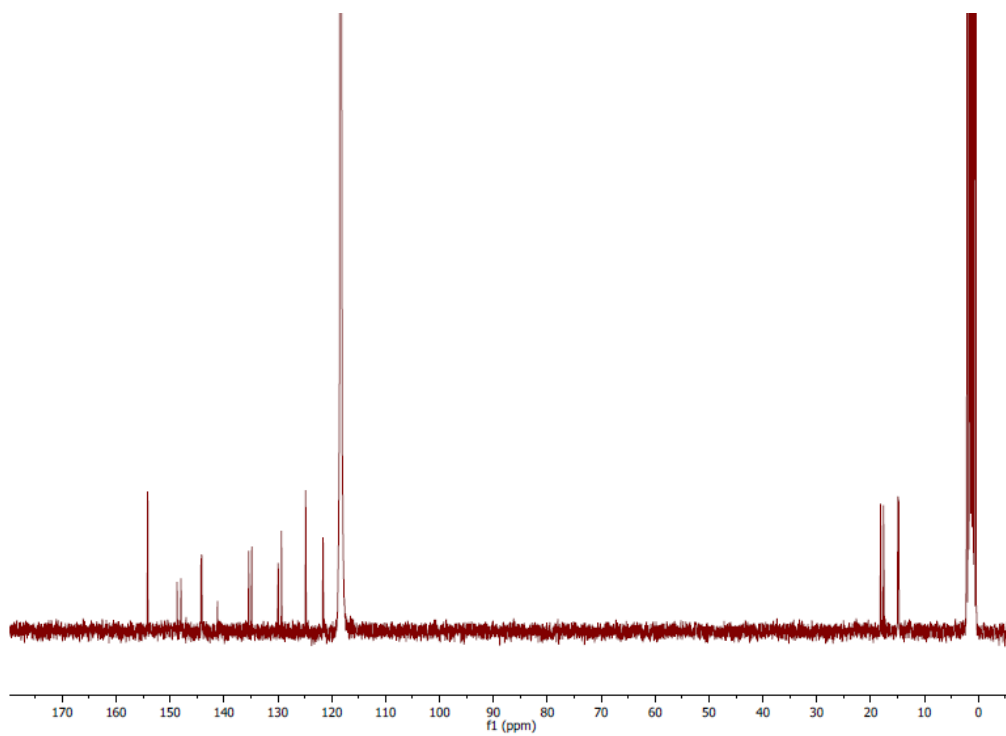


Figure S4. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})](\text{PF}_6)_2$ in CD_3CN (300 MHz).

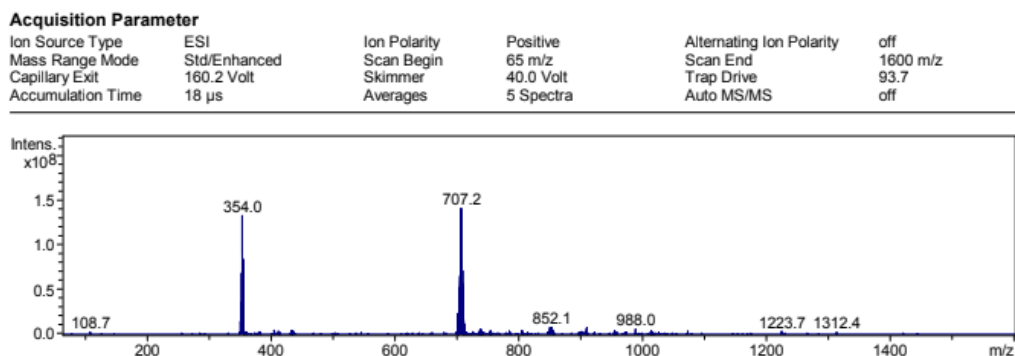


Figure S5. Mass spectrum of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})](\text{PF}_6)_2$ recorded in MeOH by electrospray ionization in positive detection mode; $[\text{M}]^+$ calculated for $[\text{C}_{42}\text{H}_{37}\text{N}_8\text{O}_8\text{Ru}]^+$, 707.2; found, 707.2; $[\text{M}]^{2+}$ calculated for $[\text{C}_{42}\text{H}_{38}\text{N}_8\text{O}_8\text{Ru}]^{2+}$, 354.1; found, 354.0.

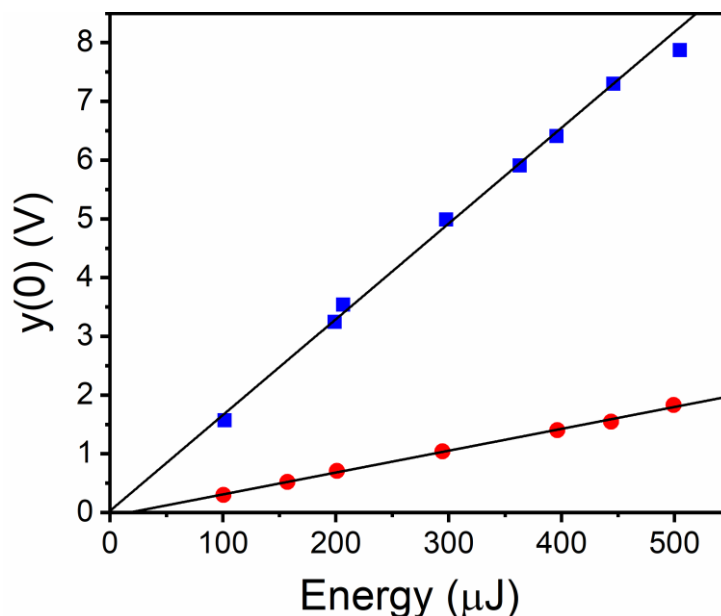


Figure S6. Plot of the singlet oxygen luminescence signal at 1265 nm at the end of the laser pulse (V) of the Figure 1a decay profiles ($\tau = 77 \pm 3 \mu\text{s}$) as a function of the laser pulse energy (μJ), and best fit of the linear region data ($r^2 > 0.998$) for the reference photosensitizer RD3 (blue squares) and $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ (red circles) in air-equilibrated acetonitrile.

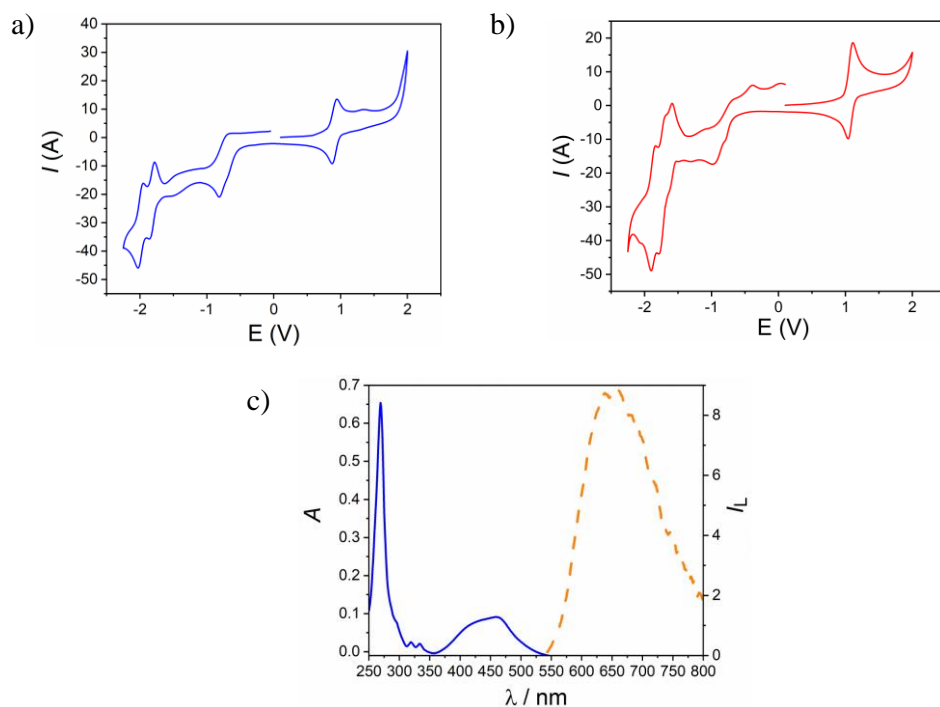


Figure S7. Voltamperometric plot of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ (a) and $[\text{Ru}(\text{tmp})_3]^{2+}$ (b) in dry MeCN recorded with a scan rate of 50 mV s^{-1} (Ag/AgCl reference electrode; V vs NHE). b) Absorption and luminescence spectra of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ in MeCN ($9.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$).

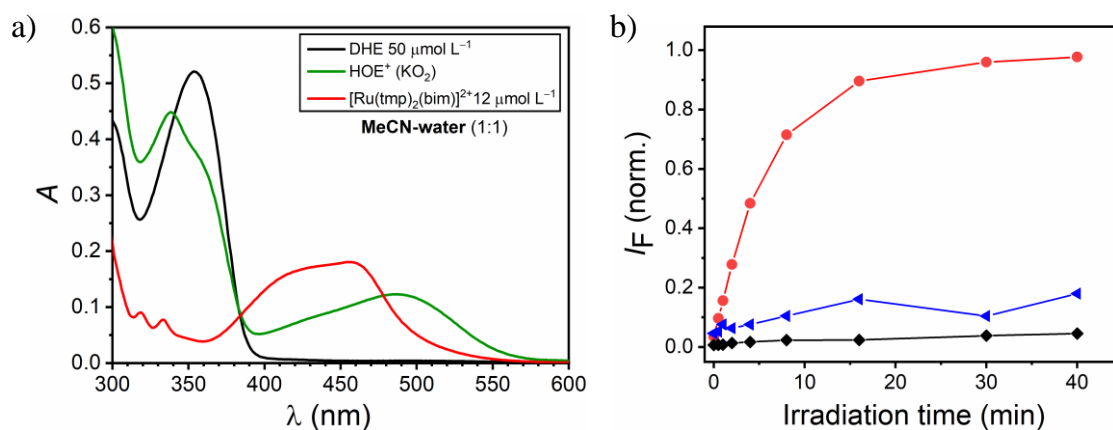


Figure S8. a) UV-VIS absorption spectra in 1:1 (v/v) MeCN–water of dihydroethidium (DHE) ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$, solid black line), $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($12 \mu\text{mol L}^{-1}$, solid red line), and of the hydroxyethidium (HOE^+) formed by treatment of DHE with excess of potassium superoxide (solid green line). b) Evolution of the fluorescence intensity of HOE^+ at 608 nm upon irradiation with a 405-nm diode laser of the air-equilibrated DHE solution alone (black squares), and in the presence of $9.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ (red circles). The blue triangles depict the same experiment performed in the presence of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ but deoxygenating the solution with Ar before the irradiation.

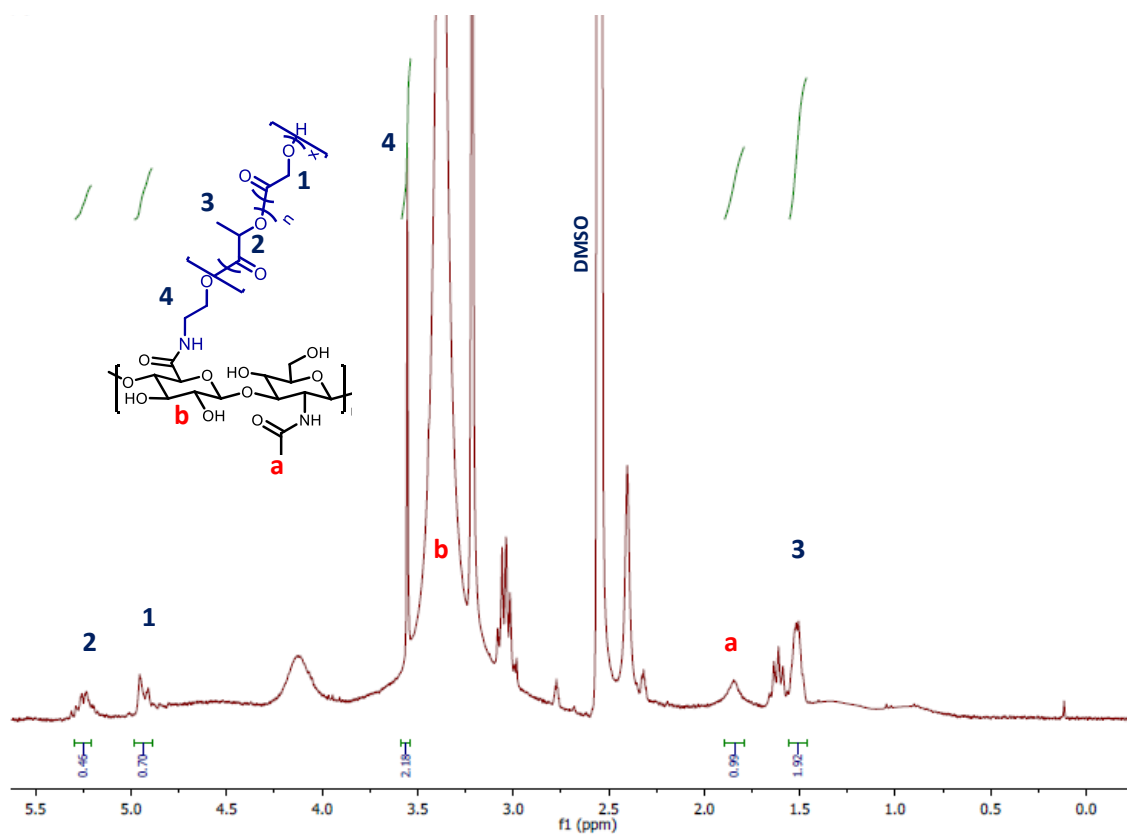


Figure S9. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of HA-PLGA in DMSO-d_6 (300 MHz).

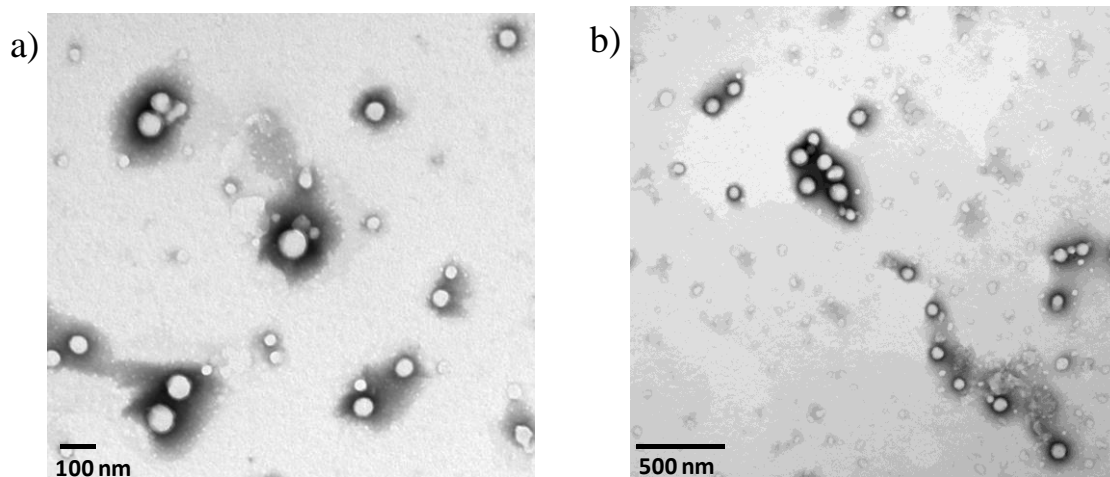


Figure S10. TEM images of a) HA-PLGA NPs and b) Ru-HA-PLGA NPs.

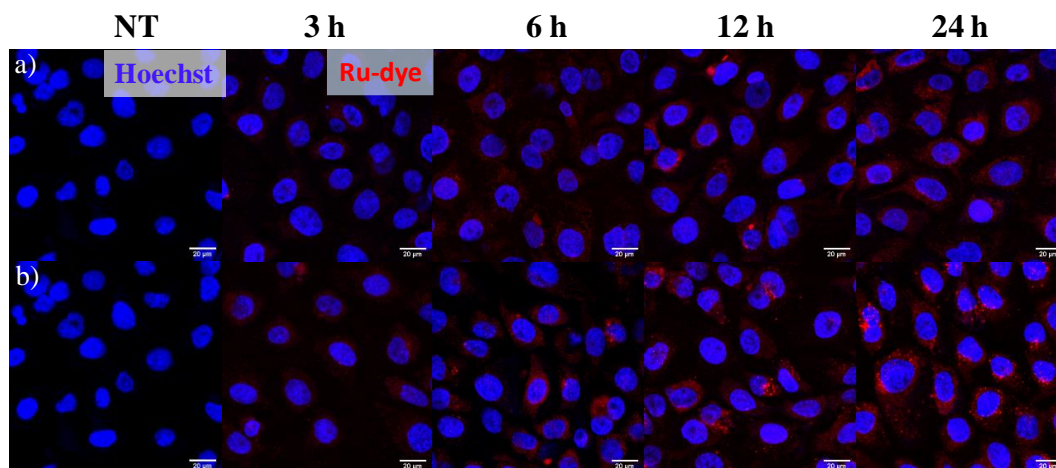


Figure S11. Confocal fluorescence microscopy images of TR146 cells treated with a) [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ (0.25 μmol L⁻¹) and b) Ru-HA-PLGA NPs (1.0 μmol L⁻¹ [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ equivalent) for different incubation times. The nucleus is stained Hoechst (pseudo-colored as blue). Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ fluorescence is pseudo-colored as red (NT: non-treated). Scale bar corresponds to 20 μm.

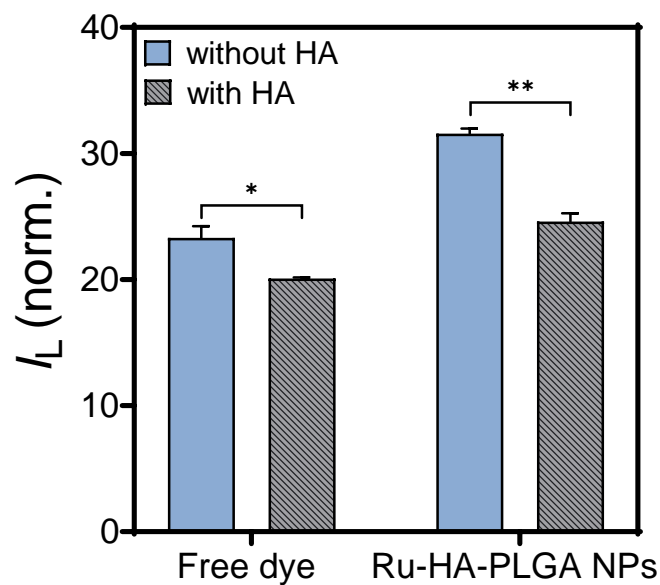


Figure S12. Quantitative analysis of the HA competitive assay in TR146 cells by FACS analysis. [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ (0.25 μmol L⁻¹), Ru-HA-PLGA NPs (1.0 μmol L⁻¹ [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ equivalent) and HA (5 mg mL⁻¹). Data are presented as mean ± S.D. ($n \geq 3$), analyzed using two-tailed T test. P-values < 0.05 were considered to be significant and are indicated by asterisks as follows: nsP > 0.05, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001. (Luminescence values are normalized to the non-treated control for the respective points).

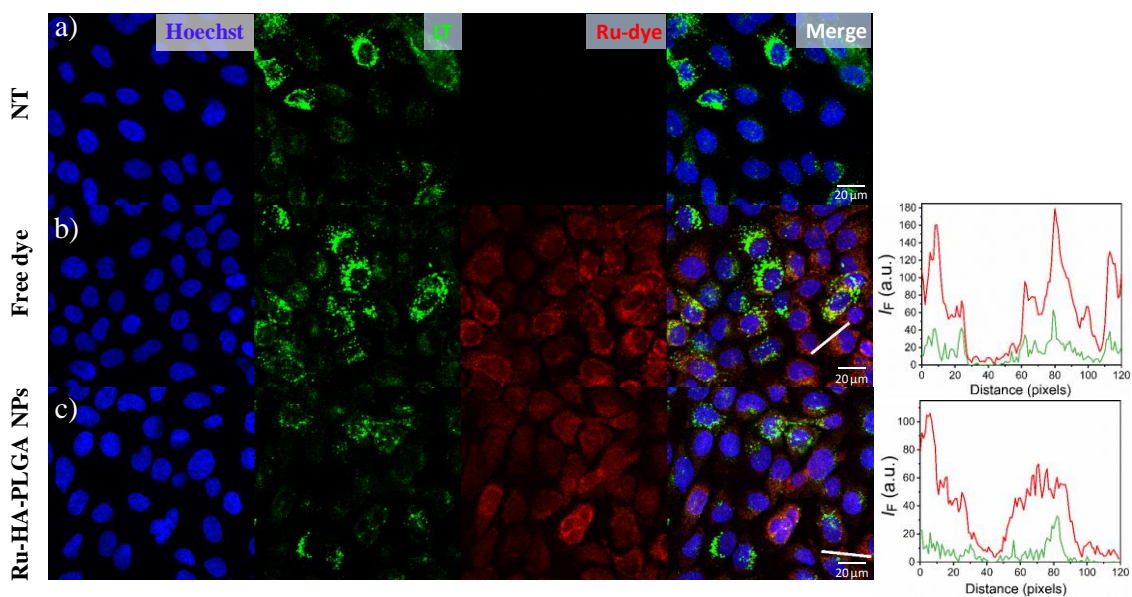


Figure S13. Confocal microscopy analysis of the intracellular uptake of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ and Ru-loaded HA-PLGA NPs into TR146 cells under the following conditions: **a)** non-treated TR146 cells (NT); **b)** TR146 cells treated with the $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($0.25 \mu\text{mol L}^{-1}$); **c)** TR146 cells treated with Ru-HA-PLGA NPs ($1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ equivalent). Right: Fluorescence intensity profile plots were generated to study colocalization along the white line on the merged images. Nuclear staining Hoechst (blue); Lysosome staining (green); $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ (red). Incubation time, 24 h; scale bar, 20 μm .



DISCUSIÓN INTEGRADORA

1. Nuevos quelatocomplejos de Ru(II) con 2,2'-biimidazol

Los complejos de Ru(II) poseen propiedades espectroscópicas y fotoquímicas que los hacen muy atractivos para el desarrollo de diferentes aplicaciones. Además, la gran versatilidad que ofrece la elección minuciosa de los ligandos de coordinación, permite el desarrollo de complejos “a medida” para una determinada aplicación química. En la presente tesis doctoral, se ha diseñado una familia de complejos de Ru(II) que poseen como elemento común un ligando 2,2'-biimidazol (bim) y que se diferencian en los dos ligandos bidentados que completan su esfera de coordinación octaédrica. Los complejos se han aplicado como sondas luminiscentes del ácido tenuazónico (TeA), tanto en disolución como inmovilizados en polímeros de impronta molecular, o bien en el desarrollo de fotosensibilizadores capaces de generar especies reactivas de oxígeno para aplicaciones bioanalíticas o fotodinámicas. El diseño y síntesis de estos complejos de Ru(II) se detallará en los siguientes apartados.

1.1 Síntesis, purificación y caracterización estructural

La síntesis de complejos de Ru(II) heterolépticos $[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{bim})]$ se realiza en dos pasos siguiendo un protocolo general con pequeñas modificaciones.¹⁷⁷ Las reacciones se realizan siempre a reflujo y en atmósfera inerte. Brevemente, primero es necesario la preparación del bisquelato complejo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NN})_2\text{Cl}_2]$. Para ello, sobre una disolución de tricloruro de rutenio(III) y ligando auxiliar (NN) en dimetilformamida (DMF), se añade un gran exceso de cloruro de litio (6 moles por mol de RuCl_3). La elevada concentración de aniones cloruro en la disolución evita la incorporación de otro ligando quelante en la esfera de coordinación del complejo de Ru(II), disminuyendo la probabilidad de formación del complejo homoléptico $[\text{Ru}(\text{NN})_3]$. El intermedio *cis*- $[\text{Ru}(\text{NN})_2\text{Cl}_2]$ se aísla y se utiliza sin necesidad de purificarlo antes del siguiente paso de reacción (**Figura 24**). Debido a la baja solubilidad del ligando bim, es necesario emplear disolventes con elevados puntos de ebullición como el etilenglicol (p.e. = 197 °C). Finalmente, el complejo heteroléptico se aísla como sal de PF_6^- (**Figura 24**). El tiempo de reacción depende en gran medida de la capacidad de coordinación de cada uno de los ligandos empleados, siendo el bim un ligando fuertemente coordinante. Este efecto puede ser un inconveniente cuando se emplean ligandos auxiliares con un bajo carácter coordinante como el ácido 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxílico (dcb), ya que se puede ver favorecida la incorporación de más de un ligando bim en el complejo pseudooctaédrico.

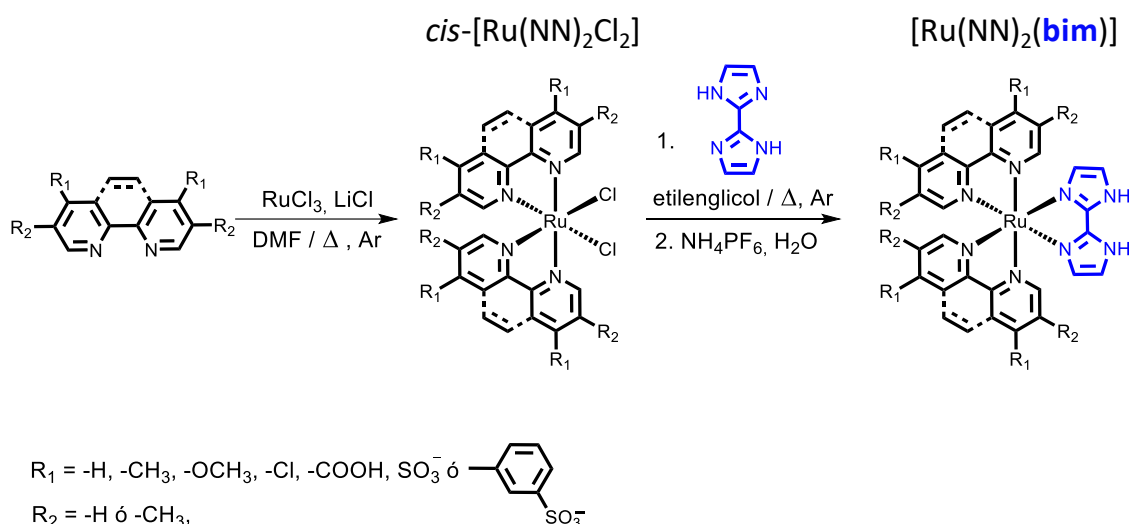


Figura 24. Esquema general de la síntesis de complejos de Ru(II) heterolépticos con ligandos auxiliares tipo 1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina y como ligando común el 2,2'-biimidazol.

En la presente tesis doctoral se han empleado ligandos auxiliares con estructura tipo 2,2'-bipiridina (bpy) o 1,10-fenantrolina (phen) con sustituyentes electrodonadores o electroattractores en sus posiciones 4,4'(bpy) ó 3,4/7,8(phen) (**Figura 24**). La purificación de estos complejos de Ru(II) se ha llevado a cabo por reprecipitación del compuesto o mediante cromatografía en columna de sílice empleando fases móviles polares, ya que la presencia de los átomos de hidrógeno ionizables (-NH) del ligando bim aumenta significativamente su hidrofilia. En algunos casos específicos, la purificación de los compuestos finales puede ser más compleja, siendo necesario el uso de fases estacionarias como el gel de dextrano funcionalizado o *Sephadex*. Concretamente, en algunos casos se ha empleado como fase estacionaria el *Sephadex LH20* (matriz entrecruzada de dextranos hidroxipropilados para separar compuestos tanto hidrófilos como hidrófobos) y, como eluyente, una disolución de hidróxido sódico 1.0 mmol L^{-1} para generar la base conjugada del ligando bim que se retiene con más fuerza en la columna, lo que permite la elución de impurezas en las primeras fracciones (complejos homolépticos sin ligando bim). La desorción del producto deseado se produce por la sustitución del eluyente alcalino, por agua y finalmente metanol. Una vez aislado el complejo, se obtiene su forma ácida tras la adición de ácido hexafluorofosfórico. El principal inconveniente de este procedimiento es la obtención del complejo de Ru(II) mezclado con gran cantidad de sales inorgánicas.

Los complejos de Ru(II) preparados se caracterizan mediante resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C y por espectrometría de masas. La incorporación de los ligandos quelantes poliazaaromáticos en la esfera de coordinación del metal provoca un desplazamiento químico de muchas de las señales en ^1H -RMN con respecto a las del ligando libre. Se ha seleccionado la 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (dmb) y el complejo heteroléptico constituido con el ligando bim ($[Ru(dmb)_2(bim)]^{2+}$), como ejemplo representativo para describir el efecto de la coordinación

sobre los desplazamientos químicos de los ligandos que induce el enlace metal-ligando (**Tabla 5** y **Figura 25**). En el ligando libre sólo se observan 4 señales que proporcionan los 12 hidrógenos presentes en su estructura química. Dada la simetría del ligando dmb, los H_α , H_β , H_δ y los CH_3 correspondientes resuenan a la misma frecuencia. Dicha simetría se pierde cuando el ligando forma parte de la estructura del complejo de Ru(II) en presencia de un ligando tan distinto como el bim. Debido a la estructura pseudooctaédrica de los complejos de Ru(II) (ver estructura tridimensional en la **Figura 25**), los ligandos adoptan diferentes orientaciones en el espacio. Por ello, siempre se observa la aparición de dos señales anisocronas para cada hidrógeno del ligando dmb (sus hidrógenos no son magnéticamente equivalentes con excepción de los H_δ ; **Tabla 5**). Los protones H_α en el ligando libre son los más desapantallados; sin embargo, sufren un fuerte apantallamiento tras su coordinación al metal (**Tabla 5**). Este efecto se debe a la anisotropía magnética que provocan las corrientes de los anillos heterocíclicos vecinos siendo los hidrógenos en α respecto a los nitrógenos del ligando dmb los más afectados.¹⁷⁸

Tabla 5. Desplazamientos químicos (δ /ppm) de los protones del ligando libre 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (dmb) y del complejo heteroléptico $[Ru(dmb)_2(bim)]^{2+}$ en CD_3CN (300 MHz).

¹ H-RMN	H_δ	$H_{\alpha'}$	H_α	$H_{\beta'}$	H_β	H_5	H_4	CH_{3B}	CH_{3A}
dmb	8.23	8.52		7.11				2.42	
$[Ru(dmb)_2(bim)]^{2+}$	8.26	7.72	7.62	7.25	7.14	7.26	6.41	2.54	2.49

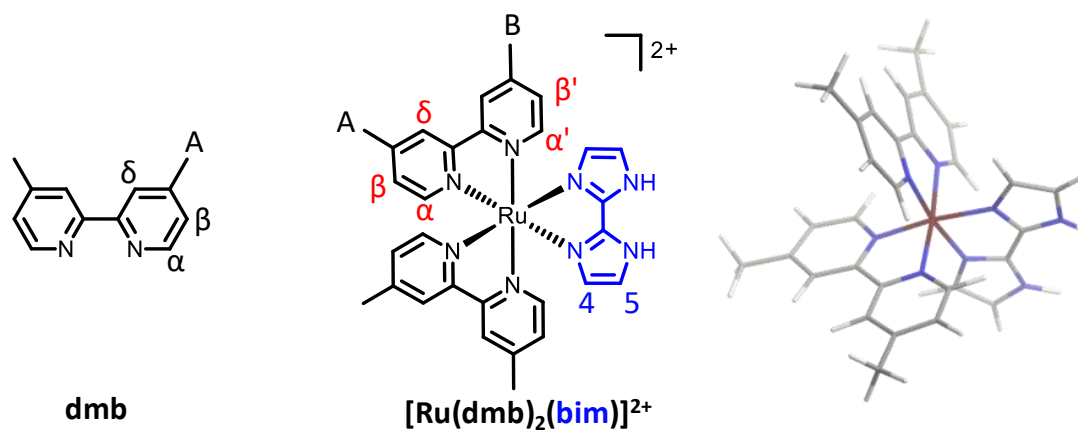


Figura 25. Estructura química del ligando libre 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (dmb) y estructura química y tridimensional del complejo heteroléptico $[Ru(dmb)_2(bim)]^{2+}$ (modelizado por ChemBio3D ultra 13.0).

2. Complejos de Ru(II) como sondas moleculares para el reconocimiento de aniones 1,3-dicetonato

En esta sección se aborda la discusión del diseño y preparación de nuevas sondas luminiscentes basadas en complejos de Ru(II) con el ligando 2,2'-biimidazol (bim) como elemento de reconocimiento de aniones 1,3-dicetonato (como p. ej. la base conjugada del ácido tenuazónico, TeA). Se estudiará experimental y teóricamente cómo la presencia del anión TeA^- en medio orgánico induce cambios muy significativos en las propiedades espectroscópicas de los complejos de Ru(II) con el ligando bim. El empleo de cálculos computacionales ayuda a entender si los cambios observados son provocados por la desprotonación de la sonda luminiscente o por la formación de un aducto con el TeA. Además, permitirá asignar las transiciones electrónicas implicadas en el reconocimiento del TeA y estudiar la geometría del posible aducto formado.

2.1 Diseño y síntesis

El ligando 2,2'-biimidazol (bim) fue seleccionado como elemento de reconocimiento de aniones 1,3-dicetonato. La doble funcionalidad del ligando bim permite la formación de dos enlaces de hidrógeno a través de sus hidrógenos móviles ($-\text{NH}$) y su integración en la estructura de los complejos de Ru(II) mediante formación de un quelato gracias a sus dos agrupaciones de tipo imina ($:\text{N}=\text{}$). Cuando el bim forma parte de la esfera de coordinación de estos complejos metálicos, el $\text{p}K_a$ de los grupos $-\text{NH}$ disminuye drásticamente: $\text{p}K_a$ (bim libre) = 11.5; $\text{p}K_a$ (bim coordinado) = 6 – 8. Este efecto se debe al fuerte efecto electroatractor del catión Ru^{2+} .¹⁷⁹

El carácter ácido de los grupos $-\text{NH}$ y la posibilidad de establecer dos enlaces de hidrógeno simultáneamente, permite el empleo de los complejos Ru(II)-bim como receptores de aniones básicos (p. ej. AcO^- , β -dicetonato, F^-). En el estudio de la interacción de los complejos de Ru(II)-bim con estos aniones no es fácil discernir entre una interacción por enlaces de hidrógeno o la transferencia del protón al anión (reacción ácido-base). Ambos procesos dependen de varios factores como la acidez de los grupos $-\text{NH}$, la basicidad del anión, la fortaleza del enlace que se forme o el número de enlaces de hidrógeno implicados en el reconocimiento.¹⁴⁰ En este contexto, es posible modular el $\text{p}K_a$ del ligando bim unido al metal mediante la selección de sustituyentes electrodonadores o electroattractores en diferentes posiciones *de los ligandos auxiliares*. Por último, la mayoría de los complejos de Ru(II) preparados en la presente tesis doctoral poseen carga positiva. Por consiguiente, en el estudio de las constantes de asociación, además de las interacciones mediante enlace de hidrógeno, habrá que considerar las interacciones electrostáticas que se establecerán con el anión en medio orgánico.

Otra consecuencia relacionada con la coordinación del ligando bim al Ru(II), es la distorsión de la geometría del anillo de cinco miembros que se establece entre el centro de

Ru(II) y el ligando bim bidentado (**Figura 26**), dando lugar a un ángulo de enlace N–Ru–N más pequeño que el formado con un ligando bipyridina o fenantrolina. Consecuentemente, los grupos –NH del bim se encuentran más alejados que en el ligando libre, favoreciendo así su interacción simultánea por enlaces de hidrógeno con dos átomos aceptores.^{180,181} Este hecho peculiar presenta interés para el reconocimiento de aniones con estructuras más abiertas que el acetato, como es el caso de los aniones β -dicetonato (**Figura 26**). Además, la interacción entre un ligando bim y un anión β -dicetonato nunca antes se había explorado, lo que hace que sea particularmente interesante realizar un estudio más exhaustivo sobre la geometría del aducto constituido entre ambas especies. Por ello, uno de los objetivos de la presente tesis doctoral es evaluar la capacidad de los complejos de Ru(II)-bim para reconocer β -dicetonatos y, más específicamente, para el reconocimiento del ácido tenuazónico (TeA), importante micotoxina generada por el hongo del género *Alternaria* y objetivo del trabajo de investigación analítico de nuestro grupo en los últimos años.

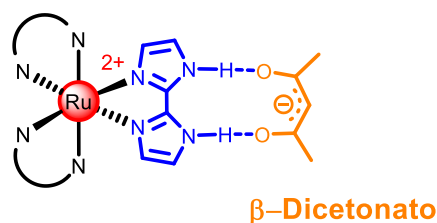


Figura 26. 2,2'-Biimidazol como unidad reconocedora de β -dicetonatos dentro de la esfera de coordinación de los complejos de Ru(II).

La combinación del ligando bim como unidad de reconocimiento y los complejos luminiscentes de Ru(II) es una aproximación idónea para el desarrollo de sondas químicas. La formación de enlaces de hidrógeno o la consiguiente desprotonación de la sonda induce una variación muy significativa en sus propiedades electroquímicas, así como en sus propiedades ópticas (absorción, emisión o tiempos de vida de luminiscencia).^{140,141,179,182} Con el fin de estudiar en detalle la interacción con el TeA, se decidió preparar una familia de complejos de Ru(II) (**Figura 27**). Los grupos funcionales de los ligandos auxiliares (ácido 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxílico, dcb; 2,2'-bipiridina-4,4'-disulfonato, s2b; diacrilato de 2,2'-bipiridin-4,4'-diilmetilo, dab) se han elegido con vistas a una potencial unión covalente a una matriz polimérica (vía formación de enlace amida, sulfonamida o bien mediante una polimerización radicalaria) para el desarrollo de materiales luminiscentes sensores en una etapa posterior.

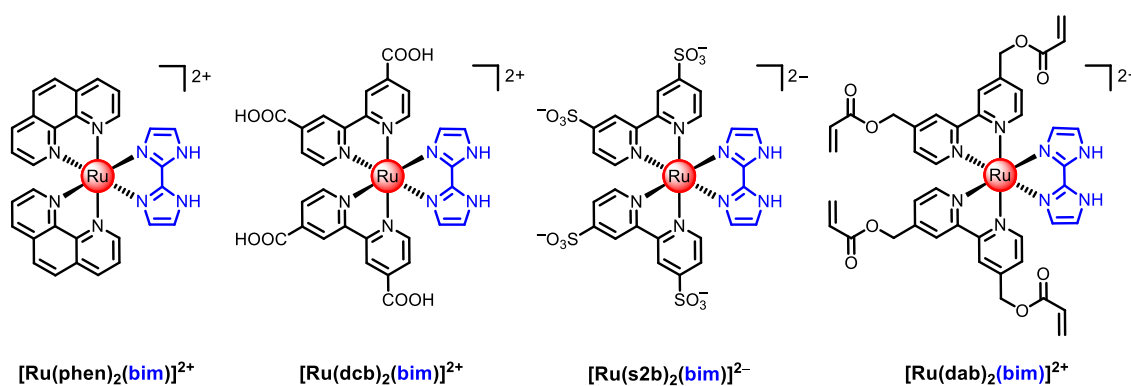


Figura 27. Estructura química de los complejos de Ru(II) luminiscentes propuestos para el reconocimiento del anión tenuazonato.

Por otra parte, debido el elevado coste del TeA y la necesidad de aislarlo de su complejo de Cu(II) (únicamente se encuentra disponible comercialmente en forma de sal de Cu(II)), se decidió abordar la síntesis de la micotoxina (como mezcla de diastereoisómeros, **Figura 28**) para disponer de las cantidades suficientes que se requieren cuando ha de emplearse como plantilla para la síntesis de polímeros de impronta molecular. El análogo sintético del TeA se utilizará, además, en los estudios de reconocimiento con los complejos de Ru(II) que se detallarán en los siguientes apartados. El procedimiento sintético se basa en una *N*-acetilación del éster de la isoleucina y posterior ciclación en presencia de una base fuerte como el metóxido sódico, lo que da lugar a una mezcla de epímeros en el carbono 5 (*5S* y *5R* en proporción 81:19). La principal diferencia con respecto a la micotoxina natural, es que esta únicamente se encuentra como el isómero *5S*.

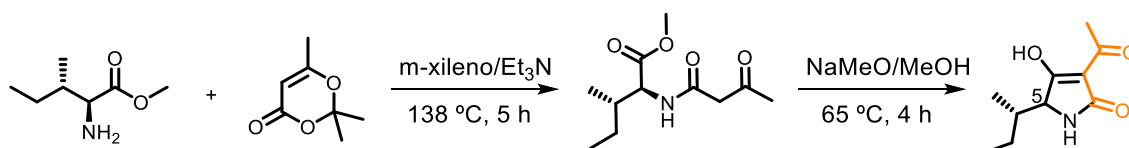


Figura 28. Preparación del ácido tenuazónico sintético (como mezcla 81:19 de los epímeros *5S* y *5R*).

2.2 Caracterización espectroscópica

Las propiedades espectroscópicas de los complejos de Ru(II) empleados como sondas luminiscentes para la detección de aniones quedan recogidas en la **Tabla 6**. Los datos se han extraído de los espectros de absorción y emisión de los complejos de Ru(II) (**Figura 29**).

Tabla 6. Parámetros espectroscópicos de las sondas luminiscentes Ru(II)-bim en DMSO equilibrado al aire.

Complejo	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$ ($\epsilon/10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ^a	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}/\text{nm}$ ^a	τ_1/ns ^b (B_1)	τ_2/ns ^b (B_2)	τ_m/ns ^c
[Ru(phen) ₂ (bim)] ²⁺	266 (82.1), 478 (11.3)	650	80 (1421)	177 (8430)	163
[Ru(dcb) ₂ (bim)] ²⁺	314 (48.0), 378 (14.3), 510 (15.0)	710	62 (1504)	153 (3990)	128
[Ru(dab) ₂ (bim)] ²⁺	292 (51.1), 341 (10.5), 490 (7.7)	701	50 (322)	200 (247)	115
[Ru(s2b) ₂ (bim)] ²⁻	298 (56.9), 350 (13.2), 494 (11.2)	683	149 (3599)	503 (396)	184

a) Incertidumbre: $\lambda \pm 1 \text{ nm}$; $\epsilon \pm 1\%$. b) Tiempos de vida de luminiscencia (τ) medidos por SPT ($\lambda_{\text{exc}} = 463 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} =$ máximo de emisión de cada complejo de Ru(II)), a $(25.0 \pm 0.1) \text{ }^\circ\text{C}$; la cinética de luminiscencia de los complejos de Ru(II) se ajustó a la ecuación: $I_L = B_0 + \sum_i B_i \tau_i$, siendo i el mínimo número de exponenciales necesarias para conseguir un $\chi^2 \leq 1.2$; incertidumbre estimada: $\tau_i \pm 3\%$. c) Tiempo de vida de luminiscencia ponderado pre-exponencialmente calculado por la ecuación: $\tau_m = \sum_i B_i \tau_i / \sum_i B_i$; incertidumbre estimada $\tau_m \pm 1\%$.

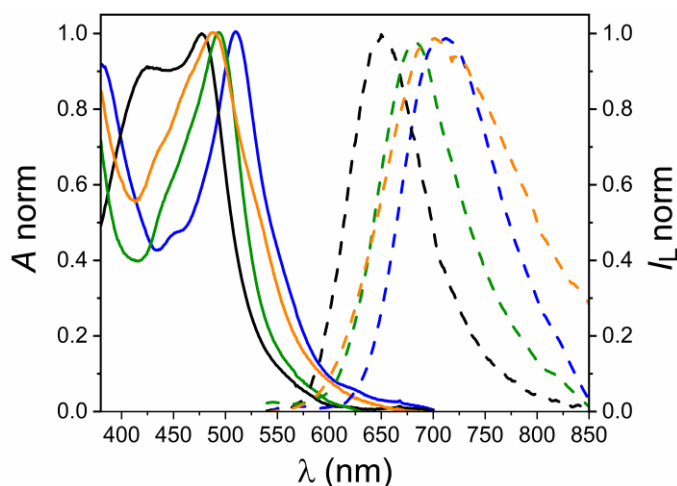


Figura 29. Espectros (normalizados) de absorción UV-Vis y de luminiscencia de los complejos [Ru(phen)₂(bim)]²⁺ (negro, $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$), [Ru(dcb)₂(bim)]²⁺ (azul, $\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$), [Ru(dab)₂(bim)]²⁺ (naranja, $\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) y [Ru(s2b)₂(bim)]²⁻ (verde, $\lambda_{\text{exc}} = 510 \text{ nm}$) en DMSO. Los espectros de emisión se encuentran corregidos por la respuesta del instrumento.

Como integrantes de la familia de los complejos de Ru(II), estas sondas luminiscentes muestran una banda ancha de absorción en el visible, con máximos centrados entre 450 y 500 nm, correspondiente a la transición electrónica de menor energía $d \rightarrow \pi^*$ i.e. de transferencia de carga del metal al ligando (MLCT). Los complejos con el ligando bim presentan una banda a 350 nm, también asignada a una transición MLCT, y una banda alrededor de 290 nm correspondiente a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ (intraligando o LC) centrada en los ligandos bipyridina o fenantrolina. La sustitución de un ligando bpy por un ligando bim induce un importante desplazamiento batocrómico del máximo de absorción ([Ru(bpy)₃]²⁺, $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 454 \text{ nm}$; [Ru(bpy)₂(bim)]²⁺, $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 477 \text{ nm}$ en DMSO). La incorporación de un ligando bim en la esfera de coordinación del metal hace disminuir la retrocesión π entre los orbitales t_{2g} del metal y el orbital π^* del ligando, elevando la energía de los orbitales t_{2g} con respecto al complejo homoléptico ([Ru(bpy)₃]²⁺).¹⁹ Este hecho se traduce en una disminución de la separación energética HOMO-LUMO provocando un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción con respecto al complejo homoléptico.

Los espectros de emisión muestran una banda ancha con un máximo comprendido entre 650 y 710 nm correspondiente a la desactivación del estado excitado triplete ($^3\text{MLCT}$) del complejo de Ru(II). Como se había mencionado antes en los cambios observados en el estado fundamental, la disminución de la separación energética entre los orbitales t_{2g} del metal y los orbitales de π^* del ligando, induce un desplazamiento de su máximo de emisión hacia el rojo con respecto al complejo homoléptico $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($\lambda_{em}^{max} = 617 \text{ nm}$ en DMSO ¹⁸³). La presencia de anillos de cinco miembros (estructura del 2,2'-biimidazol) con respecto a otros ligandos con ciclos de seis eslabones (bipiridina o fenantrolina) en la esfera de coordinación del metal, induce una disminución de los rendimientos cuánticos de emisión (Φ_{em}) y de los tiempos de vida de luminiscencia (τ_L). Mientras que el $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ muestra un Φ_{em} de 0.018 ± 0.002 ¹⁷ en disoluciones en MeCN equilibradas al aire, los complejos con ligandos tipo bim muestran Φ_{em} en torno a $0.003 - 0.008$ y $\tau_L < 0.2 \mu\text{s}$. Algunos estudios afirman que este hecho puede deberse a la rápida desactivación no radiante que se produce desde el estado excitado- $^3\text{MLCT}$, vía conversión interna y relajación vibracional a través del enlace N-H del bim con transferencia de energía al disolvente.¹⁸⁴ Sin embargo, la metilación de los nitrógenos del bim no recupera la emisión de estos complejos a temperatura ambiente.¹⁸ Por ello, la pérdida de emisión de los complejos de Ru(II)-bim podría explicarse a una mayor probabilidad de desactivación de su estado excitado triplete a través de una promoción térmicamente inducida a un estado excitado centrado en el metal ^3MC no luminiscente, desactivándose así por vía no radiante.

La **Tabla 6** recoge los tiempos de vida de luminiscencia de los complejos de Ru(II) estudiados. El perfil cinético de desactivación del estado excitado de los complejos de Ru(II)-bim muestra una peculiaridad: es necesaria la suma de dos extinciones exponenciales para obtener un ajuste con $\chi^2 < 1.1$, lo que indicaría la existencia de dos especies emisoras distintas en la disolución. Este hecho puede explicarse por la posibilidad de transferir un protón, en el estado fundamental o en el excitado, a una base presente en la disolución (p. ej. trazas de agua del disolvente o las propias moléculas de agua de cristalización que contiene el complejo de Ru(II) tras su precipitación) para formar la especie mono-desprotonada.

En el estado excitado pueden darse dos situaciones: un rápido intercambio del protón o un intercambio lento.⁵ La transferencia del protón en el estado excitado a la especie básica depende de las constantes de desactivación de la luminiscencia de la especie protonada (k_{H2bim}) y desprotonada (k_{Hbim}), así como de las constantes de equilibrio de transferencia (k_a^*) y retro-transferencia de protón (k_b^*) (**Figura 30**). En el caso de que se produzca un rápido intercambio de protón en el estado excitado, se alcanzará el equilibrio entre ambas especies antes de que tenga lugar la emisión desde el complejo de Ru(II) excitado, es decir, $k_a^* > k_{\text{H2bim}}$ y $k_b^* > k_{\text{Hbim}}$. Por lo tanto, debería observarse un único tiempo de vida, que variaría con la acidez del medio.

En cambio, si se produce un intercambio lento, el equilibrio en el estado excitado no tiene lugar, y, por tanto, se observarán dos tiempos de vida de luminiscencia correspondientes a las especies protonada y desprotonada en estado excitado.⁵ Los tiempos de vida permanecen invariables frente a la acidez del medio, únicamente varía la contribución de cada una de las especies en función de la concentración de la especie básica y ácida en el estado fundamental (ver **Tabla S3** de la primera publicación científica). Los tiempos de vida de emisión que se muestran en la **Tabla 6** corresponden a un decaimiento biexponencial, lo que indicaría un lento proceso de desprotonación en el estado excitado en todos estos casos.

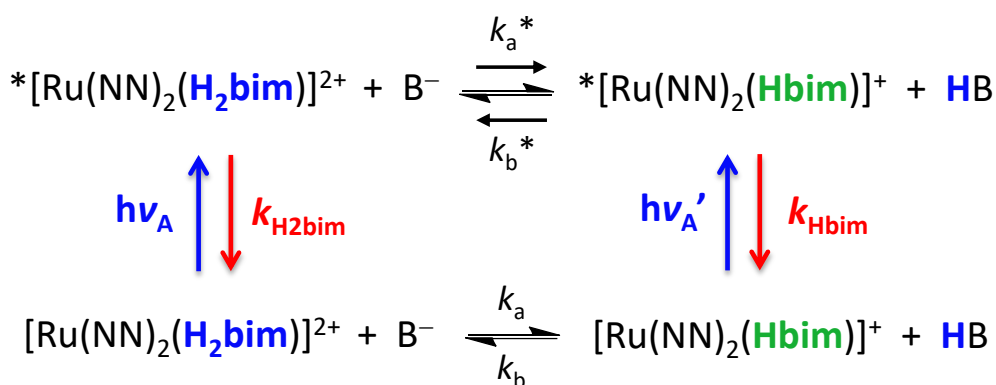


Figura 30. Esquema general de las reacciones de transferencia de protón de un complejo Ru(II)-bim con una especie básica en el estado fundamental y en el excitado.

2.3 Interacción del ligando 2,2'-biimidazol con el anión tenuazonato

Como se ha mencionado previamente, existen varios estudios que confirman la interacción de complejos de Ru(II)-bim con diferentes oxoaniones (AcO^- , HSO_4^- ó H_2PO_4^-).^{141,179} Sin embargo, el reconocimiento de aniones de compuestos 1,3-dicarbonílicos no se ha estudiado aún, siendo particularmente interesante en la presente tesis para el reconocimiento del ácido tenuazónico, una toxina doblemente 1,3-dicarbonílica. Por ello, se decidió evaluar los cambios espectroscópicos y fotoquímicos en los complejos de Ru(II) tras la adición de la toxina en medio orgánico, concretamente en DMSO (siendo éste el único disolvente capaz de disolver todos los complejos preparados). Como se ha ilustrado en la primera publicación científica, la adición de diferentes alícuotas de la sal de TBA del TeA induce cambios muy significativos en la absorción y luminiscencia de los complejos metálicos. Como ejemplo, en la **Figura 31** se muestran los cambios producidos en el espectro de absorción y de emisión del complejo $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}$ tras la adición de TeA^- . La presencia de este anión en disolución induce un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción a 510 nm—correspondiente a la transición MLCT—hasta 550 nm, así como una pronunciada desactivación de la luminiscencia del complejo de Ru(II). La formación de una nueva especie proporciona el punto isobéptico a 530 nm, longitud de onda donde coinciden los ϵ de ambas especies (el cromóforo libre

$[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}$ y el aducto $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}-\text{TeA}^-$ y que confirma la existencia de un único equilibrio entre las dos especies. La adición de un exceso de TeA^- en la disolución no induce ulteriores (**Figura 31**).

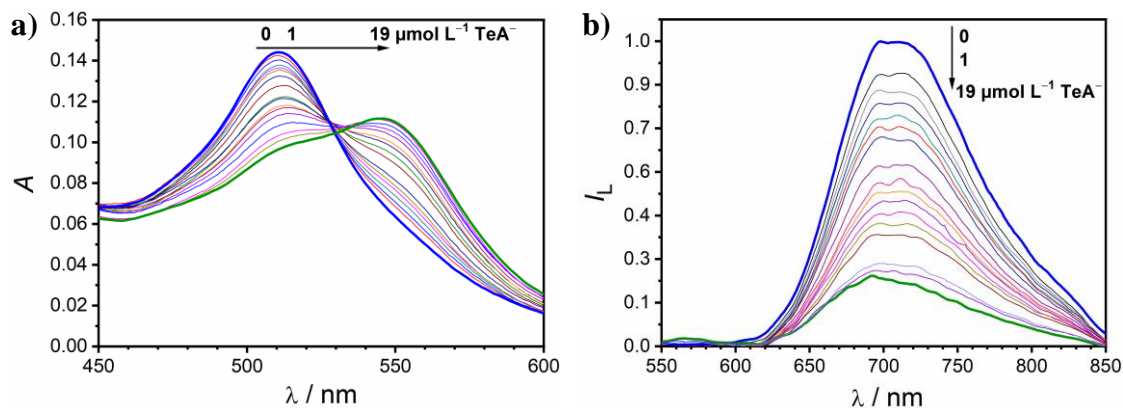


Figura 31. Cambios en a) la absorción en el visible y b) el espectro de luminiscencia ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$) para $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($10.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) en DMSO al añadir cantidades crecientes del TeA^- (como sal de TBA).

La formación de enlaces de hidrógeno entre el ligando bim y el TeA^- aumenta el carácter σ -dador del ligando bim en el complejo de Ru(II), ya que coordinación del anión incrementa la densidad de carga negativa en el nitrógeno heterocíclico unido al metal. Este efecto provoca una desestabilización de los orbitales t_{2g} del metal, lo que se traduce en una disminución de la separación energética HOMO-LUMO (**Figura 32**). Por este motivo, la formación del aducto $[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{bim})]-\text{TeA}^-$, induce un desplazamiento de la transición MLCT a mayores longitudes de onda. Los orbitales $\pi^*(\text{NN})$ de los ligandos auxiliares se mantienen prácticamente inalterados tras la interacción con TeA^- (o la desprotonación, en su caso) del bim, mientras que la capacidad π -dadora del bim aumenta.

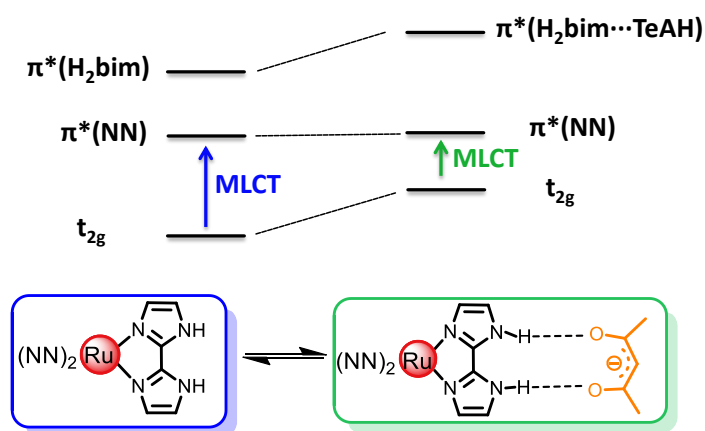


Figura 32. Esquema de los cambios producidos en la energía de los orbitales moleculares de los complejos de Ru(II) con un ligando bim en su esfera de coordinación, tras la formación del aducto $[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{bim})]-\text{TeA}^-$.

Los espectros de absorción de todos los complejos de Ru(II) preparados, en ausencia y en presencia del anión TeA^- , también se calcularon computacionalmente. Como ejemplo representativo, el espectro de absorción del complejo $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}$ se calculó considerando las dos posibilidades: la formación de un aducto entre el complejo de Ru(II) y el TeA^- mediante enlaces de hidrógeno ($\text{TeA}^- \cdots \text{HN}$, **Figura 33**) o bien que la adición del TeA^- provoque la desprotonación de la sonda luminiscente ($\text{TeAH} \cdots \text{N}^-$; espectro de absorción en color rojizo en la **Figura 33**). La formación del aducto $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+} - \text{TeA}$ induce un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción de la sonda, siendo éste muy similar al observado en la **Figura 31a**. La transferencia del protón del bim al TeA induce un desplazamiento de este máximo hacia longitudes de onda algo superiores a la observada con la formación del aducto sin transferencia protónica. Esta última, únicamente se ha observado en presencia de aniones más básicos en medio orgánico como el F^- (**Figura 2** de la primera publicación científica). Con el fin de discernir entre interacción y desprotonación en los aductos Ru(II)-bim en DMSO, se realizó una valoración por ^1H -RMN en presencia de cantidades crecientes de F^- en este disolvente (**Figura S11** del material suplementario de la primera publicación) utilizando $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ como sonda. La adición de cantidades estequiométricas de F^- induce un apantallamiento de las señales correspondientes a los H_4 y H_5 del ligando bim (de 6.27 a 6.01 ppm y de 7.28 a 6.98 ppm, respectivamente). Este efecto se debe a la interacción por enlaces de hidrógeno del F^- con el ligando bim, que aumenta la densidad electrónica en los átomos de N unidos a sendos H provocando el apantallamiento de los hidrógenos H_4 y H_5 . Cuando se añade un exceso de dicho anión, se observa la formación de la especie HF_2^- (señal triplete a 16.5 ppm) como consecuencia de la monodesprotonación del ligando bim del complejo de Ru(II). Además, el aumento de densidad electrónica provocado por la monodesprotonación del ligando bim induce un mayor apantallamiento de los hidrógenos H_4 y H_5 (de 6.01 a 5.75 ppm y de 6.98 a 6.61 ppm). Este hecho indica que únicamente se observa la transferencia de protón en el estado fundamental al añadir un exceso de un anión fuertemente básico en disolvente orgánico como es el F^- . Los resultados experimentales y los cálculos computacionales parecen confirmar que, efectivamente, el anión TeA^- sólo es capaz de formar un aducto con el complejo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ mediante enlaces de hidrógeno que presenta un máximo de absorción a 515 nm, mientras que la desprotonación del ligando bim (que da lugar a una nueva especie absorbente con un máximo a *ca.* 562 nm; ver **Figura 1** de la primera publicación científica) únicamente se observa tras la adición de un exceso de una especie muy básica como el anión F^- . Esta diferencia de comportamiento está totalmente de acuerdo con la respectiva basicidad de éste y de los aniones enolato en DMSO.¹⁸⁵

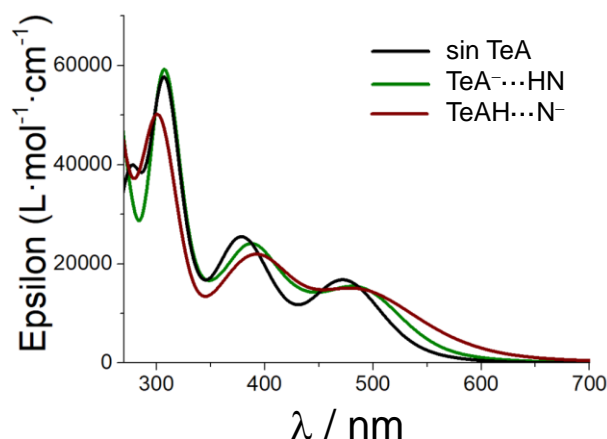


Figura 33. Espectro de absorción calculado en DMSO para el complejo $[\text{Ru}(\text{dcb})_2(\text{bim})]^{2+}$ en ausencia de TeA^- y en presencia de TeA^- considerando o no la transferencia de protón al complejo de Ru(II).

Con la ayuda de los cálculos teóricos, además, se ha propuesto una geometría para el aducto Ru(II)-bim- TeA^- . La estructura de partida propuesta siempre ha sido la que implica la formación de dos enlaces de hidrógeno simultáneos direccionales entre las dos entidades NH del ligando bim y los átomos de oxígeno de la forma más estable (enolato) del ácido tenuazónico en disolución (**Figura 32**). Sin embargo, esta geometría del aducto no es la más estable de acuerdo con los cálculos computacionales. Todas las geometrías propuestas siempre llevan a dos mínimos isoenergéticos (diferencia de energía de $0.25 \text{ kcal mol}^{-1}$, dentro del error del método) donde una entidad C–O se encuentra situada entre los dos grupos NH del ligando bim (**Figura 5** de la primera publicación científica). Desafortunadamente, no ha sido posible confirmar la inesperada estructura de dicho aducto mediante cristalografía de rayos X.

Respecto a los resultados obtenidos a partir de las medidas de los perfiles cinéticos de extinción de la luminiscencia, se observa en todos los casos que es necesario un ajuste biexponencial de la curva de decaimiento debido a la presencia de dos especies luminiscentes: el complejo de Ru(II)-bim sin desprotonar y el desprotonado (**Tabla 6**) debido a la mayor acidez de éstos en el estado excitado. La fotoacidez de los complejos de Ru(II)-bim no es un hecho sin precedentes, R. M. O'Donnell et al. ¹⁸⁶ describen la fotoacidez de complejos $[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{dcb})]^{2+}$ donde la densidad electrónica reside en los ligandos auxiliares debido a la presencia de sustituyentes electroaceptores en la posición 4,4' de la bpy. En la **Figura 34a** se muestra como ejemplo las curvas de extinción de la luminiscencia del complejo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ en DMSO y tras la adición de cantidades crecientes de la micotoxina en disolución. Se observa que, mientras la adición de TeA^- no induce ningún cambio en los tiempos de vida de emisión de las dos especies luminiscentes presentes en disolución ($\tau_1 = 164 \text{ ns}$ para la especie protonada y $\tau_2 = 68 \text{ ns}$ para la monodesprotonada), sí se observa un cambio en la contribución relativa al decaimiento exponencial global: la contribución de la especie monodesprotonada *excitada* va

aumentando con la adición de la micotoxina. La representación gráfica de las amplitudes relativas para cada una de las componentes individuales de la curva de extinción se muestra en la **Figura 34b**. La amplitud del tiempo de vida de emisión más largo ($\tau_1 = 164$ ns; especie protonada) decrece gradualmente mientras que aumenta en paralelo la contribución de la especie monodesprotonada ($\tau_2 = 68$ ns). La adición de más de dos equivalentes no induce ulteriores cambios en las amplitudes de los tiempos de vida de emisión. Además, mientras que los tiempos de vida de luminiscencia (τ_1 y τ_2) son independientes de la concentración de TeA^- en disolución (sólo se observan variaciones en las amplitudes relativas de cada una de las exponenciales, manteniéndose constantes a partir de un equivalente de TeA^-), la intensidad de emisión del complejo de Ru(II) disminuye drásticamente en presencia de la micotoxina. Este hecho podría evidenciar una contribución importante de un mecanismo de desactivación estático. Además, estos hechos experimentales parecen indicar que el mecanismo de desactivación es *una transferencia de protón* del complejo de Ru(II) en el estado excitado (más ácido que el fundamental) al TeA^- .

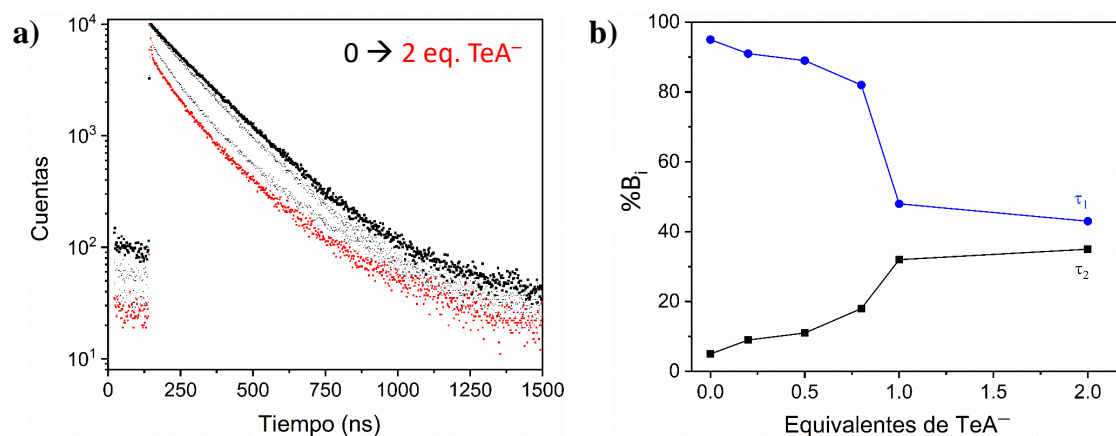


Figura 34. a) Extinción de la luminiscencia del complejo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ libre (puntos negros) y tras la adición de cantidades crecientes de TeA^- en DMSO ($\lambda_{\text{exc}} = 463$ nm; disoluciones equilibradas al aire). b) Contribución relativa de las amplitudes de los términos exponenciales resultantes del ajuste biexponencial de las emisiones en (a) tras la adición de cantidades crecientes de TeA^- ($\tau_1 = 164$ ns; $\tau_2 = 68$ ns).

Por último, el reconocimiento eficaz del TeA^- por los complejos de Ru(II)-bim se ha confirmado tanto experimentalmente mediante valoraciones espectroscópicas, como mediante cálculos teóricos. Ambos métodos proporcionan importantes constantes de asociación entre la sonda luminiscente y la toxina (ver **Tabla 2** de la primera publicación científica). Cabe destacar la baja constante de asociación obtenida para el complejo cargado negativamente $[\text{Ru}(\text{s2b})_2(\text{bim})]^{2-}$ (3.9×10^3 L mol⁻¹ vs. 6.3×10^5 L mol⁻¹ para el complejo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$), lo que confirma el valor añadido que presentan las interacciones electrostáticas en el reconocimiento del anión tenuazonato en DMSO.

En resumen, el estudio exhaustivo del proceso de reconocimiento del anión TeA^- con los complejos de Ru(II)-bim, nos ha permitido entender los cambios espectroscópicos asociados a la formación del aducto $[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{bim})]^{2+}-\text{TeA}^-$. Sin embargo, la *selectividad* de estas sondas luminiscentes es relativamente baja, ya que se observan cambios similares en la interacción con otros oxoaniones capaces de formar enlaces de hidrógeno con el grupo receptor. Por ello y con el objetivo de maximizar el reconocimiento de la micotoxina, se abordó el diseño de un material luminiscente de impronta molecular en el que se generan cavidades selectivas de reconocimiento del analito objetivo.

3. Desarrollo de MIPs luminiscentes selectivos al TeA basados en complejos de Ru(II)-bim polimerizables

En este apartado se discuten los aspectos más relevantes en el desarrollo de un sensor óptico luminiscente empleando polímeros de impronta molecular como materiales de reconocimiento selectivo para el ácido tenuazónico. Inicialmente, el trabajo se centró en el diseño de nuevos monómeros trifuncionales basados en complejos de Ru(II) (luminiscentes, polimerizables por la introducción de grupos acrilato o alílico y sensibles al TeA por la incorporación del ligando 2,2'-biimidazol). Tras una caracterización espectroscópica, se procedió a la síntesis de MIPs luminiscentes que se crecieron en forma de nanocapa sobre núcleos nanométricos de sílice. De este modo, se estudió cómo afecta la composición de la mezcla de polimerización al espesor de la nanocapa formada, las características espectroscópicas del complejo luminiscente inmovilizado en la nanocapa de MIP y la influencia de la presencia de distintos porcentajes de agua en un medio orgánico (acetonitrilo) sobre las prestaciones analíticas del material sensor.

3.1 Diseño y síntesis de complejos de Ru(II)-bim polimerizables

El TeA es una de las micotoxinas cuya detección ha suscitado más interés en los últimos años debido a su elevada toxicidad y extendida presencia en diferentes matrices alimentarias.⁹⁸ A pesar de la gran cantidad de estudios que confirman su toxicidad, la UE no ha fijado todavía valores para los límites máximos permitidos de la presencia de esta toxina en alimentos. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevos métodos analíticos que sean sensibles, selectivos y sencillos para la rápida detección y cuantificación *in situ* del TeA, sin necesidad de transportar las muestras al laboratorio o el uso de una instrumentación excesivamente costosa como la estándar LC-MS/MS. En este contexto, los métodos de detección de luminiscencia son sensibles, rápidos, económicos y no destructivos. Por otra parte, los complejos polipiridílicos de Ru(II) destacan como sondas luminiscentes por su (foto)estabilidad y por presentar grandes desplazamientos de Stokes y relativamente largos tiempos de vida de luminiscencia.

Los resultados descritos en el Capítulo 2 confirman que el ligando bim integrado en la esfera de coordinación de complejos de Ru(II) es capaz de coordinar fuertemente al anión TeA⁻ induciendo una respuesta de la sonda luminiscente. Dos de los principales inconvenientes, sin embargo, son la pobre selectividad de unión frente a otros aniones básicos (por ejemplo, acetato o fluoruro) y la ausencia de respuesta en medio acuoso, ya que la formación del aducto [Ru(NN)₂(bim)]-TeA se fundamenta en interacciones por enlace de hidrógeno. Para intentar resolver simultáneamente estos dos problemas, se propuso la incorporación de las sondas luminiscentes Ru(II)-bim en materiales poliméricos tipo MIP, que poseen cavidades selectivas de reconocimiento creadas en presencia del analito diana. Dichas cavidades además, suelen

tener carácter hidrófobo, y pueden proteger en cierto grado al aducto frente a la solvatación con moléculas de agua en caso de ser necesario trabajar en medio (parcialmente) acuoso.

Para alcanzar este objetivo—la síntesis de MIPs luminiscentes derivatizados con complejos de Ru(II)-bim que actúen como elementos de reconocimiento y transducción—, fue necesaria la incorporación de unidades polimerizables en la estructura de los ligandos auxiliares de los complejos Ru(II)-bim para posibilitar su anclaje covalente a la matriz polimérica del MIP. Con este fin, se decidió derivatizar la estructura química del ligando auxiliar bpy con unidades polimerizables de tipo alílico (*N,N'*-dialil-(2,2'-bipiridina)-4,4'-dicarboxamida, alb) o acrilato (dab) (**Figura 35**). La síntesis del ligando alb consiste en la formación de una amida a través de grupos –COOH presentes en un ligando bipyridina mediante activación del ácido por adición de HATU (hexafluorofosfato de azabenzotriazolotetrametiluronio) en presencia de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA).¹⁸⁷ Por otra parte, para la síntesis del ligando dab con grupos acrilato, se lleva a cabo una reacción entre un derivado dihidroxilado de bipyridina—la 4,4'-bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina—y el cloruro de acrililo para formar un grupo éster carboxílico.¹⁸⁸

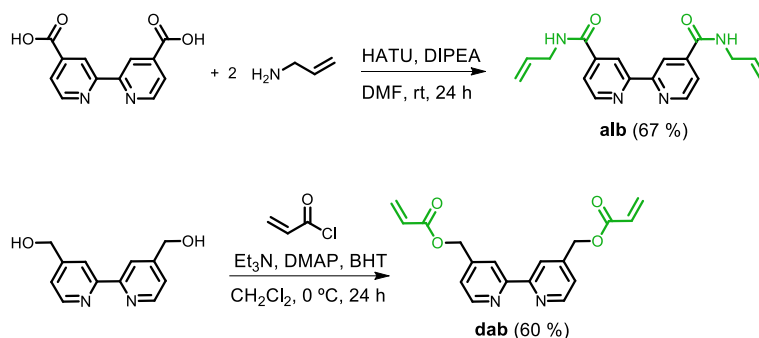


Figura 35. Esquema de síntesis para la preparación de ligandos derivados de la 2,2'-bipiridina con unidades polimerizables tipo alilo (alb) y acrilato (dab).

Una vez obtenidas las unidades bpy polimerizables, se lleva a cabo la preparación de los complejos de Ru(II) heterolépticos siguiendo el protocolo de síntesis general descrito en la **Figura 24** con una pequeña variación: la adición de una cantidad catalítica de butilhidroxitolueno (BHT) como inhibidor de la polimerización para proteger los grupos alilo o acrilato. De este modo se consigue la incorporación de dos ligandos auxiliares polimerizables (alb o dab) y una unidad de reconocimiento (bim) para la preparación de polímeros de impronta molecular luminiscentes para la detección del TeA (**Figura 36**). Es interesante destacar el desafío que supone la síntesis de monómeros trifuncionales para su empleo en la preparación de MIPs (ver sección 4.4.1 de la Introducción).

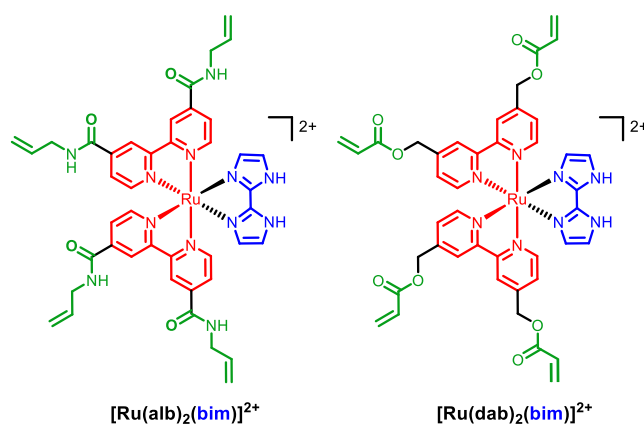


Figura 36. Estructura química de los complejos de Ru(II) preparados como monómeros trifuncionales (el ligando bim como unidad de reconocimiento, grupos alílicos o acrilato como unidades polimerizables y el complejo de Ru(II) como sonda luminiscente señalizadora del reconocimiento) para el desarrollo de polímeros de impronta molecular luminiscentes selectivos al ácido tenuazónico.

La caracterización estructural del complejo $[\text{Ru}(\text{alb})_2(\text{bim})]^{2+}$ por ^1H -RMN se detalla en la **Figura 37**. Como se ha mencionado anteriormente, dada la geometría (pseudo)octaédrica de los complejos de Ru(II), aparecen señales distintas para cada uno de los hidrógenos de cada anillo aromático del ligando bpy. El acusado carácter electroatractor del sustituyente amida ($\sigma_p(-\text{CONHCH}_3) = 0.36$)¹⁸⁹, directamente conjugado en la posición 4,4' de la bpy, induce un desapantallamiento de todos los hidrógenos del anillo aromático con respecto al complejo con ligandos bpy sin sustituir $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$. En cambio, el grupo éster del complejo $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ se encuentra separado de la bipyridina por un grupo $-\text{CH}_2-$, lo que rompe la conjugación electrónica con el anillo siendo el efecto electrónico del sustituyente prácticamente nulo en este caso ($\sigma_p(-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3) = 0.05$)¹⁸⁹. Esta diferencia se aprecia bien, por ejemplo, en la señal de los H_δ : para el complejo con el ligando bpy sustituido en 4,4' con un grupo amida, la señal H_δ aparece a 9.25 ppm, mientras que en el complejo $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ estos H_δ aparecen más apantallados, a 8.41 ppm (la caracterización estructural de este complejo se encuentra detallada en la segunda publicación científica), un valor casi idéntico al observado para el complejo con ligandos bpy sin sustituir $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($\delta\text{H}_\delta = 8.42$ ppm).

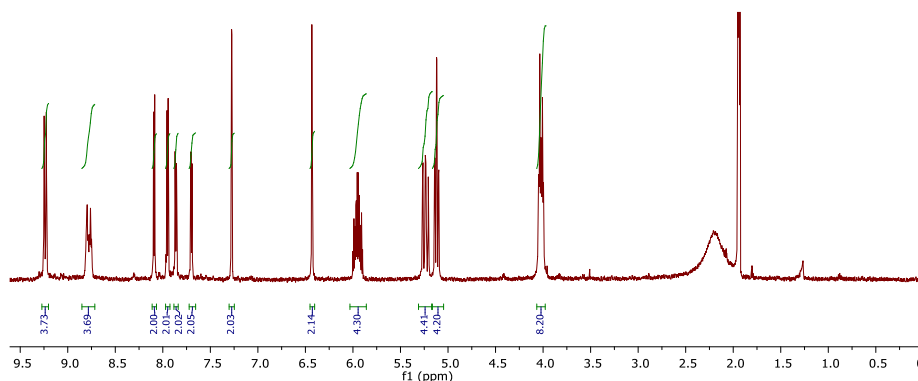


Figura 37. Espectro de ^1H -RMN de $[\text{Ru}(\text{alb})_2(\text{bim})]^{2+}$ en CD_3CN (500 MHz).

3.2 Caracterización espectroscópica

Las propiedades espectroscópicas de los complejos de Ru(II) con unidades polimerizables $[\text{Ru}(\text{alb})_2(\text{bim})]^{2+}$ y $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ se recogen en la **Tabla 7**. Los datos se han extraído de los espectros de absorción y emisión de dichos complejos (**Figura 38**).

Tabla 7. Parámetros espectroscópicos de los monómeros trifuncionales en MeCN equilibrado al aire.

Complejo	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$ ($\epsilon/10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ^a	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}/\text{nm}$ ^a	τ_1/ns ^b (B_1)	τ_2/ns ^b (B_2)	τ_m/ns ^c
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$	288 (72.4), 340 (10.8), 477 (9.4)	671	64 (24314)	108 (542)	65
$[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$	292 (56.9), 346 (10.6), 485 (7.5)	700	93 (19923)	248 (8827)	141
$[\text{Ru}(\text{alb})_2(\text{bim})]^{2+}$	240 (263.4), 311 (34.3), 505 (8.4)	712	85 (12435)	151 (16509)	122

a) Incertidumbre: $\lambda \pm 1 \text{ nm}$; $\epsilon \pm 1\%$. b) Tiempos de vida de luminiscencia (τ) medidos por SPT ($\lambda_{\text{exc}} = 463 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} =$ máximo de emisión de cada complejo de Ru(II)), a $(25.0 \pm 0.1) \text{ }^\circ\text{C}$; la cinética de luminiscencia de los complejos de Ru(II) se ajustó a la ecuación: $I_L = B_0 + \sum_i B_i \tau_i$, siendo i el mínimo número de exponenciales necesarias para conseguir un $\chi^2 \leq 1.2$; incertidumbre estimada: $\tau_i \pm 3\%$. c) Tiempo de vida de luminiscencia ponderado pre-exponencialmente calculado por la ecuación: $\tau_m = \sum_i B_i \tau_i / \sum_i B_i$; incertidumbre estimada $\tau_m \pm 1\%$.

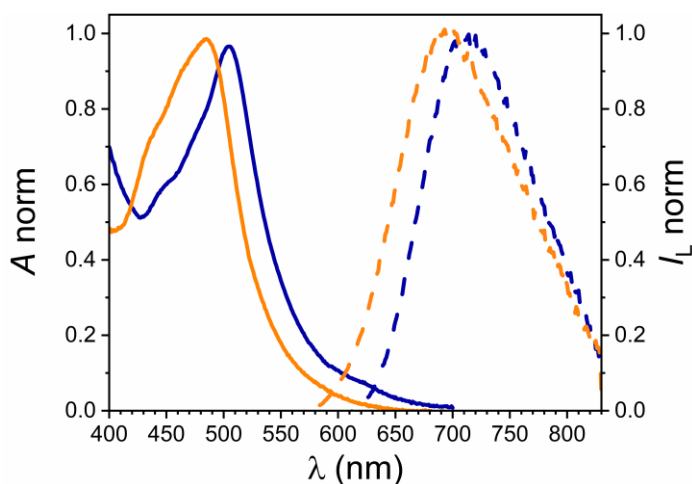


Figura 38. Espectros (normalizados) de absorción UV-Vis y de luminiscencia de los complejos $[\text{Ru}(\text{alb})_2(\text{bim})]^{2+}$ (azul, $\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$) y $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$ (naranja, $\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) en MeCN. Los espectros de emisión se encuentran corregidos por la respuesta del instrumento.

Los complejos de Ru(II) presentan una banda ancha de absorción en la región de los 400 a 550 nm correspondiente a la transición electrónica de menor energía $d \rightarrow \pi^*$ (MLCT). Como se observa en la **Tabla 7**, la funcionalización del ligando bpy con grupos carboxamida u oxicarbonilo induce un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción con respecto al complejo sin sustituir ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 477 \text{ nm}$). Este efecto es mucho más acusado en presencia del grupo amida directamente conjugado con el anillo aromático (se observa un desplazamiento batocrómico de 28 nm). El efecto $-\text{R}$ de los grupos carboxamida sobre los anillos aromáticos provoca una estabilización de los orbitales π^* , que se traduce en una disminución de la separación energética HOMO-LUMO y el consiguiente desplazamiento batocrómico de la banda de absorción.

La excitación de los complejos de Ru(II) en sus respectivos máximos de absorción en el visible da lugar a los espectros de emisión que se muestran en la **Figura 38**. Ambos presentan una banda de emisión ancha en el rojo característica de la desactivación del estado excitado triplete $^3\text{MLCT}$. El desplazamiento batocrómico del máximo de emisión del complejo $[\text{Ru}(\text{alb})_2(\text{bim})]^{2+}$ (712 nm) con respecto al complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (671 nm) vuelve a confirmar la estabilización de los orbitales π^* , provocando una transición electrónica de menor energía. Al igual que los indicadores descritos en el Capítulo 2, los complejos de Ru(II) polimerizables presentan tiempos de vida con un decaimiento biexponencial (**Tabla 7**).

3.3 Síntesis de MIPs luminiscentes y evaluación de su respuesta al TeA

Los MIPs luminiscentes selectivos al TeA se prepararon utilizando como molécula plantilla el TeA sintético (**Figura 28**). El empleo de un sucedáneo de la micotoxina natural es imprescindible ya que, además de comercializarse ésta en forma de complejo de Cu(II)—inservible para su uso como plantilla molecular—el precio del TeA natural es prohibitivo para las cantidades que se requieren en la preparación de MIPs.

Para la preparación del MIP, se forma en primer lugar un complejo entre uno de los complejos Ru(II)-bim polimerizables ($[\text{Ru}(\text{alb})_2(\text{bim})]^{2+}$ ó $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$) y la base conjugada del ácido tenuazónico sintético. Tras ello, se añaden los reactivos necesarios para la polimerización: monómero diluyente, entrecruzante, porógeno (disolvente) e iniciador (iniciación térmica). Tras la reacción de polimerización, la red entrecruzada de polímero se lava exhaustivamente para extraer la plantilla de manera que queden cavidades libres para el ulterior reconocimiento del TeA en la que, idealmente, el ligando bim se encontrará orientado hacia el interior de la cavidad (**Figura 39**).

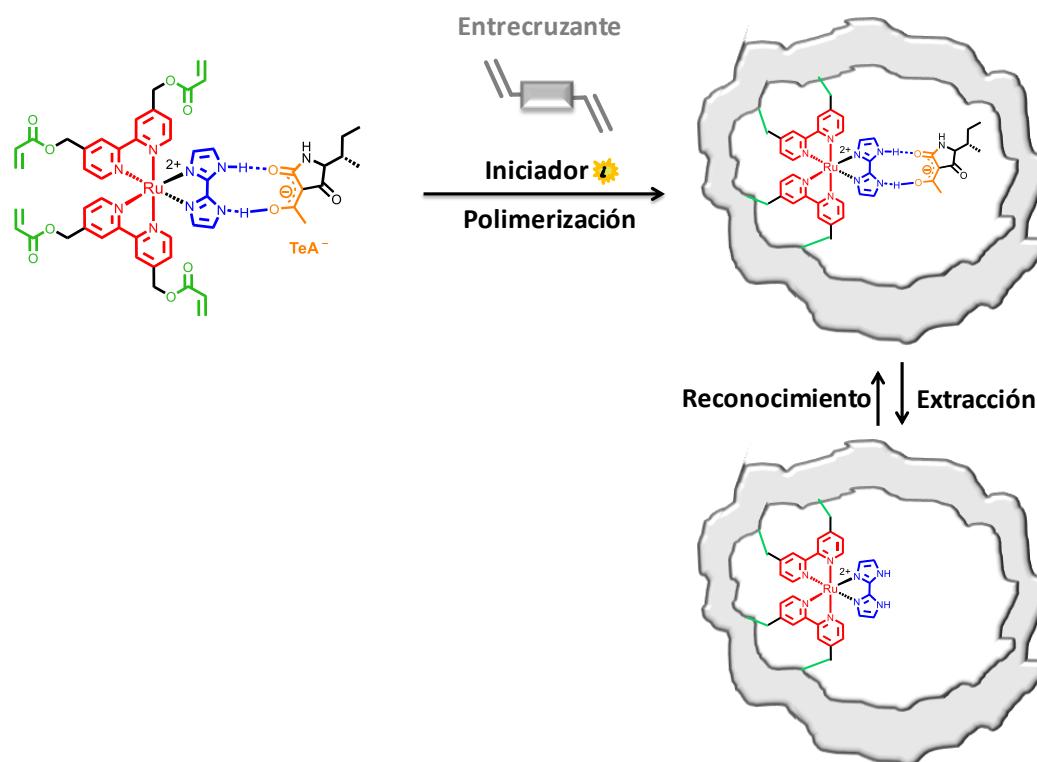


Figura 39. Esquema de síntesis de un MIP para TeA empleando el método de impronta no covalente. El monómero funcional utilizado es un complejo de Ru(II) luminiscente con unidades polimerizables y un ligando bim como unidad de reconocimiento.

Antes de proceder con la preparación de los MIPs luminiscentes, se lleva a cabo la caracterización de la interacción $[\text{Ru}(\text{alb})_2(\text{bim})]^{2+}$ y TeA^- por $^1\text{H-RMN}$ (**Figura 40**). El estudio se realiza en CD_3CN ya que es el disolvente que se utilizará posteriormente para la preparación del material de impronta. Las señales de este complejo de Ru(II) se habían asignado previamente (**Figura 37**). En este contexto, se evalúan los desplazamientos químicos de los protones del ligando bim (H_4 y H_5), ya que son los que se ven más afectados por las interacciones que puedan establecer los grupos $-\text{NH}$. Efectivamente, se observa un desplazamiento muy significativo de ambos protones al añadir la micotoxina. El H_5 se desplaza de 7.27 a 7.0 ppm y el H_4 de 6.43 a 6.15 ppm tras la adición de 35 mmol L^{-1} de TeA^- (**Figura 40**). El apantallamiento de estas señales confirma el aumento de densidad electrónica en estas posiciones lo que es indicativo de la formación del aducto con el anión TeA^- (ver **Figura 40**). En este caso, la adición de un exceso de TeA únicamente induce un apantallamiento de las señales del ligando bim de 0.27 ppm. La comparación con el mayor apantallamiento (más de 60 ppm) inducido en ambos hidrógenos por la adición de F^- a un complejo similar ($[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$, ver primera publicación científica), parecería confirmar que, en el caso del $[\text{Ru}(\text{alb})_2(\text{bim})]^{2+}$, se forma un aducto mediante interacción por enlaces de hidrógeno al añadir TeA^- en lugar de la desprotonación de la sonda como ocurría en el caso del complejo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bim})]^{2+}$ tras la adición de un exceso de F^- .

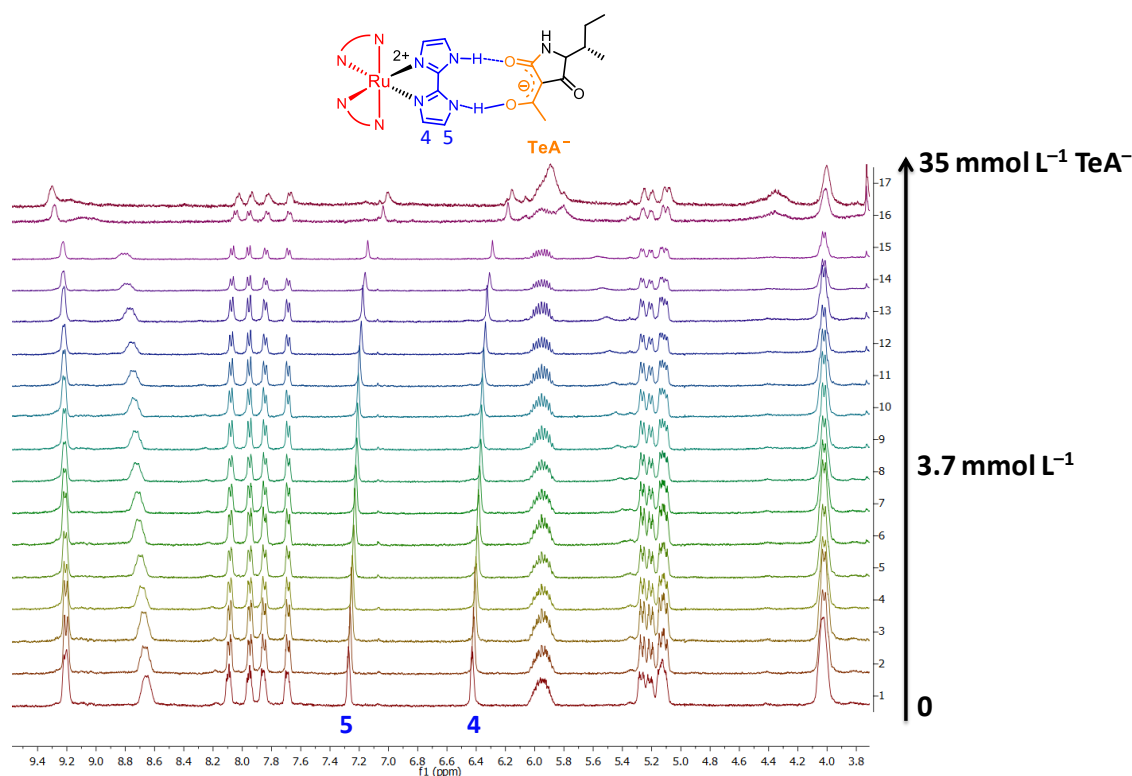


Figura 40. Espectro de ^1H -RMN de $[\text{Ru}(\text{alb})_2(\text{bim})]^{2+}$ en CD_3CN (5.7 mmol L^{-1}) tras la adición de sucesivas alícuotas de TeA^- ($0 - 35 \text{ mmol L}^{-1}$).

Una vez confirmada la fuerte interacción entre el TeA^- y el complejo de $\text{Ru}(\text{II})$, se decidió llevar a cabo la preparación de los polímeros de impronta en dos formatos diferentes: i) micropartículas porosas de MIP empleando un molde sacrificable de sílice y ii) como nanopartículas núcleo-coraza (*core-shell*) compuestas, donde el núcleo son nanopartículas de gel de sílice que únicamente ejercen de soporte y la coraza es una nanocapa de material MIP preparado en presencia de TeA .

i) Para la preparación de las microesferas porosas se emplea el complejo $[\text{Ru}(\text{alb})_2(\text{bim})]^{2+}$ como monómero funcional (0.11 mmol), *N*-metil-*N*-vinilacetamida como monómero diluyente (0.29 mmol), 1,4-diviniloxibutano como entrecruzante (1.50 mmol), MeCN como porógeno ($120 \mu\text{L}$) y TeA sintético como plantilla (0.11 mmol , en forma de sal de TBA). En primer lugar se forma el aducto entre el monómero funcional y la molécula plantilla en acetonitrilo, que se mantiene agitando durante 30 min a $8 \text{ }^\circ\text{C}$ para favorecer la interacción entre ambos. A continuación se añade el resto de componentes. Dado que el complejo de $\text{Ru}(\text{II})$ es un inhibidor de la polimerización radicalaria, se decidió aumentar el porcentaje de ABDV al 5% (con respecto al 1% empleado generalmente en la síntesis de MIPs). A continuación, se purga la mezcla de polimerización durante 5 min con argón y se va añadiendo poco a poco sobre 1 g de partículas de sílice ($40 - 75 \mu\text{m}$). Una vez añadida la mezcla de polimerización, se agita vigorosamente para extender la mezcla de forma homogénea por todas las partículas de sílice.

Finalmente, se calienta la mezcla a 60 °C en la estufa. Después de 24 h, se lleva a cabo la disolución del gel de sílice mediante la adición de NH_4HF_2 , obteniendo las correspondientes micropartículas porosas que se lavaron sucesivamente con agua, MeOH/TFA (99:1, v/v) y MeOH mediante centrifugación. En la **Figura 41** se observan las micrografías de SEM de las microesferas porosas del MIP (a) y del correspondiente polímero preparado en ausencia de la plantilla (NIP, b). Los poros generados en las partículas aceleran la cinética de transferencia de masa del analito diana a las cavidades de reconocimiento del MIP, lo que representa una ventaja con respecto a los polímeros en bloque convencionales.

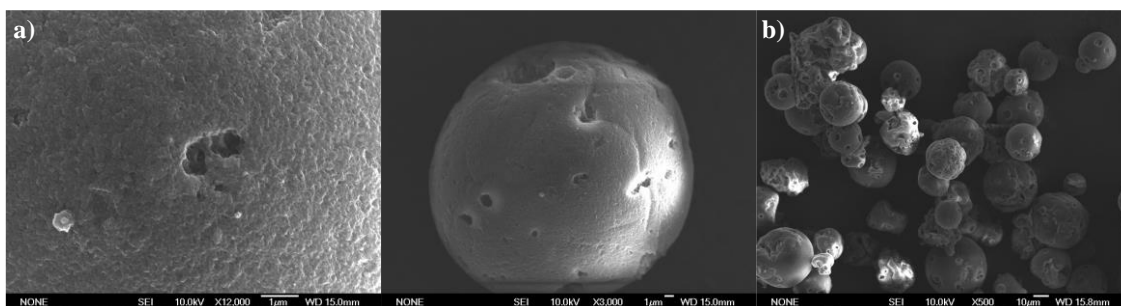


Figura 41. Micrografías de SEM de micropartículas porosas de Ru-MIP (a) y Ru-NIP (b).

Con el fin de evaluar la capacidad que presentan las micropartículas para detectar el TeA, se suspendieron 10 mg de MIP y NIP en 2.5 mL de MeCN y se midió la luminiscencia de las partículas en suspensión tras ir añadiendo sucesivas alícuotas de la micotoxina (como sal de TBA). Como se observa en la **Figura 42a y b**, existe una interacción más fuerte en el MIP, ya que se observa una mayor desactivación de la luminiscencia del material a medida que aumenta la concentración del analito en disolución. Este hecho puede observarse a simple vista por el cambio de color de las partículas de naranja a morado cuando el TeA está presente (**Figura 42c**). Sin embargo, la sensibilidad que presentan las micropartículas es muy baja, siendo necesaria la adición de altas concentraciones de TeA para observar cambios apreciables en la luminiscencia del MIP.

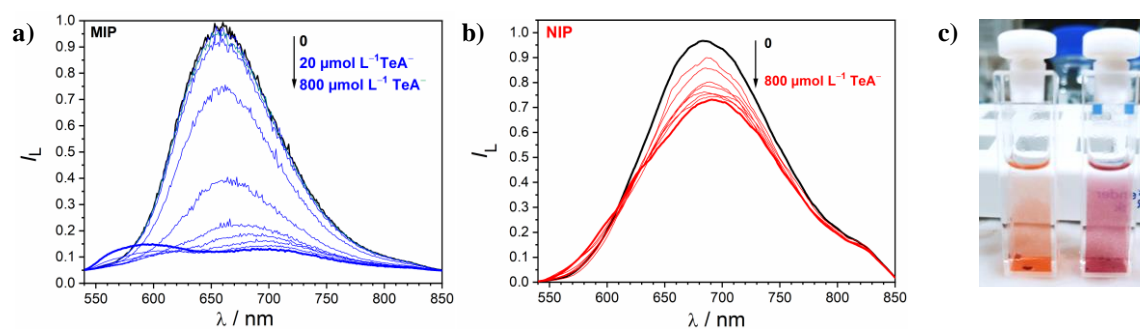


Figura 42. Variación de la luminiscencia de las micropartículas porosas MIP (a) y NIP (b) en MeCN (4 mg mL⁻¹, $\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$) tras la adición de tenuazonato (como sal de TBA). c) Cambio de color producido por la interacción entre el complejo de Ru(II) y el TeA en el MIP.

Otro inconveniente de las microesferas porosas de MIP es la imposibilidad de estudiar el reconocimiento en medio acuoso: la presencia de agua o el empleo de tampones como el fosfato induce la desprotonación de la sonda y la consecuente desactivación de su luminiscencia ya en ausencia de analito. Este efecto puede explicarse por la acidez de las entidades -NH del ligando bim en el complejo $[\text{Ru}(\text{alb})_2(\text{bim})]^{2+}$. La incorporación de sustituyentes electroattractores ($\sigma_p(\text{-CONHCH}_3) = 0.36$)¹⁸⁹ directamente conjugados (efecto $-R$) en las posiciones 4,4' de la bpy provoca un incremento de la acidez del biimidazol.

ii) La preparación de nanopartículas núcleo-coraza presenta ventajas con respecto a la primera estrategia: dado que la capa de MIP que se genera en la superficie de los núcleos de sílice tiene un espesor nanométrico, es muy accesible y presenta por tanto una rápida difusión del analito y posibilita un mejor lavado de la plantilla, lo que contribuye a una rápida respuesta del sensor y una elevada sensibilidad (menor interferencia en las medidas por posible “sangrado” de restos de plantilla mal lavados). El empleo de nanopartículas ($d = 200 \text{ nm}$) permite la reducción de la dispersión de luz frente a las micropartículas preparadas anteriormente ($d = 60 \mu\text{m}$). Además, los problemas asociados a la considerable acidez del bim en los complejos de Ru(II) se minimizan con el empleo del monómero trifuncional $[\text{Ru}(\text{dab})_2(\text{bim})]^{2+}$. La presencia del espaciador $\text{-CH}_2\text{-}$, que rompe la conjugación con el sustituyente oxicarbonilo, evita el efecto conjugativo $-R$ en el anillo heteroaromático, disminuyendo la acidez de los grupos NH del ligando bim con respecto al monómero funcional de tipo carboxamida empleado en la preparación de las micropartículas.

La síntesis de los núcleos de SiO_2 se lleva a cabo a través del método Stöber, que permite la obtención de partículas monodispersas y con un tamaño controlado.¹⁹⁰ Este método es un proceso sol-gel que se basa en la hidrólisis del tetraetilortosilicato (TEOS) en etanol mediante adición de cantidades controladas de agua y en presencia de amoníaco como catalizador. En el proceso se genera etanol como subproducto y una mezcla de etoxisilanoles ($\text{Si}(\text{OEt})_3\text{OH}$ y $\text{Si}(\text{OEt})_2(\text{OH})_2$) que condensan unos con otros, entrecruzándose para constituir las partículas de SiO_2 . Siguiendo el protocolo descrito en la segunda publicación, se obtuvieron nanopartículas muy homogéneas, con un diámetro medio de 200 nm (**Figura 43**).

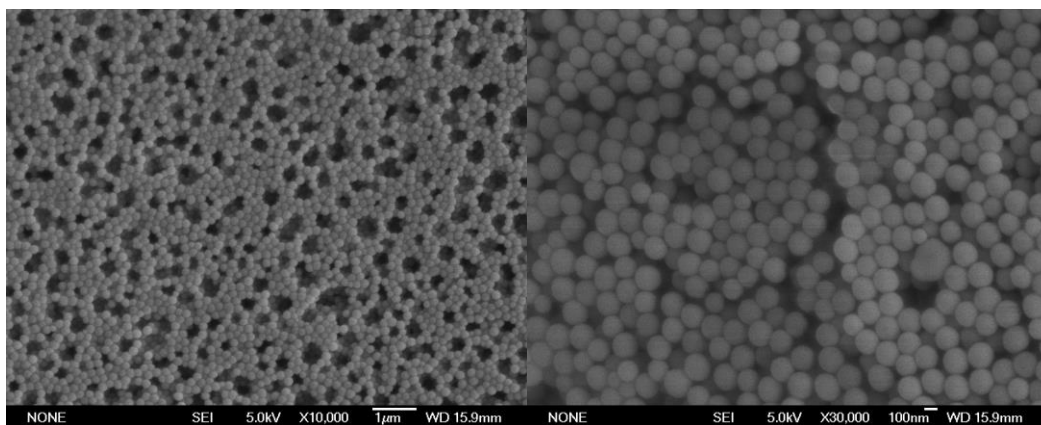
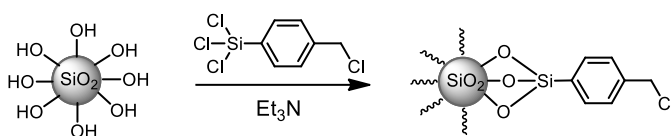


Figura 43. Micrografías SEM de las nanopartículas de SiO₂ preparadas por el método Stöber.

Una vez obtenidos los núcleos de sílice, se procede al crecimiento de la capa de MIP en su superficie a través de una polimerización tipo RAFT. Esta aproximación se emplea mucho en la síntesis de MIPs¹⁹¹ ya que permite el crecimiento controlado del polímero alrededor del núcleo. El procedimiento RAFT consiste en una polimerización convencional por radicales libres en presencia de un agente de transferencia de cadena adecuado o “agente RAFT”. Dichos agentes se inmovilizan sobre la superficie de las nanopartículas mediante una reacción de silanización y presentan una estructura común tipo tiocarbonilto ($S=C-S$) como tritio/ditiocarbamatos, ditiocésteres y xantatos. El doble enlace carbono-azufre presenta una elevada reactividad y promueve un crecimiento controlado del polímero alrededor del núcleo síliceo mediante la incorporación sencilla y repetitiva de diferentes unidades de monómeros hasta que se agoten todos los monómeros libres en el medio. Ello posibilita la preparación de polímeros con bajo índice de polidispersidad y un gran control de su peso molecular. Para poder incorporar el agente RAFT, es conveniente llevar a cabo una activación previa de la superficie de las nanopartículas para disponer del mayor número posible de grupos silanol (Si-OH) libres que permitan enlazar covalentemente el precursor 4-(clorometil)feniltriclorosilano (**Figura 44**). A continuación, las partículas silanizadas reaccionan con el bromuro de ditiobenzoato de magnesio para dar lugar al agente ditiobenzoato en su superficie.

Silanización



Generación del agente RAFT

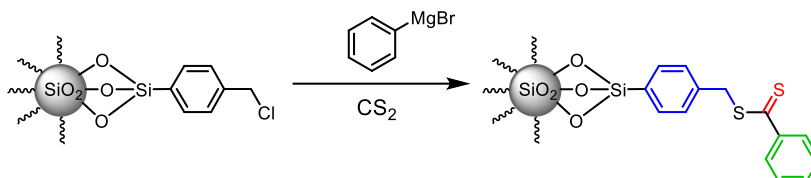


Figura 44. Esquema de inmovilización del agente RAFT de polimerización en la superficie de nanopartículas de sílice, previa reacción de silanización.

El agente RAFT está constituido por tres componentes principales (**Figura 44**). El enlace C=S (marcado en rojo), muy reactivo, es donde se genera el primer radical que inicia la polimerización. El grupo Z (en verde, en este caso es un grupo fenilo) modula la reactividad del doble enlace C=S, influenciando a la velocidad de adición y fragmentación de la cadena polimérica. El grupo R (marcado en azul, en este caso un grupo bencilo) es un buen grupo saliente ya que el enlace SC-S es bastante lábil. El radical formado (R•) es el encargado de reiniciar el crecimiento de una nueva cadena polimérica. En una polimerización RAFT ideal, los radicales presentes se "comparten" por igual entre todas las cadenas poliméricas, es decir, todas las cadenas tienen las mismas oportunidades de crecimiento, reduciendo así la polidispersidad del polímero.¹⁹²

La presencia del agente RAFT en la superficie de las NPs se confirmó por microanálisis elemental mediante la evaluación del incremento del % de S y el % de C con respecto a las NPs Stöber. Una vez preparadas las NPs funcionalizadas con el agente RAFT, se llevó a cabo el crecimiento de la capa polimérica alrededor del núcleo de SiO₂. En primer lugar, se determinaron las mejores condiciones de polimerización en ausencia del complejo de Ru(II). Para ello, se empleó el dimetacrilato de etilenglicol (EDMA) como monómero entrecruzante (CL) y la metacrilamida (MAM) como monómero diluyente (MD). Las proporciones de los monómeros se escogieron sobre la base de otros trabajos existentes sobre este tipo de materiales con pequeñas modificaciones (MF:MD:CL relación molar 1/17/86).^{82,193} Para determinar el efecto de los monómeros en la formación de la nanocapa, se decidió mantener la masa de NPs RAFT constante (7.5 mg), mientras se fue variando la concentración de monómero diluyente y el volumen total de disolvente (5 ó 10 mL de MeCN) manteniendo constante la concentración del monómero entrecruzante (0 mmol MAM/0.55 mmol EDMA y 0.11 mmol MAM/0.55 mmol

EDMA). Se observa que, mientras que el volumen de porógeno no afecta al tamaño de la nanocapa formada, en ausencia del MD se produce un crecimiento del polímero separado de las NPs y una mayor agregación (**Figura 45a y b**). La incorporación de MAM en la red polimérica favorece el crecimiento controlado y homogéneo alrededor del núcleo obteniéndose una nanocapa de unos 100 nm (**Figura 45c y d**). A pesar de que el espesor de la capa obtenido es mayor de lo deseado, se decidió mantener la proporción de MD/CL en previsión de la posible inhibición de radicales que podría ocasionar la adición del complejo de Ru(II).

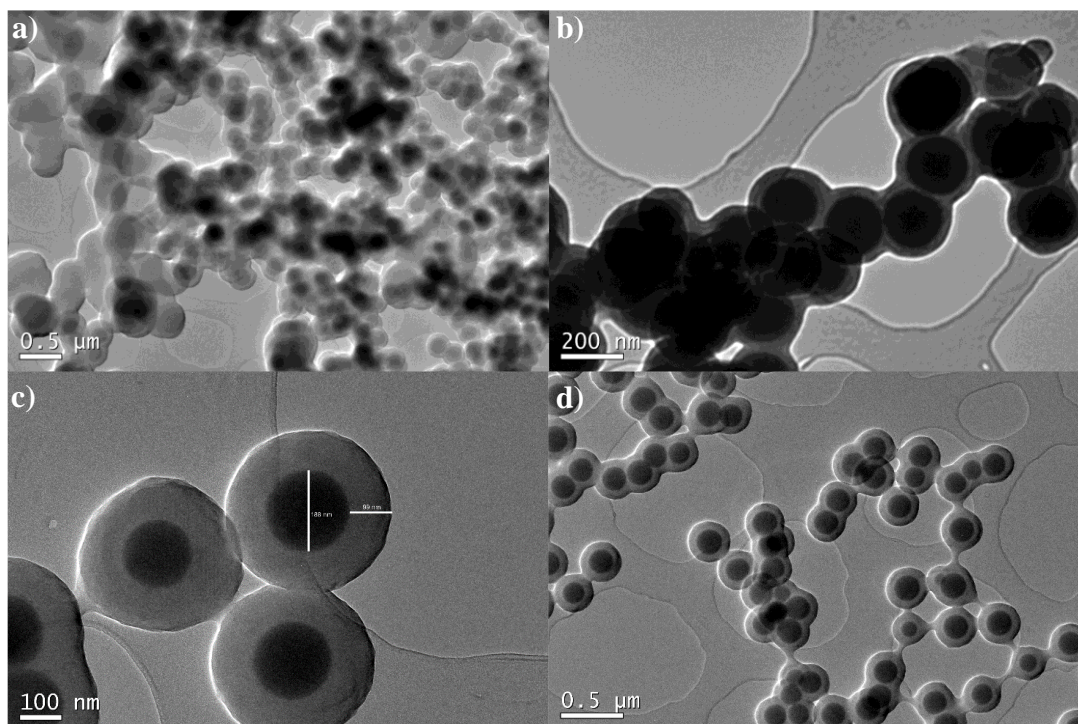


Figura 45. Micrografías TEM de las partículas SiO₂@NIP preparadas en ausencia (a, b) y en presencia de metacrilamida (c, d).

El siguiente paso fue optimizar la concentración de monómero trifuncional (MF) en la mezcla de polimerización. Para ello, se plantearon dos proporciones diferentes (siempre próximas a los estudios anteriormente mencionados^{82,193}) para la preparación de los polímeros en presencia de la base conjugada de la micotoxina como sal de TBA (relación molar MF/TeA/MD/CL = 1/1/44/184 ó 1/1/21/92). La adición de una menor cantidad del monómero trifuncional con respecto a los demás componentes de la mezcla, resulta en el crecimiento del polímero fuera de las NPs de SiO₂, además de la obtención de una nanocapa heterogénea de unos 40 nm de grosor (**Figura 46a**). En cambio, cuando se dobla la proporción de MF, se observa un crecimiento homogéneo de una capa MIP alrededor del núcleo de SiO₂ de unos 10 nm (**Figura 46b**). Por ello, se consideró la mezcla MF/TeA/MD/CL en proporción 1/1/21/92 como la más adecuada para la síntesis de los MIPs luminiscentes.

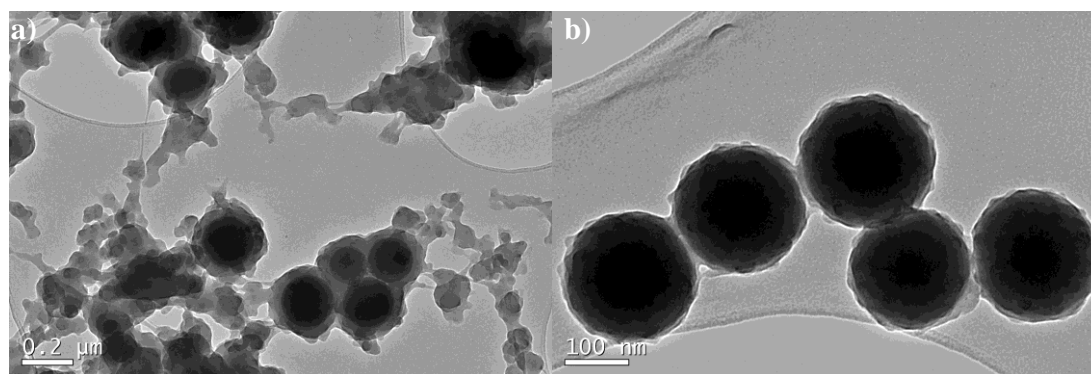


Figura 46. Micrografías TEM de las partículas SiO₂@Ru-MIP preparadas con 2.5 μmoles (a) y 5.0 μmoles (b) de [Ru(dab)₂(bim)]²⁺.

Una vez preparados los materiales con impronta, se llevó a cabo la optimización de las condiciones de medida para conseguir el mejor reconocimiento del analito. Como se detalla en nuestra segunda publicación, las características espectroscópicas de las nanopartículas son muy similares a las observadas para el complejo de Ru(II) en MeCN (λ_{em}^{max} ([Ru(dab)₂(bim)]²⁺) = 700 nm; λ_{em}^{max} (MIP) = 695 nm; λ_{em}^{max} (NIP) = 685 nm). Sin embargo, la selectividad que muestra el MIP en este medio es muy baja (se observa una gran desactivación de la luminiscencia en presencia de la toxina tanto en el caso del MIP como del NIP; ver **Figura 3** segunda publicación). Por ello, decidimos ensayar medidas en un medio más competitivo, i.e. mediante la adición de cantidades crecientes de agua en acetonitrilo (5 y 10% en volumen). Se observa que la adición de agua disminuye las interacciones inespecíficas (menor respuesta del NIP con respecto al MIP), tanto más cuanto mayor es la proporción de agua. Sin embargo, esta incorporación de agua también afecta a la sensibilidad, ya que dificulta el reconocimiento molecular por formación de enlaces de hidrógeno. Se estableció así que el empleo de una proporción del 5% de agua en MeCN es un buen compromiso ya que, en este medio, la respuesta del MIP es suficientemente sensible mientras que se consigue disminuir notablemente las interacciones no específicas (débil respuesta del material sin impronta). La posibilidad de trabajar en un medio parcialmente acuoso con un sistema que basa su reconocimiento en interacciones no covalentes confiere un importante valor añadido al material de impronta. La presencia de un 5% de agua no afecta a la sonda luminiscente integrada en la nanocapa del MIP (λ_{em}^{max} (MIP) = 695 nm), un hecho que sugeriría un entorno hidrofóbico en las cavidades del polímero. Sin embargo, en el caso del NIP, sí se observa la desprotonación del complejo que conduce a un desplazamiento hipsocrómico de su máximo de emisión (λ_{em}^{max} (NIP) = 650 nm). Esto parece indicar que, en el caso del material sin impronta, la exposición del complejo de Ru(II) al medio acuoso es mucho mayor.

Una vez optimizadas las condiciones de medida, se evaluó la capacidad de reutilización del MIP en la determinación del TeA sin perder sus propiedades analíticas. Para poder emplear de

nuevo las NPs tras la realización de un primer calibrado, es necesaria la completa extracción de la molécula plantilla. Para ello, las NPs se lavan 3 veces con MeOH/TFA (9/1) a 37 °C y 3 veces con MeCN. Finalmente, se resuspenden en el medio de medida y se repite el calibrado con el anión TeA⁻. Como se observa en la **Figura 47**, el MIP pierde su capacidad de reconocimiento tras un uso, ya que los valores obtenidos de la desactivación de fluorescencia son similares a los del material sin impronta. Este hecho puede deberse a una extracción incompleta de la micotoxina, provocando que las cavidades sigan ocupadas.

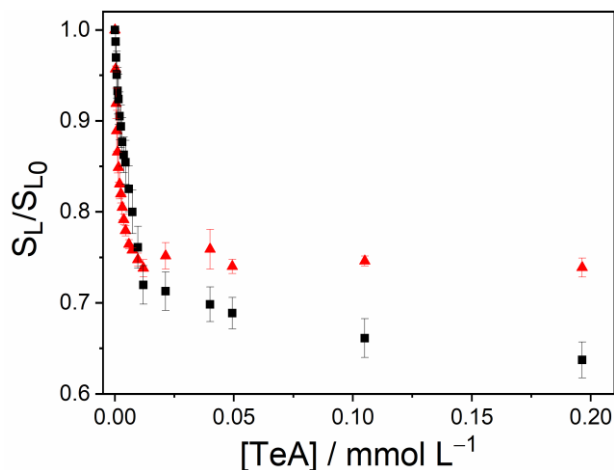


Figura 47. Área bajo la curva de emisión (normalizado con el valor en ausencia de TeA⁻) en función de la concentración del TeA⁻; los cuadrados negros corresponden a un SiO₂@Ru-MIP reutilizado tras un calibrado previo con posterior extracción de la plantilla y los triángulos rojos corresponden al SiO₂@Ru-NIP, ambos en MeCN–H₂O (95:5 v/v).

Los experimentos realizados hasta el momento se llevaron a cabo con el TeA sintético. Con el fin de comprobar la respuesta del sensor MIP luminiscente frente a la micotoxina natural, se procedió a su aislamiento a partir de un complejo de Cu(II) comercial, el (TeA)₂Cu, mediante elución de una disolución del mismo en diclorometano a través de una columna de intercambio catiónico (resina DOWEX 50X8). Una vez obtenido el TeA natural, se realizó un calibrado bajo las condiciones optimizadas en un rango de concentraciones de 0 a 0.44 mmol L⁻¹. Al igual que ocurre con el TeA sintético, se observa una importante desactivación de la luminiscencia del MIP (**Figura 48**), con un límite de detección de 324 nmol L⁻¹, mientras que en el caso del NIP el efecto es menos acusado (< 10% de desactivación de la luminiscencia).

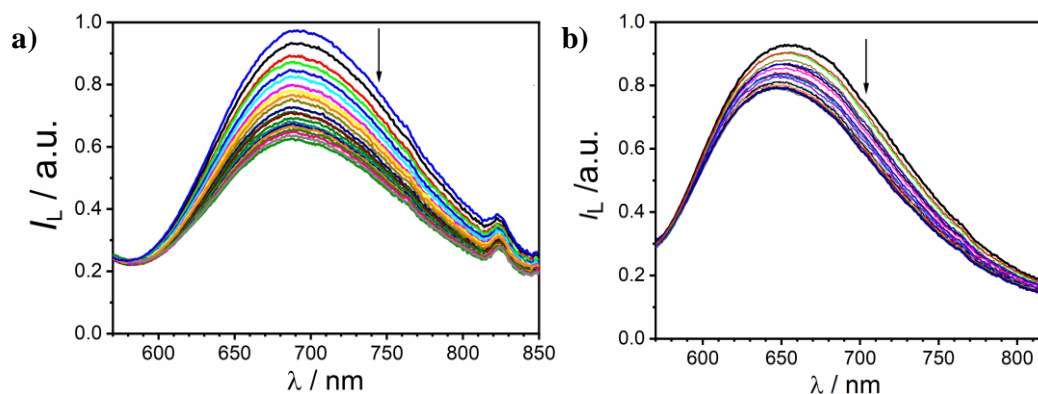


Figura 48. Cambios en el espectro de emisión ($\lambda_{exc} = 500$ nm) de una suspensión de 1.12 mg mL^{-1} en MeCN–H₂O (95:5 v/v) de SiO₂@Ru-MIP (a) o de SiO₂@Ru-NIP (b) tras la adición de concentraciones crecientes de TeA natural.

Finalmente y para comprobar la selectividad impartida por las cavidades MIP, se realizó un estudio de potenciales interferentes con otras micotoxinas que puedan coexistir con el TeA en muestras alimentarias y que además poseen una entidad similar a la del TeA necesaria para la interacción con el ligando bim. Las micotoxinas seleccionadas fueron: alternariol (AOH), ácido ciclopiazónico (CPA) y β -zeralenol (β -ZOL). Como se muestra en la **Figura 5** de la segunda publicación científica, no se observó una respuesta relevante para ninguna de las toxinas estudiadas. La máxima disminución de la luminiscencia medida tras la adición de los interferentes es de un 10%, un valor muy similar al observado en el caso del material sin impronta. Esto último indicaría que la disminución es provocada por interacciones no específicas que también se dan en la superficie de la nanocapa del MIP. Cabe destacar la elevada selectividad que presenta el MIP frente al TeA, incluso frente al CPA (con un motivo estructural muy similar al TeA, pero de tamaño algo mayor), lo que confirma la importancia del tamaño molecular en el reconocimiento.

Además de la elevada sensibilidad y selectividad que ofrece el MIP frente al TeA, el nanomaterial destaca por su *versatilidad*, ya que es posible medir cambios asociados a la concentración del TeA en términos de intensidad de emisión o del tiempo de vida de luminiscencia. Además, la medida del tiempo de vida de emisión de los materiales poliméricos preparados es capaz de discernir las interacciones específicas frente a las no específicas; mientras que en el MIP se observa una reducción del 30% de su tiempo de vida de emisión en presencia del TeA, la presencia de la micotoxina no induce ningún cambio en los tiempos de vida de emisión del NIP. El límite de detección calculado para las medidas basadas en tiempos de vida de luminiscencia es de 382 nmol L^{-1} , similar al obtenido mediante monitorización de cambios en la intensidad (324 nmol L^{-1}).

En comparación con el único MIP descrito hasta la fecha para la detección luminiscente del TeA,⁷⁹ las NPs SiO₂@Ru-MIP desarrolladas en esta Tesis muestran un límite de detección muy

inferior ($63.8 \mu\text{g L}^{-1}$ frente a $500 \mu\text{g L}^{-1}$),⁷⁹ una respuesta instantánea al analito (unos pocos segundos frente a los 60 min de incubación que se utiliza en esta publicación) y mayor versatilidad de medida, con la posibilidad de seguir los cambios por variaciones en el tiempo de vida de luminiscencia (lo que evita los inconvenientes asociados a las medidas basadas en cambios de la intensidad de emisión como las perturbaciones en la fuente de luz, la degradación de la sonda luminiscente o las interferencias provocadas por la dispersión de luz en presencia de partículas). Además, el MIP descrito en la bibliografía para la detección óptica de TeA basa el reconocimiento en el cambio de la fosforescencia de un complejo de Eu(III), con el inconveniente que, durante el proceso de extracción y lavado de la plantilla tras la impronta, el catión metálico de europio también se pierde, siendo necesaria su posterior reincorporación para la medida analítica.

4. Complejos de Ru(II) como fotosensibilizadores para generación de especies reactivas de oxígeno

En esta sección se aborda la discusión del diseño y síntesis de nuevos complejos de Ru(II)-bim como fotosensibilizadores (FSs) de O₂ para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y su aplicación en terapias fotodinámicas. Los complejos de Ru(II) funcionalizados con el ligando bim poseen la capacidad de generar tanto anión superóxido como oxígeno singlete tras ser iluminados. Este hecho peculiar no se ha estudiado en detalle para la gran mayoría de FSs descritos en bibliografía que exhiben características similares. Por ello, en los siguientes apartados se estudiará como afecta la incorporación de sustituyentes electrodonadores o electroattractores en los ligandos auxiliares polipiridílicos en la producción de ROS. Por último, se evalúa la capacidad de los complejos de Ru(II) para inducir un daño oxidativo significativo a células de cáncer oral o diferentes especies de bacterias.

4.1 Diseño y síntesis

En la generación de ROS por fotosensibilizadores está ampliamente aceptada la intervención de dos mecanismos distintos. Por una parte, un mecanismo “tipo II” en el que la transferencia de energía procedente de las moléculas de un complejo de Ru(II) en su estado excitado triplete (p. ej. ³[Ru(NN)₂(bim)]*) al oxígeno molecular que se encuentre próximo da lugar a la formación de oxígeno singlete (¹O₂). Este mecanismo ha sido muy estudiado para su aplicación en terapias fotodinámicas (TFDs) para el tratamiento del cáncer o la desinfección.²⁰ Sin embargo, su actuación se ve a veces limitada por la concentración de oxígeno en el medio, lo que puede ser un gran inconveniente en el tratamiento de tumores sólidos altamente hipóxicos (pO₂ < 5 mm Hg)¹⁹⁴ o en ambientes anaerobios causados por la infección bacteriana. El mecanismo “tipo I”, por el cual se produce anión superóxido (O₂⁻), surge como una vía muy citotóxica debido a la cascada de reacciones que involucran esta especie y desencadenan la generación de radicales más oxidantes.¹⁹⁵ Generalmente, el mecanismo tipo I se describe como un proceso de transferencia electrónica en cascada desde una biomolécula (adyacente) al FS para generar la especie reducida FS⁻ que, seguidamente, transfiere el electrón a la molécula de oxígeno. En cambio, los complejos de Ru(II) que se muestran en la **Figura 49** y **50**, poseen la habilidad de transferir directamente un electrón al O₂ para la formación del O₂⁻, sin necesidad de que intervenga un sustrato biológico. Aunque, al igual que en el mecanismo tipo I, es necesaria una cierta concentración de O₂ en el medio para dar lugar al O₂⁻ por desactivación bimolecular del complejo de Ru(II) excitado, el O₂⁻ es capaz de convertirse en otras especies más citotóxicas (H₂O₂ o [•]OH), agravando el daño oxidativo, y en O₂ adicional reciclándose en el proceso y aliviando el medio anaerobio, como se ha descrito en la sección 3.2.1 de la Introducción.

Con el fin de evaluar la capacidad de los complejos Ru(II)-bim para generar $^1\text{O}_2$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ por excitación con luz azul, se decidió preparar una familia de compuestos con dicho ligando. El carácter π -excedente del ligando bim eleva la energía de sus orbitales π^* .¹⁹ Este efecto, provoca una disminución de los potenciales de reducción (i.e. $E^\circ_{(\text{Ru}^{3+}/\text{Ru}^{2+})}$ más negativos) de los complejos de Ru(II), favoreciendo la transferencia electrónica al oxígeno. Sobre los ligandos auxiliares de su esfera de coordinación, se decidió incluir sustituyentes electrodonadores como los grupos metoxilo o metilo ($\sigma_p(-\text{OCH}_3) = -0.27$; $\sigma_p(-\text{CH}_3) = -0.17$)¹⁸⁹ o grupos electroattractores como el cloro ($\sigma_p(-\text{Cl}) = 0.23$)¹⁸⁹ en posición 4,4' del ligando bpy (**Figura 49**).

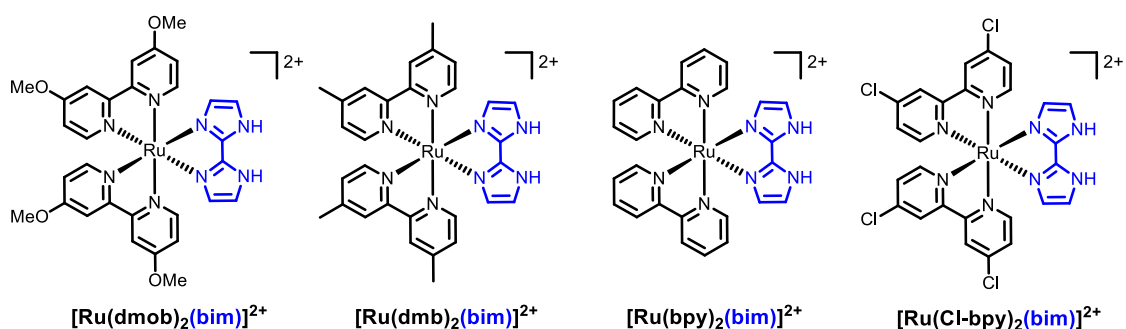


Figura 49. Estructura química de los complejos de Ru(II) luminiscentes propuestos como fotosensibilizadores de especies reactivas de oxígeno.

La síntesis de los complejos luminiscentes $[\text{Ru}(\text{dmob})_2(\text{bim})]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{bim})]^{2+}$ y $[\text{Ru}(\text{Cl-bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (dmob, 4,4-dimetoxi-2,2'-bipiridina; dmb, 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina; Cl-bpy, 4,4'-dicloro-2,2'-bipiridina) no se ha descrito en bibliografía. Los bis-complejos (*cis*- $[\text{Ru}(\text{NN})_2\text{Cl}_2]$) se obtuvieron siguiendo un protocolo diferente¹⁹⁶ con la excepción del *cis*- $[\text{Ru}(\text{dmb})_2\text{Cl}_2]$ que se prepara a través del procedimiento general mostrado en la **Figura 24**. Brevemente, sobre una mezcla de tricloruro de Ru(III), LiCl y el ligando correspondiente en etilenglicol/agua 3:1 (v/v) a 120 °C, se añaden 2 equivalentes de glucosa y se deja 10 min a esta temperatura. Por último, se añaden 0.5 equivalentes de ácido ascórbico y la mezcla se deja otros 30 min para finalmente precipitar el complejo con la adición de disolución saturada de NaCl. La adición de azúcares reductores nos ha permitido la obtención de complejos con ligandos poco quelantes como la 4,4'-dicloro-2,2'-bipiridina (Cl-bpy). Los desplazamientos químicos de los protones en ^1H -RMN (300 MHz) para los tres complejos de Ru(II) preparados se muestran en la **Tabla 8** (los H se asignan según la **Figura 25**). Los cambios más drásticos con la coordinación se aprecian en la señal de los H_δ ; para el complejo con el ligando bpy sustituido en 4,4' con un grupo metoxilo, la señal de H_δ aparece a 7.94 ppm, mientras que en el complejo $[\text{Ru}(\text{Cl-bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ estos H_δ aparecen más desapantallados, a 8.50 ppm, un valor por encima del observado para el complejo con ligandos bpy sin sustituir $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($\delta_{\text{H}_\delta} = 8.42$ ppm).

Tabla 8. Desplazamientos químicos de los protones de los complejos heterolépticos $[\text{Ru}(\text{dmob})_2(\text{bim})]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{bim})]^{2+}$ y $[\text{Ru}(\text{Cl-bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ en CD_3CN (la notación sigue la indicada en la Figura 25).

$^1\text{H-RMN}$	H_δ	$\text{H}_{\alpha'}$	H_α	$\text{H}_{\beta'}$	H_β	H_5	H_4	$\text{CH}_{3\text{B}}$	$\text{CH}_{3\text{A}}$
$[\text{Ru}(\text{dmob})_2(\text{bim})]^{2+}$	7.94	7.63	7.63	6.98	6.89	7.26	6.46	3.99	3.97
$[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{bim})]^{2+}$	8.26	7.72	7.62	7.25	7.14	7.26	6.41	2.54	2.49
$[\text{Ru}(\text{Cl-bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$	8.50	7.82	7.79	7.49	7.38	7.21	6.38		

Por último, la gran mayoría de los FSs aplicados a terapias fotodinámicas destacan por su elevado carácter lipofílico.¹⁹⁷ Por ello, se decidió preparar también dos complejos Ru(II)-bim con ligandos auxiliares más hidrofóbicos que el ligando bpy sin sustituir ($\log P = 1.69 \pm 0.25$). En concreto, se incorporaron dos unidades del ligando 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina (tmp) o del ligando 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (dip) cuyos $\log P$ son 4.16 ± 1.00 o 6.16 ± 1.25 , respectivamente (**Figura 50**).

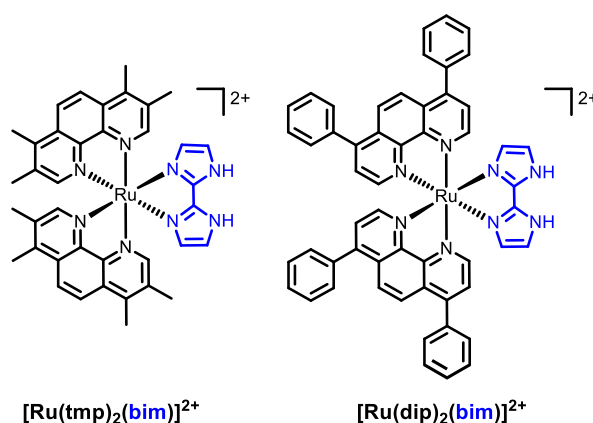


Figura 50. Estructura química de los complejos de Ru(II) hidrofóbicos propuestos como fotosensibilizadores de especies reactivas de oxígeno.

4.2 Caracterización espectroscópica

Las propiedades espectroscópicas de los complejos de Ru(II) empleados como FSs de ROS se recogen en la **Tabla 9**. Los datos se han extraído de los espectros de absorción y emisión de los complejos de Ru(II) (**Figura 51**).

Tabla 9. Parámetros espectroscópicos de los fotosensibilizadores en MeCN equilibrado al aire.

Complejo	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$ ($\epsilon/10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ^a	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}/\text{nm}$ ^a	τ_1/ns (B_1) ^b	τ_2/ns (B_2) ^b	τ_m/ns ^c
[Ru(dmob) ₂ (bim)] ²⁺	277 (51.0), 352 (12.5), 489 (8.5)	699	34	–	34
[Ru(dmb) ₂ (bim)] ²⁺	288 (62.3), 343 (11.3), 480 (9.2)	679	41 (17625)	85 (2949)	47
[Ru(bpy) ₂ (bim)] ²⁺	288 (72.4), 340 (10.8), 477 (9.4)	674	64 (24314)	108 (542)	65
[Ru(Cl-bpy) ₂ (bim)] ²⁺	293 (71.4), 346 (15.5), 505 (11.7)	709	65 (6869)	264 (373)	76

a) Incertidumbre: $\lambda \pm 1 \text{ nm}$; $\epsilon \pm 1\%$. b) Tiempos de vida de luminiscencia (τ) medidos por SPT ($\lambda_{\text{exc}} = 463 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} =$ máximo de emisión de cada complejo de Ru(II)), a $(25.0 \pm 0.1) \text{ }^\circ\text{C}$; la cinética de luminiscencia de los complejos de Ru(II) se ajustó a la ecuación: $I_L = B_0 + \sum_i B_i \tau_i$, siendo i el mínimo número de exponenciales necesarias para conseguir un $\chi^2 \leq 1.2$; incertidumbre estimada: $\tau_i \pm 3\%$. c) Tiempo de vida de luminiscencia ponderado pre-exponencialmente calculado por la ecuación: $\tau_m = \sum_i B_i \tau_i / \sum_i B_i$; incertidumbre estimada $\tau_m \pm 1\%$.

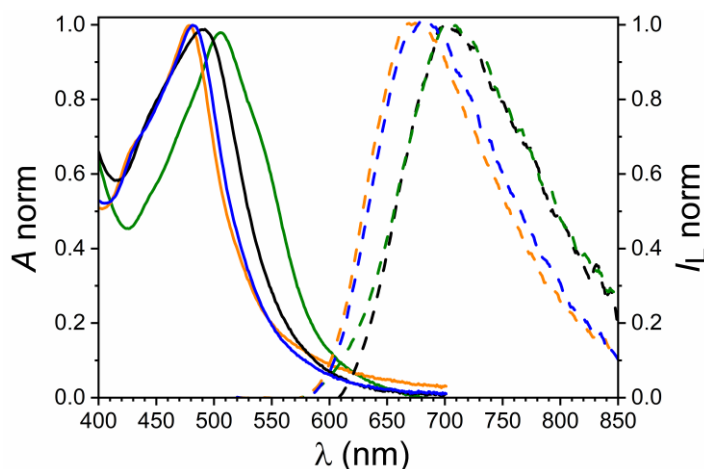


Figura 51. Espectros (normalizados) de absorción UV-Vis y de luminiscencia ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$) de los complejos [Ru(dmob)₂(bim)]²⁺ (negro), [Ru(dmb)₂(bim)]²⁺ (azul), [Ru(bpy)₂(bim)]²⁺ (naranja) y [Ru(Cl-bpy)₂(bim)]²⁺ (verde). Los espectros de emisión se han corregido por la respuesta del instrumento.

Los complejos de Ru(II) muestran una banda ancha de absorción con máximos centrados entre 477 y 505 nm correspondiente a la transición electrónica de menor energía $d \rightarrow \pi^*$ (MLCT). Como se muestra en la **Tabla 9**, la funcionalización del ligando bipyridina con sustituyentes electrodonadores o electroattractores induce un desplazamiento batocrómico de sus máximos de absorción con respecto al complejo sin sustituir. La presencia de sustituyentes electrodonadores en posiciones conjugadas con respecto al nitrógeno heterocíclico aumenta el carácter básico (σ -dador) de los átomos de nitrógeno que complejan al catión metálico, mientras que los grupos electroattractores inducen el efecto contrario disminuyendo su basicidad ($\downarrow\sigma$ -dador). Por otra parte, el carácter π -aceptor de un ligando aumenta a medida que lo hace la deficiencia de electrones en el anillo aromático, estabilizando por retrocesión π el estado excitado emisor ($^3\text{MLCT}$), este efecto se ve acusado en presencia de sustituyentes electroattractores con efecto $-R$. Mientras que sustituyentes electrodonadores como el $-\text{OCH}_3$ o el $-\text{CH}_3$ hacen disminuir la retrocesión π por incremento de la energía de los orbitales $\pi(t_{2g})$ del metal (debido a la elevada energía de sus orbitales π^*), sustituyentes electroattractores como el Cl, estabilizan los orbitales $\pi(t_{2g})$. Ambos efectos provocan una disminución de la separación

HOMO-LUMO y, consecuentemente, un desplazamiento batocrómico de sus máximos de absorción con respecto al complejo sin sustituir (**Tabla 9**).¹⁹⁸

La excitación de los complejos de Ru(II) en sus respectivos máximos de absorción da lugar a los espectros de emisión que se muestran en la **Figura 51**. Los máximos de luminiscencia exhiben un gran desplazamiento Stokes (entre 170 a 190 nm), dependiendo del complejo heteroléptico concreto. Como se ha explicado con anterioridad para los cambios observados en el estado fundamental, la funcionalización de los ligandos auxiliares en la familia de complejos de Ru(II) induce un desplazamiento batocrómico de sus máximos de emisión (máximos centrados entre 679 y 709 nm) con respecto al correspondiente complejo sin sustituir (671 nm).

Como se ha mencionado en la sección 2.2 de la Discusión integradora, la cinética de luminiscencia de estos complejos presenta al menos dos tiempos de vida de emisión debido a la presencia de diferentes especies en el estado excitado dependiendo del estado de protonación del ligando bim. La presencia del ligando bim en la esfera de coordinación del metal induce una disminución de los tiempos de vida de luminiscencia de estos complejos con respecto al complejo homoléptico $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ($0.16 \pm 0.01 \mu\text{s}$ en MeCN equilibrado al aire). Este hecho puede atribuirse a la disminución de la separación de los estados excitado y fundamental discutido previamente. Los tiempos de vida de emisión más cortos del estado excitado triplete de los complejos de Ru(II)-bim ($^3[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{bim})]^*$), será sin duda un factor limitante en la fotosensibilización de $^3\text{O}_2$ a través de una transferencia de energía o una transferencia electrónica, para la generación de $^1\text{O}_2$ ó de $\text{O}_2^{\cdot-}$, respectivamente.

Por último, también se han caracterizado espectroscópicamente los fotosensibilizadores de la familia de complejos de Ru(II)-bim que contienen ligandos más hidrofóbicos. Sus propiedades más características se recogen en la **Tabla 10**. Los datos espectrales se han extraído de la absorción y la emisión de los complejos que se muestra en la **Figura 52**.

Tabla 10. Parámetros espectroscópicos de los fotosensibilizadores hidrofóbicos en MeCN equilibrado al aire.

Complejo	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$ ($\epsilon/10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ^a	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}/\text{nm}$ ^a	τ_1/ns (B_1) ^b	τ_2/ns (B_2) ^b	τ_3/ns (B_3) ^b	τ_m/ns ^c
$[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$	270(115.4), 461(15.6)	650	6 (15589)	31 (6758)	81 (2321)	18
$[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bim})]^{2+}$	277(79.6), 313(20.9), 491(15.3)	681	55 (238)	112(1178)	–	106

a) Incertidumbre: $\lambda \pm 1 \text{ nm}$; $\epsilon \pm 1\%$. b) Tiempos de vida de luminiscencia (τ) medidos por SPT ($\lambda_{\text{exc}} = 463 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} =$ máximo de emisión de cada complejo de Ru(II)), a $(25.0 \pm 0.1) \text{ }^\circ\text{C}$; la cinética de luminiscencia de los complejos de Ru(II) se ajustó a la ecuación: $I_L = B_0 + \sum_i B_i \tau_i$, siendo i el mínimo número de exponenciales necesarias para conseguir un $\chi^2 \leq 1.2$; incertidumbre estimada: $\tau_i \pm 3\%$. c) Tiempo de vida de luminiscencia ponderado pre-exponencialmente calculado por la ecuación: $\tau_m = \sum_i B_i \tau_i / \sum_i B_i$; incertidumbre estimada $\tau_m \pm 1\%$.

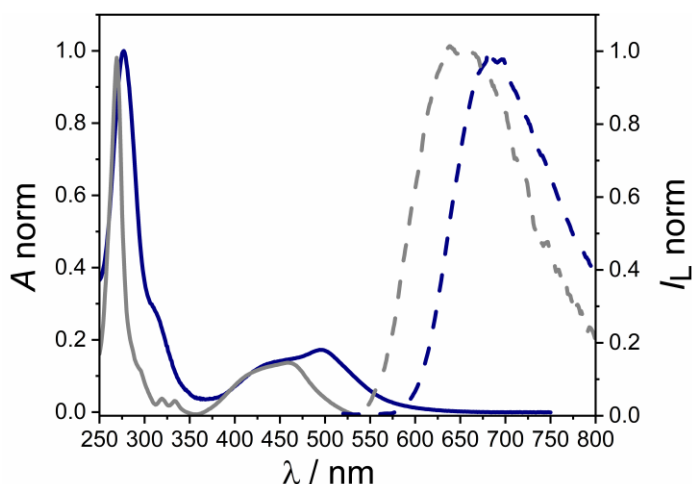


Figura 52. Espectros (normalizados) de absorción UV-Vis y de luminiscencia de los complejos $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ (gris, $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$) y $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bim})]^{2+}$ (azul, $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$). Los espectros de emisión se han corregido por la respuesta del instrumento.

Estos complejos de Ru(II)-bim muestran una banda ancha de absorción con máximos centrados entre 461 y 491 nm correspondiente a la transición electrónica de menor energía $d \rightarrow \pi^*$ (MLCT). La intensa absorción extendida al verde de la familia de complejos de Ru(II)-bim podría constituir una ventaja con respecto a otros complejos de Ru(II) en su aplicación en terapias fotodinámicas. La incorporación de ligandos dotados con estructuras policíclicas de conjugación extensa como el 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (dip) permite una eficaz deslocalización del electrón fotoexcitado con el consiguiente aumento del tiempo de vida del complejo, siendo el $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bim})]^{2+}$ el fotosensibilizador con mayor τ de la familia de complejos de Ru(II)-bim (106 ns). Este hecho aumentará la eficiencia de desactivación del estado excitado $^3\text{MLCT}$ por el O_2 induciendo la generación de ROS.

4.3. Rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$

Con el objetivo de determinar la influencia que tiene el oxígeno molecular en el estado excitado triplete de los complejos de Ru(II), se decidió determinar las constantes de desactivación bimolecular por el O_2 en MeCN. En la **Tabla 11** se muestran los tiempos de vida de luminiscencia de los complejos de Ru(II) estudiados en disoluciones equilibradas en aire o saturadas con argón u oxígeno. Dado que la cinética de desactivación de la luminiscencia de los fotosensibilizadores presenta un ajuste bi-exponencial, se calcularon los tiempos de vida de luminiscencia ponderados pre-exponencialmente (τ_m). Las constantes de velocidad de desactivación molecular (k_q) se han determinado a partir de las pendientes de las representaciones Stern-Volmer (τ_{m0}/τ_m vs. $[\text{O}_2]$) y sus respectivos tiempos de vida en ausencia de O_2 (τ_0) según la ecuación 6. Como se muestra en la **Tabla 11** se han determinado valores de k_q cercanos al control por difusión de las propias moléculas en el medio ($\approx 2 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$

en agua),¹⁹⁹ mostrando por consiguiente, una gran eficiencia de desactivación de la luminiscencia de los complejos de Ru(II) por el O₂.

Tabla 11. Tiempos de vida de luminiscencia y constantes de desactivación bimolecular con oxígeno de los complejos de Ru(II) en MeCN.

Complejo	τ_m/ns^a			$k_q/10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1b}$
	Argon	Aire	Oxígeno	
[Ru(dmob) ₂ (bim)] ²⁺	55	34	14	7.0 (0.04)
[Ru(dmb) ₂ (bim)] ²⁺	107	47	17	6.5 (0.2)
[Ru(bpy) ₂ (bim)] ²⁺	139	65	22	5.0 (0.02)
[Ru(Cl-bpy) ₂ (bim)] ²⁺	111	75	34	2.7 (0.01)

a) Tiempo de vida de luminiscencia ponderado pre-exponencialmente (τ_m) estimado a partir de la ec: $\tau_m = \sum_i B_i \tau_i / \sum_i B_i$; incertidumbre estimada de $\tau_m \pm 1\%$. Temperatura (25.0 \pm 0.1) °C b) Calculado a partir de la ec. de Stern-Volmer: $\frac{\tau_{m0}}{\tau_m} = 1 + k_{SV}[O_2]$. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de las medidas (s_{n-1}).

El rendimiento cuántico de producción de ¹O₂ (Φ_A) se ha determinado directa e indirectamente. En el método directo se mide la débil señal de fosforescencia del ¹O₂ a 1270 nm tras la excitación del complejo de Ru(II) con un láser de Nd-YAG a 355 nm. Los experimentos de fotogeneración de ¹O₂ se llevaron a cabo en disoluciones equilibradas al aire de MeCN anhidro. Ya que estamos estudiando la aplicabilidad de estos compuestos como posibles fotosensibilizadores de tipo I y tipo II en medios biológicos, además de MeCN, se decidió medir también la producción de ¹O₂ en óxido de deuterio (D₂O). El empleo de D₂O en vez de H₂O se debe a que el tiempo de vida del ¹O₂ es mayor en este disolvente ($\tau_A = 66$ vs. 3.5 μ s), aumentando por consiguiente la intensidad de la señal y la sensibilidad de la técnica. Como FSs de referencia se emplearon el tris[(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)] rutenio(II) ([Ru(dip)₃]²⁺, $\Phi_A = 0.94 \pm 0.07$ en MeCN a 711 mmHg, determinado por nosotros respecto a fenalenona patrón, $\Phi_A = 0.98 \pm 0.07$ ²⁰⁰ en MeCN) y el tris[(1,10-fenantrolina-4,7-bis(fenil-4-sulfonato)]rutenio(II) ([Ru(s2d)₃]⁴⁺, $\Phi_A = 0.43 \pm 0.04$ ²³ en D₂O). Con el fin de asegurar la adecuada absorción de fotones por cada FS, se ha de ajustar la absorbancia entre 0.2 y 0.3 a la longitud de onda de excitación. En este caso, la absorción de los complejos de Ru(II) estudiados se ajustó a 0.25 a 355 nm.

El método empleado para el cálculo del Φ_A se basa en la comparación de las diferentes señales obtenidas a distintas energías del pulso láser de excitación (355 nm; 50 – 800 mJ). La cinética de desactivación del ¹O₂ se ajusta a una ecuación exponencial con el fin de eliminar la emisión residual del ³MLCT* de los complejos de Ru(II) que se extiende al infrarrojo cercano y que solapa con la desactivación del ¹O₂, mucho más lenta (ver **Figura 53**). Después de extrapolar las intensidades de la señal de ¹O₂ al final del pulso láser (x_0) dentro de cada una de las curvas de decaimiento exponencial, los valores de las ordenadas en el origen obtenidos para

las diferentes energías del pulso láser se representan en función de éstas. A partir del ajuste lineal de esta representación, se obtienen dos pendientes (la del FS de referencia y la del complejo estudiado) que se emplean para el cálculo del Φ_{Δ} a través de la Ecuación 9, siendo A las respectivas absorbancias a 355 nm:

$$\Phi_{\Delta}(Ru-bim) = \Phi_{\Delta}^{ref} \times \frac{pdte(Ru-bim)}{pdte(ref)} \times \frac{A_{ref}}{A_{Ru-bim}} \quad (9)$$

Los resultados obtenidos para dichos disolventes quedan recogidos en la **Tabla 12**. En todos los casos, el Φ_{Δ} obtenido para los complejos de Ru(II) preparados son menores que los de su análogo homoléptico $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ en disolvente orgánico ($\Phi_{\Delta} = 0.73 \pm 0.05$).²⁰¹ La menor producción de 1O_2 por parte de los complejos de Ru(II)-bim se debe, al menos en parte, a sus menores tiempos de vida de luminiscencia ($\tau_0 \approx 0.1 \mu s$ en disoluciones de MeCN en ausencia de O_2) en comparación con el $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ en el mismo disolvente y condiciones ($\tau_0 = 0.87 \mu s$).¹⁸³ En D_2O no se pudo apreciar señal alguna de 1O_2 (**Figura 53b**) para los complejos estudiados. Este efecto puede deberse a la menor concentración de O_2 disuelto en agua con respecto al MeCN ($8.10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ en MeCN a presión atmosférica²⁰² y $2.70 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ en H_2O a 0.213 bares de presión¹⁹⁷ que, corregidos teniendo en cuenta que la concentración de O_2 en la atmósfera es del 21% y a la presión de 711 mmHg medidos en el laboratorio, proporcionan una concentración de O_2 disuelto de $1.59 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ en MeCN y $2.52 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ en H_2O). Por otra parte, la solvatación del 1O_2 se ve favorecida en disolvente orgánico mientras que el agua favorece la producción de especies cargadas como el $O_2^{\cdot-}$ por la fotosensibilización de tipo I. Otro factor para tener en cuenta es la posible disminución del tiempo de vida de luminiscencia de los complejos de Ru(II)-bim por su desprotonación parcial en agua.

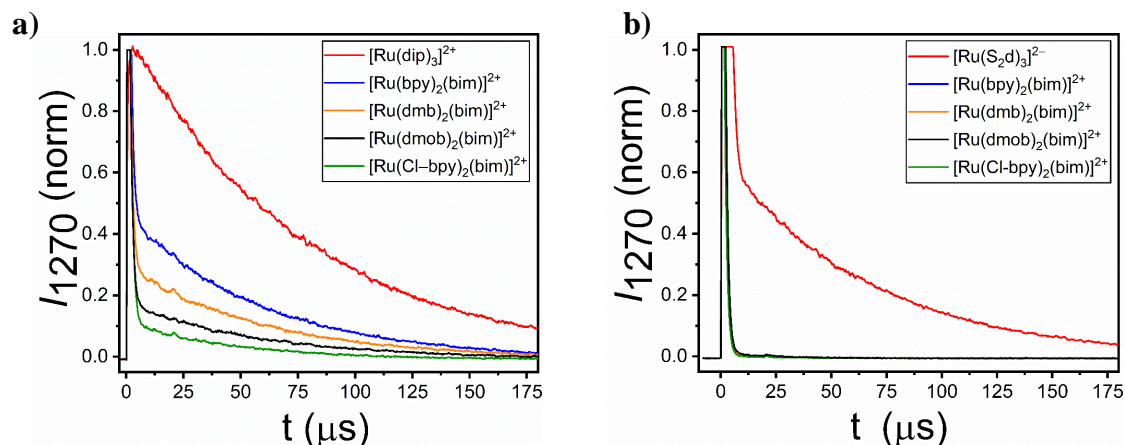


Figura 53. a) Cinética de emisión a 1270 nm tras excitación con un láser de Nd:YAG pulsado (3 ns cada pulso a 355 nm; las cinéticas en la figura son la suma de 40 pulsos). El rendimiento cuántico de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) se ha medido empleando como referencia el $[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}$ en MeCN (a) ($\Phi_{\Delta} = 0.94 \pm 0.07$) o el $[\text{Ru}(\text{s}2\text{d})_3]^{4-}$ en D_2O (b) ($\Phi_{\Delta} = 0.43 \pm 0.04$). En todos los casos la absorbancia a 355 nm de las disoluciones equilibradas al aire de los complejos de Ru(II) se ajustó a 0.25.

Tabla 12. Rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete de los complejos de Ru(II) investigados, determinados mediante el método directo o indirecto (ver texto).

Complejo	Φ_{Δ} (MeCN) directo ^a	Φ_{Δ} (MeCN) indirecto ^b	Φ_{Δ} (D_2O) directo ^a	Φ_{Δ} (H_2O) indirecto ^c
$[\text{Ru}(\text{dmob})_2(\text{bim})]^{2+}$	0.19 ± 0.03	0.17 ± 0.04	< 0.01	0.06
$[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{bim})]^{2+}$	0.26 ± 0.04	0.32 ± 0.06	< 0.02	0.09
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$	0.40 ± 0.05	0.44 ± 0.10	< 0.02	0.20
$[\text{Ru}(\text{Cl-bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$	0.10 ± 0.02	0.16 ± 0.03	< 0.01	0.02

a) El Φ_{Δ} se calcula utilizando como referencia el $[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}$ siendo su $\Phi_{\Delta} = 0.94 \pm 0.07$ en MeCN (disoluciones equilibradas al aire a $(23.0 \pm 0.1) ^\circ\text{C}$; $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$; $A_{355} = 0.25$ para todas las disoluciones de los complejos de Ru(II)). b) El Φ_{Δ} se calcula utilizando como referencia el $[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}$ y el DPBF como sonda aceptora ($8.0 \mu\text{mol L}^{-1}$; $\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 458 \text{ nm}$). Se emplea un LED de 32 cd a 468 nm como fuente de irradiación ($A_{468} = 0.03$ para todos los complejos de Ru(II)). c) El Φ_{Δ} se calcula utilizando como referencia el $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ siendo su $\Phi_{\Delta} = 0.22 \pm 0.02$ en H_2O , ABDA como aceptor ($5.9 \mu\text{mol L}^{-1}$; $\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 405 \text{ nm}$). Se emplea un láser de diodo de 50 mW a 450 nm como fuente de irradiación ($A_{450} = 0.07$ para todos los complejos de Ru(II)).

Para la determinación de los Φ_{Δ} a través del método indirecto se emplean dos aceptores fluorescentes: el 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) en medio orgánico y el ácido antraceno-9,10-diil-bis(metilen)dimalónico (ABDA) en medio acuoso (ver sección 2.5 de la Introducción). El DPBF es un compuesto amarillo que, en presencia del oxígeno singlete, forma un peróxido inestable que se descompone en 1,2-dibenzoilbenceno (**Figura 54a**). Se prepararon disoluciones de concentración conocida de la sonda fluorescente ($8.0 \mu\text{mol L}^{-1}$); como FS de referencia se empleó el $[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}$ en MeCN y, como fuente de irradiación, un LED de 468 nm (absorción ajustada a esta longitud de onda a $A_{468} = 0.03$). A medida que se genera $^1\text{O}_2$ se observa una disminución de la fluorescencia del DPBF debido a la fotooxidación de la molécula (**Figura 54b-f**). Como control, se irradia el mismo tiempo el aceptor fluorescente en ausencia del fotosensibilizador, confirmando que la desactivación de su fluorescencia se debe a la formación

de $^1\text{O}_2$ en el medio y no a la propia fotodegradación de la sonda. El experimento control queda detallado en la **Figura 54g**, donde se observa que una pequeña parte del DPBF se descompone al ser irradiado. Para determinar el Φ_Δ se estudia el porcentaje de desactivación provocado por la formación de $^1\text{O}_2$ por parte de cada complejo de Ru(II). En este caso, los valores se corrigen por el porcentaje de fotodegradación de la molécula observado.

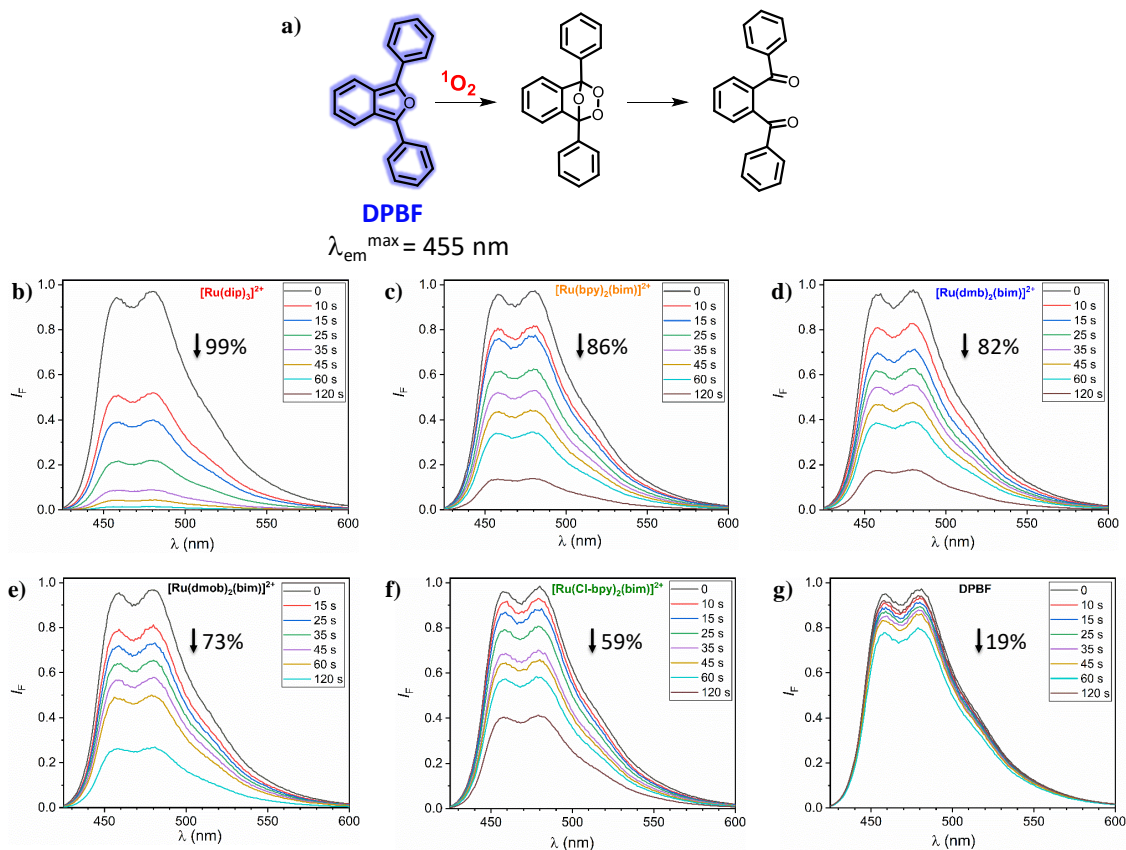


Figura 54. a) DPBF como sonda específica para la determinación de $^1\text{O}_2$. Espectro de emisión del DPBF en MeCN ($8.0 \mu\text{mol L}^{-1}$; $\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 458 \text{ nm}$) tras ser irradiado durante diferentes tiempos (0 – 2 min) con un LED de 468 nm en presencia de $[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}$ (b), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (c), $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{bim})]^{2+}$ (d), $[\text{Ru}(\text{dmob})_2(\text{bim})]^{2+}$ (e), $[\text{Ru}(\text{Cl-bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (f) y en ausencia de fotosensibilizador (g). La absorbancia de los complejos a 468 nm se ajustó a 0.03.

Los Φ_Δ de los FSs estudiados también se determinaron a través de este método indirecto en disoluciones acuosas. Para ello, se empleó el ABDA como sonda selectiva de $^1\text{O}_2$. Los cuatro ácidos carboxílicos presentes en la estructura química del antraceno favorecen la solubilidad en agua del aceptor (**Figura 55a**). El ABDA es una sonda fluorescente que reacciona con $^1\text{O}_2$ produciendo un endoperóxido que rompe la estructura electrónica del antraceno, disminuyendo drásticamente su fluorescencia. Como FS de referencia se emplea el $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ cuyo Φ_Δ en este disolvente es 0.22 ± 0.02 .²⁰¹ Al igual que en el caso anterior, se prepararon disoluciones de ABDA ($5.9 \mu\text{mol L}^{-1}$) en presencia de los diferentes FSs, utilizando como fuente de irradiación un láser de diodo a 450 nm (absorción ajustada a esta longitud de onda a $A_{450} = 0.07$). Seguidamente, se registra la fluorescencia de la sonda después de irradiar a diferentes intervalos

de tiempo (**Figura 55b-f**). El experimento control (**Figura 55g**) confirma que la disminución de la luminiscencia observada se debe a la producción de $^1\text{O}_2$.

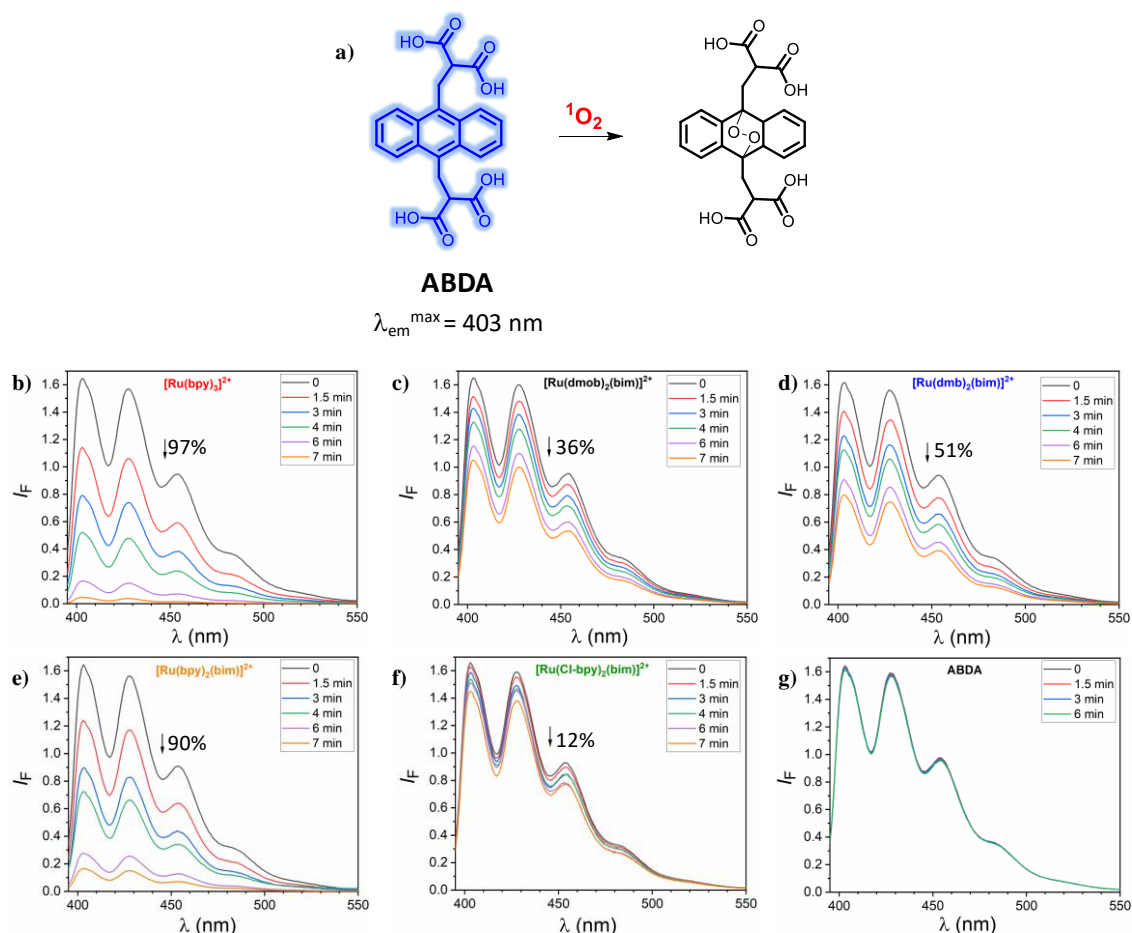


Figura 55. a) ABDA como sonda específica para la determinación de $^1\text{O}_2$. Espectro de emisión del ABDA en H_2O ($5.9 \mu\text{mol L}^{-1}$; $\lambda_{exc} = 375 \text{ nm}$; $\lambda_{em}^{max} = 405 \text{ nm}$) tras ser irradiado diferentes tiempos (0 – 7 min) con un láser diodo a 450 nm en presencia de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (b), $[\text{Ru}(\text{dmob})_2(\text{bim})]^{2+}$ (c), $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{bim})]^{2+}$ (d), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (e), $[\text{Ru}(\text{Cl-bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (f) y en ausencia de fotosensibilizador (g). La absorbancia de los complejos a 450 nm se ajustó a 0.07.

Como se muestra en la **Tabla 12**, existe una buena correlación entre los valores de Φ_Δ obtenidos de forma directa e indirecta en MeCN, lo que corrobora la fiabilidad y reproducibilidad de ambos métodos, siendo el $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ el fotosensibilizador con mayor rendimiento cuántico de generación de esta ROS. Sin embargo, los valores obtenidos en medio acuoso difieren entre ambos métodos (**Tabla 12**). Este efecto puede deberse a las posibles interacciones electrostáticas que puedan establecer los complejos de Ru(II) con el ABDA en este medio, favoreciendo la proximidad de ambas moléculas y aumentando el Φ_Δ determinado por el método indirecto.

Los complejos de Ru(II) en su estado triplete pueden reaccionar con el O_2 a través de la reacción tipo I para generar anión superóxido, a través de la reacción tipo II para generar

oxígeno singlete o pueden desactivar su luminiscencia a través de una colisión física con el $^3\text{O}_2$. Por ello, se decidió calcular la fracción de estados excitados triplete desactivados por el O_2 ($P_{\text{O}_2}^T$) y la eficiencia de formación de $^1\text{O}_2$ (f_{Δ}^T) por los complejos de Ru(II)-bim. El valor de $P_{\text{O}_2}^T$ puede determinarse experimentalmente a partir del tiempo de vida de emisión en aire del complejo y su constante de desactivación con el O_2 (k_q) (Ecuación 10):

$$P_{\text{O}_2}^T = \frac{k_q[\text{O}_2]}{k_r + k_{nr} + k_q[\text{O}_2]} = \tau k_q [\text{O}_2] \quad (10)$$

El valor de f_{Δ}^T también puede calcularse experimentalmente a partir de la Ecuación 11, asumiendo que el rendimiento cuántico de cruce intersistemas para complejos de Ru(II) con ligandos poliazaheteroaromáticos es igual a 1:

$$f_{\Delta}^T = \frac{\Phi_{\Delta}}{P_{\text{O}_2}^T \Phi_{\text{CIS}}} = \frac{\Phi_{\Delta}}{P_{\text{O}_2}^T} \quad (11)$$

Los valores de Φ_{Δ} , $P_{\text{O}_2}^T$ y f_{Δ}^T se recogen en la **Tabla 13**. Los valores obtenidos experimentalmente para cada complejo de Ru(II)-bim se comparan con el complejo homoléptico $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Este complejo presenta un valor de $P_{\text{O}_2}^T$ de 0.73 lo que indica que su estado excitado triplete se desactiva eficientemente por la molécula de O_2 . Sin embargo, los complejos de Ru(II)-bim presentan valores de $P_{\text{O}_2}^T$ menores del 50%, es decir, sólo uno de cada dos estados excitados se desactiva por el oxígeno molecular y no por vías unimoleculares.

Además, el $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ destaca por su gran eficiencia de producción de $^1\text{O}_2$ ya que el 100% de sus estados excitados triplete generan eficazmente esta especie por transferencia de energía al O_2 en medio orgánico ($f_{\Delta}^T = 1.0$). En cambio, los complejos de Ru(II)-bim presentan valores de f_{Δ}^T en torno a 0.77 – 0.32. Dentro de los cuatro complejos estudiados, el $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ presenta la mayor eficacia para la producción de esta especie reactiva, bajando al 50% para los complejos con sustituyentes electrodonadores. También se observa que la incorporación de sustituyentes electroattractores penaliza la formación de esta especie. Este hecho puede deberse a que el complejo $[\text{Ru}(\text{Cl-bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ presente una mayor accesibilidad al estado excitado ^3MC debido a la presencia de ligandos poco σ -donadores y considerablemente π -deficientes. Dado el elevado porcentaje de estados desactivados por el oxígeno que no producen eficientemente $^1\text{O}_2$, existirán otras rutas de desactivación distintas cuya participación sea análoga a los valores presentados en la **Tabla 13** como la transferencia electrónica al O_2 para la formación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ o la propia colisión física del estado excitado triplete con el O_2 volviendo a su estado fundamental. Cabe destacar que estas vías no tienen lugar para otros complejos de Ru(II) como el $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, al menos en medio orgánico.

Tabla 13. Rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$, fracción de estados excitados $^3\text{MLCT}^*$ desactivados por el oxígeno molecular ($P_{\text{O}_2}^T$) y fracción de estados excitados $^3\text{MLCT}^*$ desactivados por el oxígeno molecular que dan lugar a $^1\text{O}_2$ (f_{Δ}^T) en acetonitrilo.

Complejo	Φ_{Δ} (MeCN)	$P_{\text{O}_2}^T$ ^a	f_{Δ}^T ^b
[Ru(bpy) ₃] ²⁺	0.73 ± 0.05	0.73	1.00
[Ru(dmob) ₂ (bim)] ²⁺	0.19 ± 0.03	0.38	0.50
[Ru(dmb) ₂ (bim)] ²⁺	0.26 ± 0.04	0.48	0.54
[Ru(bpy) ₂ (bim)] ²⁺	0.40 ± 0.05	0.52	0.77
[Ru(Cl-bpy) ₂ (bim)] ²⁺	0.10 ± 0.02	0.32	0.32

a) Calculado a partir de la ec. $P_{\text{O}_2}^T = \tau k_q [\text{O}_2]$ teniendo en cuenta que la $[\text{O}_2]$ en MeCN es 0.00159 mol L⁻¹ a 711 mmHg. b) Calculado a partir de la ec. $f_{\Delta}^T = \frac{\Phi_{\Delta}}{P_{\text{O}_2}^T}$.

Para confirmar que la transferencia electrónica al O₂ para la producción de O₂⁻ es viable termodinámicamente, se determinaron los potenciales rédox de los complejos de Ru(II)-bim en el estado fundamental y en el estado excitado en MeCN por voltamperometría cíclica. En la **Tabla 14** se recogen los valores extraídos de los voltamperogramas que se muestran en la **Figura 56**. Estos valores se obtienen a partir de los potenciales de semionda, es decir, el promedio entre el potencial anódico y catódico, correspondientes a los procesos de oxidación y reducción reversibles (Ecuación 12). Los valores obtenidos directamente se han corregido con respecto a los valores previamente tabulados para el complejo de referencia empleado, el complejo homoléptico [Ru(bpy)₃]²⁺.¹² Todos los complejos presentan una onda de oxidación (3+/2+) y dos de reducción (2+/, +/0) reversibles o cuasirreversibles.

$$E_1 = \frac{E_p^{\text{red}} + E_p^{\text{ox}}}{2} \quad (12)$$

Los potenciales de oxidación están íntimamente relacionados con la energía de los orbitales $\pi(t_{2g})$ del metal (ver sección 2.4 de la Introducción). Los valores recogidos en la **Tabla 14** muestran que la sustitución de un ligando bpy por un ligando bim se traduce en una importante disminución del potencial de oxidación: $E^{\circ}_{(\text{Ru}^{3+}/\text{Ru}^{2+})}([\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}) = 1.26 \text{ V}^{12}$ comparado con $E^{\circ}_{(\text{Ru}^{3+}/\text{Ru}^{2+})}([\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}) = 1.03 \text{ V}$. Este hecho demuestra una disminución de la retrocesión π desde los orbitales t_{2g} del metal al orbital π^* del ligando, elevando la energía de los orbitales t_{2g} con respecto al complejo homoléptico. Análogamente, la naturaleza del sustituyente en posición 4,4' de los ligandos bpy influye en el potencial de oxidación de estos complejos de Ru(II). Sustituyentes electrodoadores como el -OCH₃ hacen que el complejo [Ru(dmob)₂(bim)]²⁺ presente el menor potencial $E^{\circ}_{(\text{Ru}^{3+}/\text{Ru}^{2+})}$ de la familia de complejos de Ru(II) (0.79 V; siendo, por tanto, el complejo que más fácilmente se oxida). En cambio, la presencia de grupos electroattractores (-Cl) provoca un aumento del potencial $E^{\circ}_{(\text{Ru}^{3+}/\text{Ru}^{2+})}$ (1.14 V, i.e. menor tendencia a oxidarse). El aumento del carácter σ -dador de los ligandos bpy por los sustituyentes

electrodadores ($-\text{OCH}_3$ o $-\text{CH}_3$), incrementa la energía de los orbitales HOMO. En cambio, ligandos π -deficientes (Cl-bpy) estabilizan los orbitales t_{2g} por retrocesión π , mostrando potenciales de oxidación más altos. Como se ha comentado anteriormente, ambos efectos provocan una disminución de la separación HOMO-LUMO justificando el desplazamiento batocrómico observado en los máximos de absorción de la familia de complejos de Ru(II)-bim con respecto a sus análogos homolépticos.

Los potenciales de reducción están relacionados con la energía de los orbitales π^* de los ligandos individuales. De esta forma, se aprecia claramente que los orbitales π^* del bim o de los ligandos auxiliares se encuentran desestabilizados con respecto al ligando bpy ($E^\circ_{(\text{Ru}^{2+}/\text{Ru}^+)}([\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{bim})]^{2+}) \approx -1.70 \text{ V}$ vs. $E^\circ_{(\text{Ru}^{2+}/\text{Ru}^+)}([\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}) = -1.35 \text{ V}^{12}$).

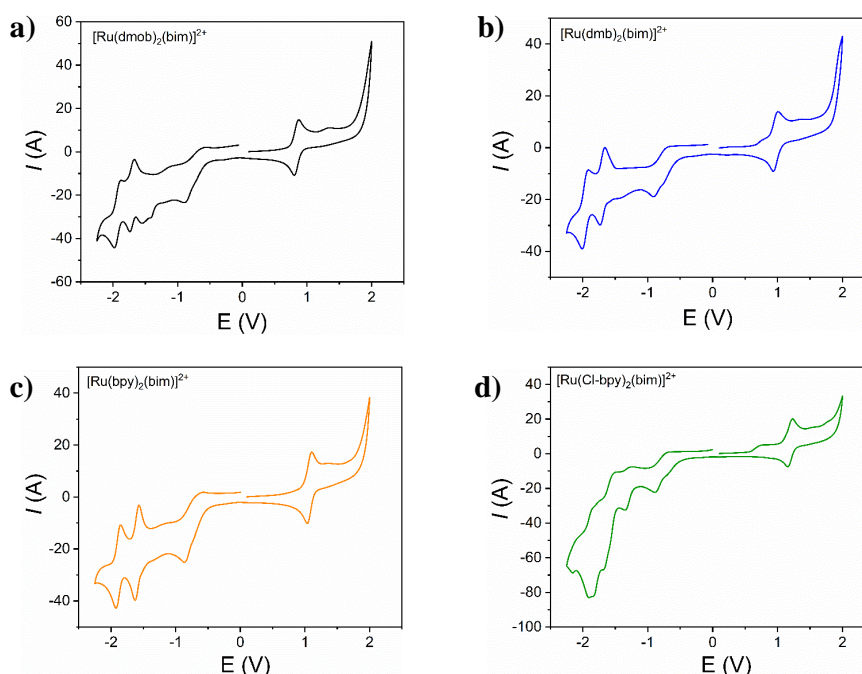


Figura 56. Voltamperometría cíclica de los complejos $[\text{Ru}(\text{dmob})_2(\text{bim})]^{2+}$ (a), $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{bim})]^{2+}$ (b), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (c) y $[\text{Ru}(\text{Cl-bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ (d) en MeCN anhidro registrado con una velocidad de scan de 50 mV s^{-1} en disoluciones purgadas con N_2 (electrodo de referencia Ag/AgCl; V vs. NHE).

Tabla 14. Potenciales rédox del estado fundamental y el estado excitado de los complejos de Ru(II) estudiados en MeCN.

Complejo	Oxidación ^a			Reducción ^a	
	$E^{\circ}_{(Ru^{3+}/Ru^{2+})}$	$E^{\circ}_{(Ru^{3+}/Ru^{2+*})}$ ^b	$E^{\circ}_{(Ru^{2+}/Ru^{+})}$	$E^{\circ}_{(Ru^{2+*}/Ru^{+})}$ ^b	$E^{\circ}_{(Ru^{+}/Ru^0)}$
[Ru(bpy) ₃] ²⁺	1.26	-0.88	-1.35	0.79	-1.53
[Ru(dmob) ₂ (bim)] ²⁺	0.79	-0.97	-1.76	0.00	-1.96
[Ru(dmb) ₂ (bim)] ²⁺	0.92	-0.90	-1.75	0.07	-1.99
[Ru(bpy) ₂ (bim)] ²⁺	1.03	-0.82	-1.65	0.20	-1.92
[Ru(Cl-bpy) ₂ (bim)] ²⁺	1.14	-0.62	-1.66	0.10	-1.92

a) Todos los potenciales en voltios respecto al electrodo normal de hidrógeno. b) Los potenciales rédox en el estado excitado se han obtenido a partir de la energía de transición 0-0 (estimada a partir del máximo de emisión de cada uno de los complejos de Ru(II) corregido por la respuesta del instrumento)²³.

Dado que la transferencia electrónica al O₂ para la formación del O₂⁻ es un proceso fotoquímico, también se han calculado los potenciales rédox en el estado excitado ³MLCT de los complejos de Ru(II). Como se ha mencionado en la Introducción, los complejos de Ru(II) se caracterizan por ser más oxidantes y reductores en su estado excitado (propiedad inherente a todas las moléculas electrónicamente excitadas). La transferencia electrónica al oxígeno molecular dependerá en gran medida de la energía relativa de los orbitales π* de los ligandos individuales. Sorprendentemente, el potencial $E^{\circ}_{(Ru^{3+}/Ru^{2+*})}$ determinado para los complejos [Ru(bpy)₃]²⁺ y [Ru(bpy)₂(bim)]²⁺ presenta valores muy similares (-0.88 vs. -0.82 V, respectivamente). Este hecho puede ser indicativo de que la transferencia electrónica (en medio orgánico) se esté llevando a cabo desde el orbital π* del ligando bpy en lugar del orbital π* del ligando bim. Además, este hecho se encuentra en concordancia con lo que previamente se había discutido en la primera publicación científica, donde se confirmaba que la densidad electrónica del complejo excitado siempre reside en los ligandos auxiliares (NN) y no en el ligando bim. Por último, se observa una buena correlación de los valores de $E^{\circ}_{(Ru^{3+}/Ru^{2+*})}$ entre los distintos complejos de Ru(II)-bim. El complejo [Ru(dmob)₂(bim)]²⁺ excitado es el que más fácilmente se oxida al tener el potencial de reducción más negativo (-0.97 V) y, a medida que aumenta el carácter electroceptor del sustituyente en 4,4' del ligando bpy (e.g. Ru(Cl-bpy)₂(bim)]²⁺, este potencial se hace menos negativo, favoreciendo su reducción (-0.62 V).

La fuerza dirigente (ΔE°) para que la transferencia electrónica al O₂ tenga lugar viene determinada por la Ecuación 13:

$$\Delta G = -nF \left(E^{\circ}_{(O_2/O_2^{\cdot-})} - E^{\circ}_{(Ru^{3+}/Ru^{2+*})} \right) \quad (13)$$

teniendo en cuenta que el potencial de reducción del par (O₂/O₂⁻) es -0.33V(SHE) a 1 atm de presión parcial de O₂ en medio acuoso mientras que en disolventes orgánicos se han medido valores polarográficos desde -0.49 a -0.65 V(SHE).^{25,203} El proceso de transferencia electrónica

es favorable para todos los complejos de Ru(II) preparados ($0.05 \text{ V} < \Delta E^\circ < 0.40 \text{ V}$, utilizando el valor promedio de los reportados para el $\text{O}_2/\text{O}_2^{\cdot-}$), siendo el complejo con los sustituyentes más electrodadores ($[\text{Ru}(\text{dmob})_2(\text{bim})]^{2+}$) el que presentaría una mayor tendencia a fotogenerar esta especie.

Los bajos (muy negativos) potenciales $E^\circ_{(\text{Ru}^{3+}/\text{Ru}^{2+})}$ de los complejos de Ru(II)-bim favorecerían la transferencia electrónica al oxígeno con la consiguiente formación del $\text{O}_2^{\cdot-}$. Por ello, se decidió estudiar la producción de esta especie con el empleo de una sonda específica, el dihidroetidio (DHE). Como se ha comentado en la Introducción, la oxidación del DHE por el $\text{O}_2^{\cdot-}$ induce la formación del 2-hidroxitetidio (OHE^+ ; especie fluorescente en el rojo). Para corroborar la supuesta formación de esta especie, se decidió irradiar con un láser de 405-nm disoluciones de los complejos de Ru(II) estudiados en presencia de DHE en medio acuoso. La absorción de los complejos de Ru(II) a 405 nm se ajustó a 0.05. Como se muestra en la **Figura 57**, se produce un aumento de la intensidad de la fluorescencia a medida que aumenta el tiempo de irradiación debido a la formación del radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, siendo el complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bim})]^{2+}$ el que presenta una mayor producción de esta especie.

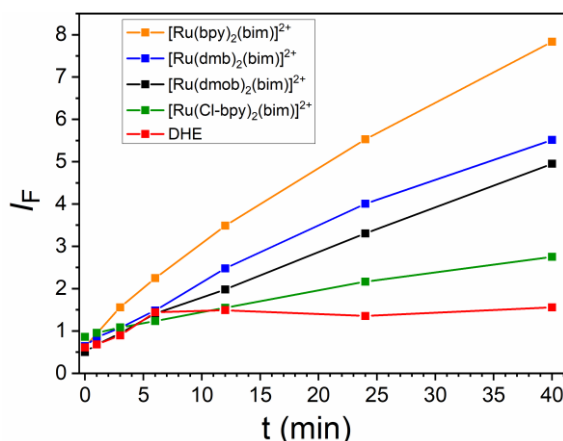


Figura 57. Evolución de la intensidad de fluorescencia del OHE^+ a 604 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$) después de irradiar con un láser de diodo (25 mW, 405-nm) la disolución de DHE ($50.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) en agua en presencia de los diferentes complejos de Ru(II). La irradiación directa del DHE produce una pequeña cantidad de OHE^+ .²⁰⁴

La caracterización fotoquímica de los fotosensibilizadores lipofílicos se recoge en la **Tabla 15**. Sus propiedades espectroscópicas y su capacidad para fotosensibilizar ROS se compararon con sus análogos homoléticos $[\text{Ru}(\text{tmp})_3]^{2+}$ y $[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}$. Como se ha mencionado anteriormente, la incorporación del ligando bim en la esfera de coordinación del metal disminuye significativamente la luminiscencia de los complejos de Ru(II), mostrando tiempos de vida mucho más cortos (0.9 vs. 5.4 μs y 0.10 vs 0.46 μs en ausencia de O_2 para los complejos heteroléticos vs. homoléticos con ligandos dip y tmp, respectivamente). Los largos tiempos de

vida del estado excitado triplete de los complejos homolépticos aseguran una óptima desactivación colisional con el O₂, lo que se refleja en elevados valores de Φ_{Δ} en comparación con los complejos de Ru(II)-bim (**Tabla 15**). Mientras que el [Ru(dip)₃]²⁺ y el [Ru(tmp)₃]²⁺ presentan rendimientos cuánticos de producción de ¹O₂ en CH₃CN/aire de 0.94 ± 0.07 y 0.80 ± 0.05 , los Φ_{Δ} determinados para el [Ru(dip)₂(bim)]²⁺ y el [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ son 0.57 ± 0.09 y 0.22 ± 0.05 , respectivamente. Cabe destacar que el [Ru(dip)₂(bim)]²⁺ es el complejo que presenta un mayor Φ_{Δ} de toda la familia de complejos Ru(II)-bim. Este hecho se debe a que presenta ligandos con estructura aromática extendida y, por consiguiente, exhibe una cinética de desactivación de su luminiscencia más larga ($\tau_0 = 0.96 \mu\text{s}$ en ausencia de O₂). Por último, los análogos homolépticos destacan por su elevada eficiencia de producción de ¹O₂ ya que el 100% de los estados excitados tripletes promueven la formación de esta especie en acetonitrilo ($f_{\Delta}^T = 1.0$). Al igual que se ha comentado anteriormente, la incorporación del bim promueve otras rutas distintas a la transferencia de energía al O₂, ya que solo el 60% de las moléculas ³[Ru(NN)₂(bim)]^{2+*} inducen la formación de ¹O₂.

Tabla 15. Tiempos de vida de luminiscencia (τ), constantes de desactivación bimolecular con O₂ (k_q), rendimientos cuánticos de producción de ¹O₂ (Φ_{Δ}), fracción de estados excitados ³MLCT* desactivados por el O₂ ($P_{O_2}^T$) y fracción de estados excitados ³MLCT* desactivados por el O₂ que dan lugar a ¹O₂ (f_{Δ}^T) de los complejos [Ru(dip)₃]²⁺, [Ru(tmp)₃]²⁺, [Ru(dip)₂(bim)]²⁺ y [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ en MeCN anhidro.

Complejo	τ/ns Ar	τ/ns Aire	τ/ns O ₂	$k_q/10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1\text{c}}$	Φ_{Δ} (MeCN)	$P_{O_2}^T$ d	f_{Δ}^T e
[Ru(dip) ₃] ²⁺	5400 ^a	169 ^a	41 ^a	3.2 (0.01)	0.94 ± 0.07	0.94	1.00
[Ru(tmp) ₃] ²⁺	463 ^a	52 ^a	13 ^a	9.8 (0.02)	0.80 ± 0.05	0.81	0.99
[Ru(dip) ₂ (bim)] ²⁺	961 ^b	106 ^b	26 ^b	4.9 (0.5)	0.57 ± 0.09	0.83	0.69
[Ru(tmp) ₂ (bim)] ²⁺	103 ^b	18 ^b	7 ^b	16.7 (0.9)	0.22 ± 0.05	0.48	0.46

a) Temperatura (25.0 ± 0.1) °C; incertidumbre estimada: $\tau \pm 1\%$. b) Tiempo de vida de luminiscencia ponderado pre-exponencialmente (τ_m) estimado a partir de la ec: $\tau_m = \sum_i B_i \tau_i / \sum_i B_i$; incertidumbre estimada: $\tau_m \pm 1\%$. c) Calculado a partir de la ec. de Stern-Volmer: $\frac{\tau_{m0}}{\tau_m} = 1 + k_{SV}[O_2]$. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de las medidas (s_{n-1}). d) Calculado a partir de la ec. $P_{O_2}^T = \tau k_q [O_2]$ teniendo en cuenta que la [O₂] en MeCN es $0.00159 \text{ mol L}^{-1}$ a 711 mmHg. e) Determinado a partir de $f_{\Delta}^T = \frac{\Phi_{\Delta}}{P_{O_2}^T}$.

Las propiedades electroquímicas de ambos complejos se recogen en la **Tabla 16**. La presencia de sustituyentes electrodadores en el ligando phen induce una disminución del potencial de reducción ($3+/2+*$) favoreciendo la transferencia electrónica al oxígeno (-1.05 V). La comparación de los potenciales $E^\circ_{(Ru^{3+}/Ru^{2+})}$ del complejo [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ y su análogo homoléptico (-1.05 vs. -1.03 V , respectivamente), vuelve a confirmar que la transferencia electrónica al oxígeno molecular tiene lugar desde los ligandos auxiliares y no desde los orbitales π^* del ligando bim (más altos en energía), como en un principio se había pensado.

Tabla 16. Potenciales rédox del estado fundamental y el estado excitado de los complejos de Ru(II) hidrofóbicos estudiados en MeCN.

Complejo	Oxidación ^a			Reducción ^a	
	$E^{\circ}_{(Ru^{3+}/Ru^{2+})}$	$E^{\circ}_{(Ru^{3+}/Ru^{2+*})}$ ^b	$E^{\circ}_{(Ru^{2+}/Ru^{+})}$	$E^{\circ}_{(Ru^{2+*}/Ru^{+})}$ ^b	$E^{\circ}_{(Ru^{+}/Ru^0)}$
[Ru(tmp) ₃] ²⁺	1.04	-1.03	-1.78	0.29	-1.90
[Ru(tmp) ₂ (bim)] ²⁺	0.86	-1.05	-1.86	0.05	-2.02
[Ru(dip) ₂ (bim)] ²⁺	1.00	-0.81	-1.56	0.25	-1.77

a) Todos los potenciales en voltios respecto al electrodo normal de hidrógeno. b) Los potenciales rédox en el estado excitado se han obtenido a partir de la energía de transición 0-0 (estimada a partir del máximo de emisión de cada uno de los complejos de Ru(II) corregido por la respuesta del instrumento)²³.

La producción de O₂^{•-} tras la excitación del complejo [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ con luz azul, se ha caracterizado ampliamente (ver **Figura 1** de la tercera publicación científica) mediante el empleo de dos sondas de O₂^{•-} selectivas: i) el DHE, generando una activación de la fluorescencia en presencia de esta ROS como ya se ha indicado, o ii) el *N*-óxido de 5,5'-dimetil-1-pirrolina (DMPO), obteniendo una señal característica de resonancia de espín electrónico cuando la sonda reacciona con O₂^{•-}. En este último experimento, se realiza un control adicional: el empleo de un FS cuyo Φ_{Δ} es prácticamente uno ([Ru(dip)₃]²⁺). Este ensayo vuelve a confirmar que los complejos de Ru(II)-bim son capaces de producir esta ROS en comparación con sus análogos homolépticos (no se observa formación de aducto radicalario (DMPO/•OOH) tras irradiación de la disolución que del complejo homoléptico y la sonda atrapadora).

Para concluir, la incorporación del ligando bim en la esfera de coordinación del metal favorece la aparición de otras rutas de desactivación del estado excitado distintas a la formación de ¹O₂ en medio orgánico. Este hecho peculiar no se observa en sus respectivos análogos homolépticos, destacando así la capacidad que presentan estos complejos para fotosensibilizar ambas especies. Los resultados expuestos anteriormente, confirman que la presencia de grupos electrodoadores favorece la transferencia electrónica en el estado excitado del fotosensibilizador al O₂. Sin embargo, esto no es suficiente para reforzar el mecanismo tipo I con respecto a la formación de ¹O₂, ya que el tiempo de vida del estado excitado triplete juega un papel crucial para la formación de ambas especies. Un ejemplo claro es el [Ru(dmob)₂(bim)]²⁺. Este compuesto presenta uno de los potenciales más negativos en el estado excitado $E^{\circ}_{(Ru^{3+}/Ru^{2+*})}$ de la familia de FSs preparados (-0.97 V). Sin embargo, su tiempo de vida de emisión en ausencia de oxígeno es más corto que el correspondiente complejo sin sustituir (55 vs. 139 ns, respectivamente), limitando consecuentemente la producción de O₂^{•-} (**Figura 57**). Por ello, es importante encontrar un equilibrio entre largos tiempo de vida del estado ³MLCT del complejo de Ru(II) y potenciales de reducción muy negativos con el fin de incrementar el rendimiento de producción de O₂^{•-}.

4.4. Aplicación en terapia fotodinámica

La primera aplicación en terapia fotodinámica se realizó durante una estancia predoctoral en el grupo de la Prof. Tayyaba Hasan en el *Wellman Center for Photomedicine* de la *Harvard Medical School (Massachusetts General Hospital; MA, EEUU)* dando lugar a la tercera publicación de la presente tesis doctoral. Dentro del centro, el grupo de la Prof. Tayyaba Hasan es pionero en el empleo de la fotoquímica para el tratamiento y diagnóstico de diferentes enfermedades. Su experiencia de más de 30 años en el desarrollo de nuevas nanotecnologías aplicadas en la generación fotoquímica de $^1\text{O}_2$, así como en la síntesis y caracterización de nuevos fotosensibilizadores y las aplicaciones de éstos como fotobiocidas y en terapias fotodinámicas, complementa perfectamente uno de los principales objetivos de la presente tesis doctoral.

Una vez confirmada la capacidad de los complejos de Ru(II) para fotosensibilizar la producción de ROS, se decidió comprobar la actividad de estos compuestos como agentes fotodinámicos sobre células tumorales. Debido a la baja absorción de los complejos de Ru(II) en el rango espectral de la ventana biológica, se aplicarán tópicamente para el tratamiento de cánceres orales. Como se ha discutido en la tercera publicación, la lipofilia de estos compuestos juega un papel crucial en su actividad fotodinámica. Aquellos compuestos con un carácter más hidrofílico (ligandos bipyridina funcionalizados con distintos sustituyentes) no son capaces de quedarse anclados en la membrana celular e internalizarse. Por ello, a pesar de que estos compuestos son capaces de generar $^1\text{O}_2$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ tras ser activados con luz azul, no se observa una disminución de la viabilidad celular. En cambio, los FSs más hidrofóbicos de los que han sido diseñados y preparados ($[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ y $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bim})]^{2+}$) presentan una elevada fototoxicidad.

En primer lugar, se seleccionó el compuesto $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ como el más fotoactivo de la familia de complejos Ru(II)-bim. Su fototoxicidad fue evaluada en diferentes líneas celulares de cáncer oral: TR146 (obtenida de la mucosa bucal por metástasis de cáncer de cuello) o CAL27 (línea celular de cáncer de lengua), así como en células sanas CHO (células derivadas de ovario de hámster). Para ello, una concentración conocida de complejo de Ru(II) ($0.25 \mu\text{mol L}^{-1}$) se incubó durante 24 h a 37°C en las células. Transcurrido el tiempo, se retira la disolución y se añade PBS. Finalmente, se irradiaron las células a diferentes dosis de luz con un LED de 470 nm (**Figura 58**). La viabilidad celular se determinó mediante el conocido ensayo colorimétrico MTT, que se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), realizada por enzimas oxidoreductasas dependientes de NAD(P)H, a un compuesto de color morado (formazano). Las células con un metabolismo muy bajo no son capaces de reducir el MTT, por lo que no se observa la formación de cristales

violetas. En la **Figura 58** se muestra la elevada fototoxicidad del complejo de Ru(II) tras ser irradiado con bajas o altas dosis de luz azul ($10 - 50 \text{ J cm}^{-2}$), disminuyendo la viabilidad celular en más del 80% en ambas líneas celulares de cáncer oral. Sin embargo, este efecto es menos acusado en células sanas, confirmando una mayor acumulación del complejo en células cancerígenas (**Figura 58c**).

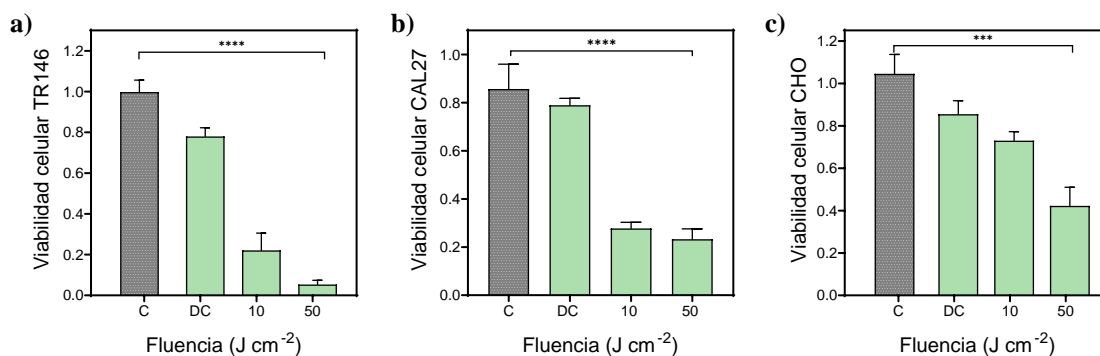


Figura 58. Toxicidad del complejo $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ ($0.25 \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre diferentes líneas celulares: a) TR146, b) CAL27 y c) CHO tras iluminación con diferentes fluencias del LED (470 nm). La viabilidad celular se evaluó con el ensayo MTT 24 h después de la irradiación ($n = 3$; **** $P < 0.0001$; análisis de varianza unidireccional).

Con el fin de aumentar la estabilidad, selectividad y solubilidad del complejo de Ru(II), se decidió encapsularlo en formulaciones de ácido hialurónico (HA) siguiendo dos estrategias distintas: en formato de hidrogeles entrecruzados de HA o en formato de NPs de HA y ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA). Mientras que las moléculas de FSs libres pueden eliminarse rápidamente tras su aplicación en la cavidad bucal, el empleo de la nanoformulación debería permitir la liberación sostenida del complejo de Ru(II), aumentando su biodisponibilidad. Además, el empleo de HA dota al nanomaterial de una mayor selectividad frente a células tumorales, debido a la gran afinidad que presenta el HA por el receptor CD44, sobreexpresado en estas células.²⁰⁵

La primera estrategia consiste en la preparación de hidrogeles con grupos lábiles tipo hidrazona capaces de degradarse en medio ácido permitiendo la liberación del FS en la cavidad bucal (las células cancerosas provocan la acidificación de su entorno). Para ello, se funcionaliza el HA con la bishidrazida del ácido adípico según un protocolo descrito en bibliografía.²⁰⁶ A continuación, fue necesario oxidar el HA con NaIO_4 para generar grupos aldehído²⁰⁷ que servirán como entrecruzante por formación del enlace hidrazona (**Figura 59**). Finalmente, los hidrogeles se obtienen tras el entrecruzamiento de los grupos hidrazida y aldehído (de las formulaciones de HA preparadas previamente) mediante la reacción de Schiff en PBS (utilizando la misma concentración de ambos componentes de la mezcla; también se prepararon geles en presencia del complejo de Ru(II), **Figura 59**). Debido a la falta de tiempo durante la

estancia en los laboratorios de la Prof. Hasan y la dificultad que conlleva trabajar con hidrogeles en estudios *in vitro*, no se evaluó la fototoxicidad de los geles preparados en células de cáncer oral.

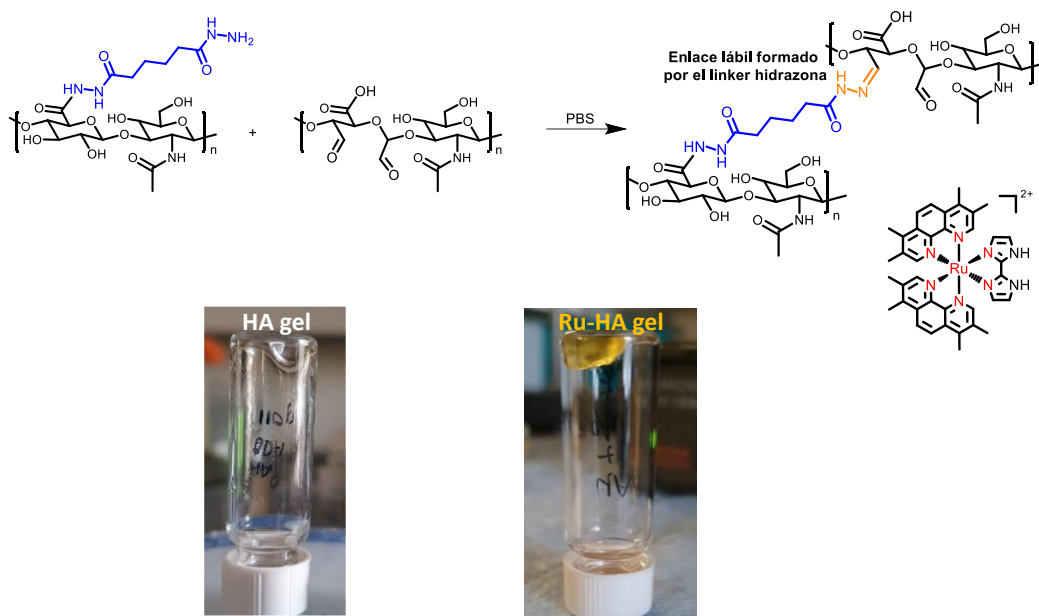


Figura 59. Esquema de la síntesis de los hidrogeles de HA que contienen el complejo [Ru(tmp)₂(bim)]²⁺ en su interior. Parte inferior: fotografías representativas de los geles preparados en ausencia y en presencia del complejo de Ru(II).

La segunda estrategia consiste en la preparación de NPs de HA y PLGA con el complejo de Ru(II) encapsulado entre las cadenas hidrofóbicas de la nanoformulación. El uso de NPs de PLGA como vehículo de transporte para la liberación controlada de FSs u otros fármacos ha sido extensamente empleado a lo largo de los años. De hecho, la administración de medicamentos y alimentos (FDA) norteamericana ha aprobado el empleo de PLGA como polímero biodegradable en aplicaciones terapéuticas. Además, el empleo de NPs en terapias frente al cáncer presenta ventajas con respecto a la distribución sistémica del fármaco libre tales como el fenómeno de permeabilidad y la retención acumulada (EPR), que favorecen la acumulación de NPs en el tejido tumoral debido a la baja vascularización linfática del tumor. Sin embargo, este factor no es suficiente para mejorar la selectividad del fármaco frente al tejido maligno. Por ello, se decidió emplear NPs de PLGA en combinación con el HA. Como se ha mencionado anteriormente, las NPs funcionalizadas con HA podrían internalizarse eficazmente *via* endocitosis tras ser reconocidas por el receptor CD44 de la membrana celular (sobrexpresado en ciertas líneas celulares).

Las características de las NPs preparadas quedan recogidas en la **Tabla 1** de la tercera publicación científica. Las NPs con el complejo de Ru(II) encapsulado (0.1 mg de complejo de Ru(II) por cada 10 mg de HA-PLGA) poseen un diámetro de (152 ± 6) nm (determinado por

dispersión dinámica de la luz), un bajo índice de polidispersidad (0.12 ± 0.05) y una eficiencia de encapsulación del (70 ± 9)%, mostrando así la considerable eficacia del protocolo de síntesis empleado. La incorporación de 0.2 mg de $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ por cada 10 mg de HA-PLGA induce un aumento significativo del diámetro de las NPs (196 ± 1) nm y del índice de polidispersidad (0.30 ± 0.14). Por ello, se decidió mantener la relación 0.1/10 (mg/mg) como el óptimo para la preparación de las NPs de HA-PLGA-Ru.

Las NPs mostraron una elevada estabilidad a pH fisiológico durante al menos 4 días, manteniéndose su diámetro alrededor de (149 ± 3) nm. Con el fin de emular el ambiente moderadamente ácido que puede encontrarse en un tejido canceroso, se evaluó la estabilidad de las NPs a pH 5. En este caso, se observó una mayor agregación de las NPs, lo que podría estar provocado por la hidrólisis de los grupos éster del PLGA catalizada en medio ácido. A pesar de ello, el tamaño se mantiene constante (224 ± 10) nm durante el mismo periodo de tiempo, confirmando la estabilidad de las NPs preparadas. A continuación, se estudió la liberación del complejo de Ru(II) de la nanoformulación a pH 7 y en presencia de la enzima hialuronidasa, responsable de la degradación del HA. Para ello, se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se midió su fluorescencia. Mientras que a las 12 h se obtuvo una liberación de $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ de (12.4 ± 0.6)% a pH fisiológico, en presencia de la hialuronidasa se obtuvo un porcentaje de liberación de (38 ± 1)%. Estos resultados remarcan que una gran mayoría del complejo de Ru(II) se queda absorbido en las cadenas hidrofóbicas del PLGA.

Para evaluar la captación celular del complejo de Ru(II) y su correspondiente nanoformulación en el interior de las células TR146, se decidió emplear dos métodos diferentes: el análisis por citometría de flujo y la microscopía confocal. Los resultados confirman que el tiempo de incubación idóneo para obtener la máxima concentración posible en el interior de dichas células es de 12 h (ver **Figura 3** y **Figura S11** de la tercera publicación científica). A través del análisis por microscopía confocal, se evaluó la localización subcelular del complejo de Ru(II) en las células TR146. Para ello, se emplearon diferentes sondas fluorescentes que tiñen específicamente algunos orgánulos de la célula (Hoechst 33342, núcleo; MitoTracker Red®, mitocondria; LysoTracker®, lisosomas). A continuación, se realizó un estudio de colocalización celular con ayuda del programa de ordenador *ImageJ*, combinando las fotografías de las células incubadas con el complejo de Ru(II) y con cada uno de los colorantes (**Figura 60**). Todos los estudios confirmaron que el complejo $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ se localiza en la mitocondria de las células. Este hecho es muy interesante, ya que la mitocondria es un orgánulo vital para la supervivencia celular, pues desempeña un papel crucial en la producción de energía y en la apoptosis celular. En particular, los sensibilizadores dirigidos a las mitocondrias pueden superar en la TFD el factor de hipoxia, lo que resulta en una alta fototoxicidad.²⁰⁸

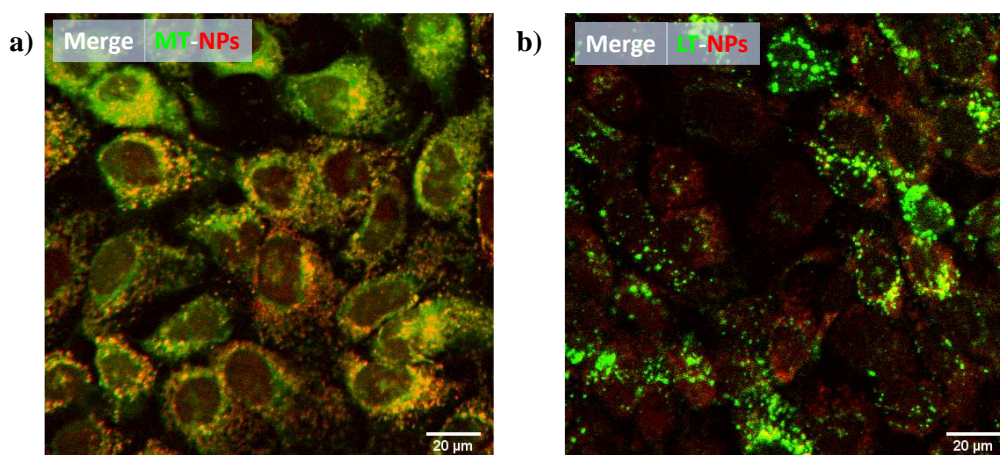


Figura 60. Análisis de la localización subcelular de $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ -HA-PLGA NPs ($1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de complejo de Ru(II) embebido en las NPs) en células TR146 bajo las siguientes condiciones: a) mitocondria teñida con MitoTracker® Red (en verde); b) lisosomas teñidos con LysoTracker® (en verde). La luminiscencia roja proviene del complejo de Ru(II). Tiempo de incubación, 24 h; escala, 20 μm .

Por último, se evaluó la fototoxicidad del complejo $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ libre y tras ser encapsulado en las NPs de HA-PLGA. Como se observa en la **Figura 5** de la tercera publicación científica, una baja dosis de luz (2.5 J cm^{-1}) ya induce una reducción de la viabilidad celular del 50%, confirmando la elevada fototoxicidad del complejo de Ru(II). Su encapsulación en las NPs de HA-PLGA permite mantener sus propiedades fotoactivas mejorando su liberación controlada y disminuyendo su toxicidad en ausencia de luz para una posible futura aplicación *in vivo*.

Adicionalmente, dada la potente fotoactividad del complejo $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ en diferentes líneas celulares, se decidió comprobar su actividad en TFD antimicrobiana. A lo largo de las últimas décadas, el amplio y frecuente consumo de antibióticos ha provocado la aparición de microorganismos cada vez más resistentes a los mismos. El hecho de que los antibióticos convencionales no sean eficaces frente a ciertas especies de bacterias es un gran problema para la salud mundial. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos capaces de combatir la actual resistencia de estos patógenos. Es aquí donde surge la TFD antimicrobiana como una aproximación muy prometedora.²⁰⁹

La fototoxicidad de los complejos de Ru(II) preparados se estudió tanto en bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) como Gram negativas (*Escherichia coli*). El protocolo seguido en estos experimentos queda resumido en la **Figura 61**. Brevemente, sobre una placa negra de 96 pocillos se añade una concentración conocida de bacterias (10^8 células mL^{-1}) y cantidades crecientes del complejo de Ru(II) en disolución acuosa de NaCl 0.9%. A continuación, se incuba el FS durante 30 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ con el fin de que el complejo cargado positivamente se una a la membrana cargada negativamente de las bacterias. Transcurrido este tiempo, se irradian simultáneamente los pocillos con un iluminador de fabricación propia que

contiene 96 LEDs de 470 nm (**Figura 61**; $62 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en cada pocillo).²¹⁰ Finalmente, con el fin de contabilizar el número de colonias existentes en cada uno de los pocillos, se realizaron sucesivas diluciones y se sembró cada una de ellas en una placa Petri. Se incubó entonces a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h para poder determinar la viabilidad celular. La toxicidad del complejo de Ru(II) tras ser activado con luz visible siempre se compara con tres controles: la disolución de bacterias en ausencia de FS, la disolución de bacterias en ausencia de FS pero irradiando con luz azul durante 30 min y la disolución de bacterias en presencia de FS pero en la oscuridad.

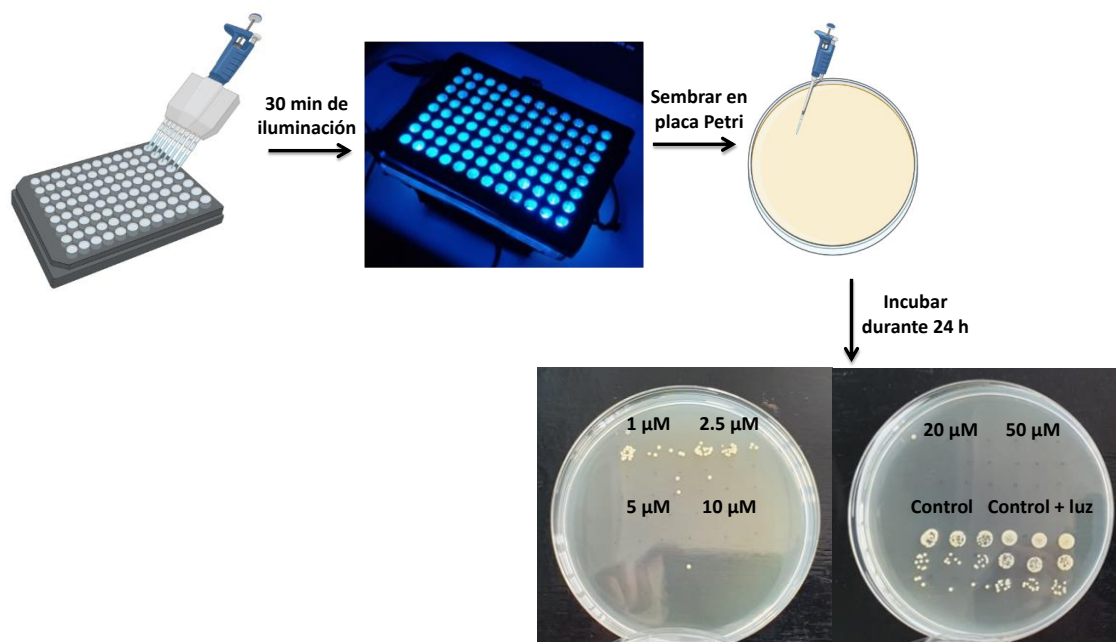


Figura 61. Esquema del protocolo seguido para evaluar la fototoxicidad de los complejos de Ru(II)-bim preparados.

Como se ha comentado anteriormente, la lipofilia de los complejos sintetizados es un factor determinante en su efecto fotodinámico sobre las células. Por ello, no se observó ninguna fototoxicidad cuando los complejos de Ru(II)-bim con ligandos tipo bipyridina (dmb, dmb, bpy o Cl-bpy) se emplearon en las dos especies de bacterias. La toxicidad de los FS $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ y $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bim})]^{2+}$ se evaluó en *E. coli* y *S. aureus* en ausencia y presencia de luz en un rango de concentraciones creciente para cada uno de los complejos. Con el fin de cuantificar el número de células viables en disolución después del tratamiento con luz, se emplea como unidad de medida las unidades formadoras de colonias (CFUs). Como se observa en la **Figura 62**, ambos complejos no inducen muerte celular en ausencia de luz. Sin embargo, al iluminar las células en presencia del FS, la viabilidad celular se reduce drásticamente. Al comparar los resultados obtenidos con cada complejo y para cada especie, el $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ presenta una elevada fototoxicidad, induciendo una muerte celular de 7 log en ambas especies tras sólo 30 min de iluminación. A pesar de que el complejo $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bim})]^{2+}$ mostraba un

mayor rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$, un mayor tiempo de vida de luminiscencia y una mayor hidrofobicidad, este compuesto sólo induce una disminución de la viabilidad celular en 3 log en *E. coli* empleando concentraciones muy elevadas ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e idéntico tiempo de iluminación. Este hecho puede deberse a la mayor capacidad del $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ para generar O_2^- , el cual a su vez, se transforma en el interior de la célula en otras especies aún más citotóxicas. Además, ambos complejos de Ru(II) muestran una mayor fototoxicidad sobre *S. aureus* que sobre *E. coli*. Este fenómeno puede deberse a que las bacterias Gram positivas contienen una pared celular menos compleja que las Gram negativas ya que los FSs no llegan a internalizarse en las células y por tanto las ROS son producidas en el exterior de la membrana bacteriana. Mientras que la pared celular de las Gram positivas está compuesta por una membrana gruesa y porosa cargada negativamente debido a la presencia de peptidoglicano y ácido teicoico, la pared de las Gram negativas presenta una membrana externa, una capa de peptidoglicano más fina y una membrana citoplasmática.²¹¹

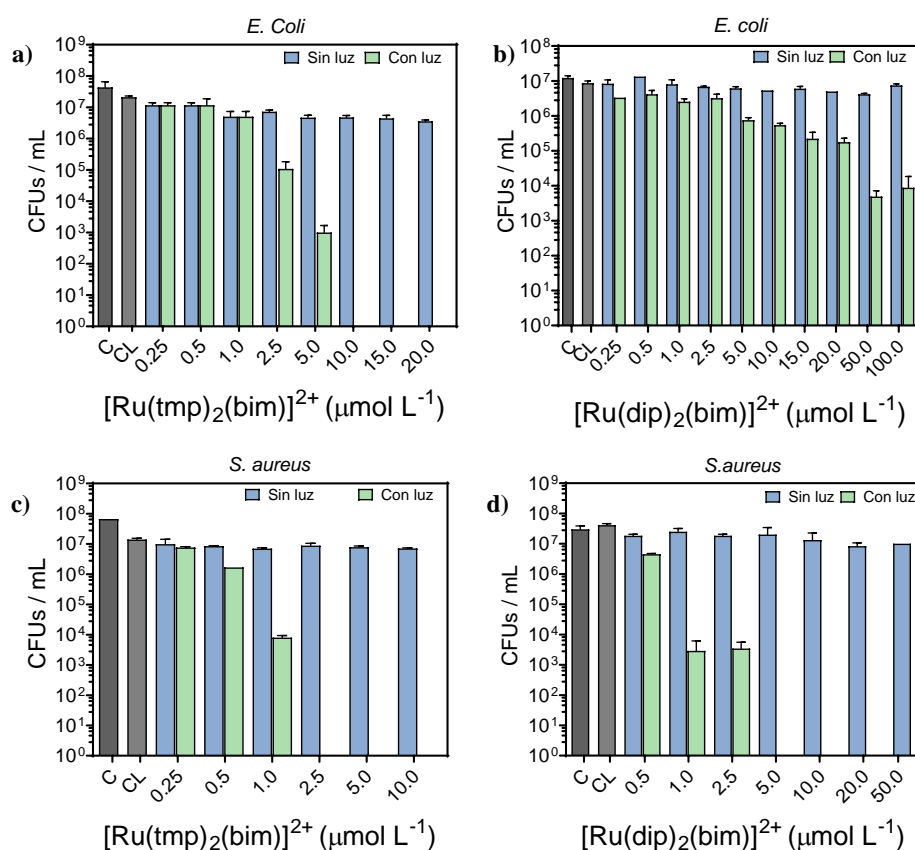


Figura 62. Evaluación de la fototoxicidad los complejos $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ y $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bim})]^{2+}$ sobre *E. coli* (a-b) o *S. aureus* (c-d). Las barras representan las unidades formadoras de colonias (CFUs) que permanecen tras iluminación durante 30 min con un LED de 470 nm ($62 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en presencia de cada uno de los complejos o en la oscuridad.

Seguidamente se determinó el tiempo de iluminación idóneo para inducir la mayor fototoxicidad. Para ello, se emplearon las concentraciones de complejo de Ru(II) previamente

optimizadas para cada una de las especies. Como se muestra en la **Figura 63**, es necesaria una irradiación durante 30 min para reducir la viabilidad celular en 7 log en ambas especies de bacterias.

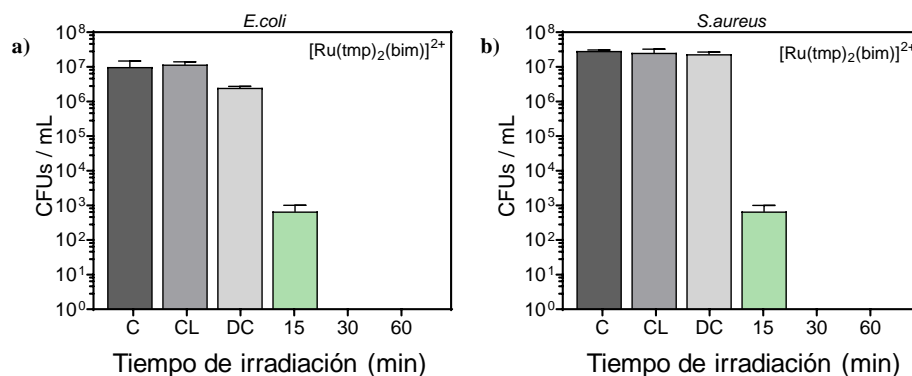


Figura 63. Fototoxicidad del complejo $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ sobre a) *E. coli* ($[\text{FS}] = 10.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) o b) *S. aureus* ($[\text{FS}] = 2.5 \mu\text{mol L}^{-1}$) a diferentes tiempos de irradiación con una placa iluminadora de LEDs de 470 nm ($62 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por LED).

Por último, la fototoxicidad de ambos complejos también fue evaluada en otras especies de bacterias Gram negativas como la *Burkholderia cepacia* o la *Pseudomonas aeruginosa* y Gram positivas como el *Enterococcus faecalis* o el *Staphylococcus epidermidis*. Todas estas especies son muy resistentes a diferentes familias de antibióticos, siendo algunas de las principales causantes de infecciones en humanos, sobre todo nosocomiales. Como se observa en la **Figura 64**, el complejo $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ es altamente fotoactivo para todas las especies estudiadas con excepción de la *B. cepacia*. La gran resistencia que muestra la *B. cepacia* frente a algunos antibióticos catiónicos (p. ej. la Polimixina B) se ha descrito en la bibliografía; esta especie posee una membrana externa con propiedades únicas, que impide la unión de compuestos cargados positivamente y, por tanto, la internalización de éstos.²¹² Esto quiere indicar que, en todos los casos, estamos observando un efecto fotodinámico, siendo éste el causante de la muerte celular.

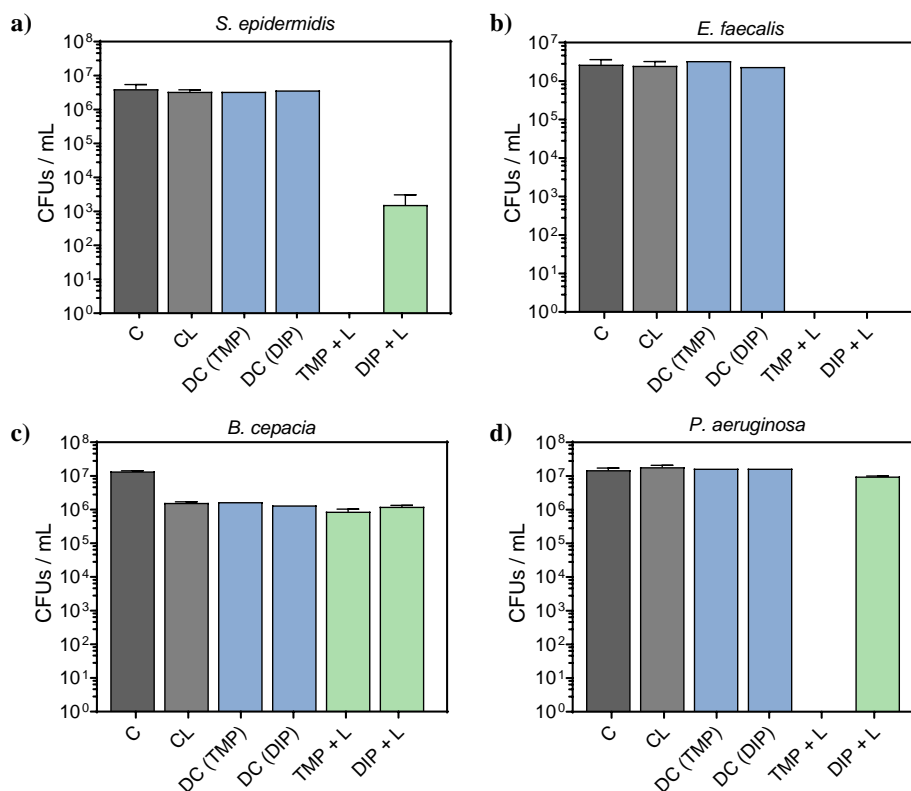


Figura 64. Evaluación de la fototoxicidad de los complejos $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ y $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{bim})]^{2+}$ tras irradiación durante 30 min con una placa iluminadora de LEDs de 470 nm ($62 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por LED) sobre a-b) *S. epidermidis* y *E. faecalis* ($[\text{FS-tmp}] = 2.5 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{FS-dip}] = 5.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) o c-d) *B. cepacia* y *P. aeruginosa* ($[\text{FS-tmp}] = 10.0 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{FS-dip}] = 50.0 \mu\text{mol L}^{-1}$).

En comparación con otros FSs descritos en bibliografía basados en la estructura de complejos de Ru(II), los complejos de Ru(II)-bim muestran una elevada fototoxicidad. Por ejemplo, algunos estudios necesitan concentraciones de complejos de Ru(II) elevadas ($15 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$) para inducir una disminución de más de 6 log en *E. coli* y *S. aureus*.²¹³⁻²¹⁵ También existen estudios en bacterias con el complejo de Ru(II) TLD1433 (ver sección 3.2.2 de la Introducción).²¹⁶ Es destacable que, mientras que en nuestro caso es necesaria una concentración de $2.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ para inducir una reducción mayor a 7 log en *S. aureus*, en este estudio se emplea una concentración de TLD1433 de $6.7 \mu\text{mol L}^{-1}$, obteniendo una reducción en 7.26 log.²¹⁶ Esta comparación destaca aún más la elevada fototoxicidad que presentan los complejos de Ru(II)-bim en TFD antimicrobiana.



CONCLUSIONS

The results described in this thesis work allow us to conclude that we have successfully accomplished the main aims of the project namely, the design, preparation and spectroscopic characterization of novel luminescent Ru(II) polypyridyl complexes that can be tethered to molecularly imprinted polymers (MIPs) for the recognition and quantification of tenuazonic acid (TeA) mycotoxin. Furthermore, we have taken advantage of the unique features of the novel Ru(II) polyazaaromatic complexes with 2,2'-biimidazole as efficient photosensitizers to produce reactive oxygen species for their use in biomimetic sensors, bioanalytical chemistry and photodisinfection/photodynamic therapy applications.

The particular conclusions drawn from each chapter are summarized below.

Interaction of a 1,3-Dicarbonyl Toxin with Ru(II)-biimidazole Complexes for Luminescence Sensing: a Spectroscopic and Photochemical Experimental Study Rationalized by TD-DFT Calculations

1. We have designed, prepared and characterized a family of luminescent Ru(II) complexes with a **2,2'-biimidazole** (bim) ligand as receptor moiety for 1,3-dicarbonyl toxins recognition and two *ancillary* polypyridyl ligands functionalized with suitable groups for a future covalent attachment to a polymer matrix.
2. We have evaluated the ability of these luminescent metalloreceptors to establish **hydrogen bonds** with various *anions* such as fluoride (F^-), acetate or 1,3-dicarbonyl compounds (e.g. tenuazonate (TeA^-), a mycotoxin produced by *Alternaria* fungi) by UV-vis spectroscopy, steady-state and time-resolved emission, and nuclear magnetic resonance (1H -NMR).
3. The addition of increasing amounts of TeA^- in DMSO induces a red shift in the blue-green **absorption** of the luminophores and an efficient **quenching** of their red-NIR **luminescence**, with progressive band broadening.
4. All the experimental results were rationalized by a thorough **computational** study using time-dependent density functional theory (TD-DFT).
5. Our results show that the proton transfer from the coordinated bim to tenuazonate **is not feasible in the ground state**. Only more basic anions such as F^- can remove this proton in organic medium.
6. Two isoenergetic geometries have been computationally discovered for the **bim- TeA^- adduct** in polar non-protogenic organic solvents, characterized by the location of one of the C–O groups between the two NH moieties of the bim ligand. However, this geometry has yet to be confirmed experimentally.

7. The **stronger acidity** of the Ru(II)-bim complexes **in the excited state** leads to an irreversible proton transfer in their ³MLCT excited state that quenches their luminescence.
8. Once we have demonstrated the suitability of these Ru(II)-bim complexes to sense tenuazonic acid, our work will be useful to develop **optical sensors** for relevant analytes containing a β -dicarbonyl moiety.

Luminescent Molecularly Imprinted Polymer Nanocomposites for Emission Intensity and Lifetime Rapid Sensing of Tenuazonic Acid Mycotoxin

1. Molecular engineering has led to the design, preparation and characterization of a *novel* **trifunctional monomer** that contains a **biimidazole ligand** as the recognition moiety, four **polymerizable acrylate** groups that allow radical copolymerization, and a **luminescent Ru(II) complex** as signalling unit.
2. Copolymerization of the trifunctional monomer in the presence of tenuazonic acid mycotoxin has allowed us to grow a 10 nm-thick layer of **molecularly imprinted polymer (MIP)** onto a 200 nm silica core by RAFT polymerization. The **composite** nanomaterial enable an extremely **fast diffusion** of the analyte from the sample to the imprinted cavities of the recognition material.
3. The luminescent MIPs showed excellent selectivity for TeA even **in partially aqueous medium** (95:5 v/v MeCN–H₂O) a remarkable result for a recognition material whose optical response relies on hydrogen bond interactions. This result shows that the microenvironment features at the polymer binding sites are significantly different from those of the bulk solvent.
4. The presence of small amounts of **TeA** in the aqueous-organic solvent provokes a dramatic **quenching** of the MIP luminescence. The deactivation is less pronounced in the non-imprinted polymer material, highlighting the molecular imprinting effect.
5. The **fast response** (less than 30 s) of the luminescent MIP to the presence of TeA allows *real-time sensing* of the mycotoxin. Without optimization, the novel optical sensor system can **detect** down to **63.8** and **75.2 $\mu\text{g L}^{-1}$** of **TeA** by steady-state and, *for the first time* in a MIP, **lifetime-based luminescence** measurements, respectively.
6. Such lowest detection limits with **no cross-sensitivity** to other toxins with β -hydroxy moieties such as alternariol, β -zeranol or even the close analogue ciclopiazonic acid, will allow **determination** of TeA in samples such as infant cereals or sorghum

grains (median content of contaminated samples $550 \mu\text{g kg}^{-1}$), tomato paste ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$) or in some spices ($> 1000 \mu\text{g kg}^{-1}$).

7. This **first-of-type work** will pave the way for future MIP-based sensors that capitalize on **luminescence lifetime** rather than **absolute emission** measurements. The latter may display scarce sensitivity and poor reproducibility for particulate materials due to light scattering, probe photobleaching or excitation light source drift.

Hyaluronic Acid–Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles with a Ruthenium Photosensitizer Cargo for Photodynamic Therapy of Oral Cancer Cells

1. We have designed, prepared and characterized a family of **Ru(II)** complexes with one **2,2'-biimidazole** (bim) ligand and two ancillary polypyridyl ligands functionalized with electron-withdrawing or -donating groups, to fine **tune** the photophysical and photochemical properties of the **photosensitizing complexes**.
2. These complexes have the rare ability to **simultaneously undergo both type I and type II** mechanisms to furnish **singlet oxygen** ($^1\text{O}_2$) and **superoxide anion** ($\text{O}_2^{\bullet-}$) reactive oxygen species upon blue-green light irradiation.
3. Superoxide generation increases when the ancillary ligands also boast a **high-lying HOMO** as a consequence of the π -rich character of the bim ligand, that facilitates the photoinduced electron transfer to O_2 . Nevertheless, the sub- μs excited state lifetimes of the Ru-bim photosensitizers limits the absolute **ROS photogeneration quantum yields**.
4. The *hydrophobicity* of the photosensitizing complex plays a key role on its intracellular uptake. In this regard, we have selected the lipophilic **[Ru(tmp)₂(bim)]²⁺** (tmp = 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline) to evaluate its phototoxicity on oral cancer cells (TR146 buccal mucosa carcinoma cell line). Preferential accumulation of this photosensitizer *in the mitochondria* was found.
5. **Encapsulation** of the Ru(II)-bim complex in a sustained release formulation can be a way to overcome its scarce solubility in aqueous media, the low-specific accumulation in the cancer cells, and the scant bioavailability of the sensitizer dye. Therefore, we successfully loaded **[Ru(tmp)₂(bim)]²⁺** in self-assembled **hyaluronic acid–poly(lactic-co-glycolic acid)** (HA-PLGA) nanoparticles.
6. Although the biimidazole moiety confers **[Ru(tmp)₂(bim)]²⁺** a higher dark toxicity than other Ru(II) polypyridyl photosensitizers reported in literature, its encapsulation

in HA-PLGA nanoparticles significantly **reduced its dark toxicity** while increasing its selectivity for the target tumor cells.

7. The high phototoxicity of $[\text{Ru}(\text{tmp})_2(\text{bim})]^{2+}$ under blue/green light towards cancer cells and different species of bacteria, call **for further investigations on the photodynamic activity** of these exciting sensitizers.

Therefore, the results obtained in this thesis have led to the report, for the first time, of a luminescent molecularly imprinted polymer capable of recognizing mycotoxins with β -dicarbonyl structure, such as tenuazonic acid, in (partially) aqueous media, using the emission lifetime as the analytically-sensitive signal. Optical sensors based on this parameter are, nowadays, the preferred ones for luminescence-based monitoring due to the unquestionable advantages it brings, since it is an intensive and not extensive magnitude as the luminescence intensity. The luminescent monomers we have developed provide unique **molecular recognition** of the β -dicarbonyl moiety, a **luminescence** in the red that facilitates its detection, and **polymerizable groups** to covalently incorporate the indicator to the molecularly imprinted polymer matrix. The recognition ability provided by the molecular probe is considerably enhanced by those artificial biomimetic materials, emulating the binding selectivity of antibodies. The Ru(II)-biimidazole dyes have turned out to be good photosensitizing agents after increasing their hydrophobicity, thanks to their **combined generation** of singlet molecular oxygen and superoxide anion upon illumination with blue/green solid state sources. This unusual feature encourages us to further investigate their applications to antimicrobial photochemotherapies and photodynamic treatments of cancer.

Furthermore, the thesis has also realized new photosensitizing dyes of great value for the development of recognition materials (biomimetic sensors) and bioanalytical methods (biosensors), as well as for the manufacture of biocidal materials, based on the photogeneration of reactive oxygen species (ROS). The originality of the new photosensitizers is that they are able to generate, simultaneously, two different ROS, superoxide anion and singlet molecular oxygen, with potential of enhancing the biocidal activity of the dye and amplifying the ROS-based transduction using bioanalytical assays of high relevance (generically called "proximity bioassays" or "LOCI").



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Orellana, G.; García-Fresnadillo, D. *Environmental and Industrial Optosensing with Tailored Luminescent Ru(II) Polypyridyl Complexes in Optical Sensors*; Springer: Berlin, Germany, 2004, pp 309–357. https://doi.org/10.1007/978-3-662-09111-1_13.
- (2) Drozdak, R.; Allaert, B.; Ledoux, N.; Dragutan, I.; Dragutan, V.; Verpoort, F. Synthesis of Schiff Base-Ruthenium Complexes and Their Applications in Catalytic Processes. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1721–1743. <https://doi.org/10.1002/adsc.200404389>.
- (3) Singh, A. K.; Pandey, D. S.; Xu, Q.; Braunstein, P. Recent Advances in Supramolecular and Biological Aspects of Arene Ruthenium(II) Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2014**, *270–271*, 31–56. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.09.009>.
- (4) Allardyce, C. S.; Dyson, P. J. Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects. *Platin. Met. Rev.* **2001**, *45*, 62–69.
- (5) Tormo, L.; Bustamante, N.; Colmenarejo, G.; Orellana, G. Can Luminescent Ru(II) Polypyridyl Dyes Measure pH Directly? *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 5195–5204. <https://doi.org/10.1021/ac1005266>.
- (6) Bustamante, N.; Ielasi, G.; Bedoya, M.; Orellana, G. Optimization of Temperature Sensing with Polymer-Embedded Luminescent Ru(II) Complexes. *Polymers* **2018**, *10*, 234. <https://doi.org/10.3390/polym10030234>.
- (7) Bedoya, M.; Díez, M. T.; Moreno-Bondi, M. C.; Orellana, G. Humidity Sensing with a Luminescent Ru(II) Complex and Phase-Sensitive Detection. *Sensors Actuators, B Chem.* **2006**, *113*, 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.07.006>.
- (8) Urriza-arsuaga, I.; Bedoya, M.; Orellana, G. Chemical Luminescent Sensor for O₂ Detection in Biomethane Streams. *Sensors Actuators B. Chem.* **2019**, *279*, 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.108>.
- (9) Orellana, G.; Moreno-Bondi, M. C.; Segovia, E.; Marazuela, M. D. Fiber-Optic Sensing of Carbon Dioxide Based on Excited-State Proton Transfer to a Luminescent Ruthenium(II) Complex. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2210–2215. <https://doi.org/10.1021/ac00043a005>.
- (10) Seddon, E. A.; Seddon, K. R. *The Chemistry of Ruthenium*; Clark, R. J. H., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1984; Vol. 288. [https://doi.org/10.1016/0022-328x\(85\)80116-9](https://doi.org/10.1016/0022-328x(85)80116-9).
- (11) Kalyanasundaram, K. Photophysics, Photochemistry and Solar Energy Conversion with Tris(Bipyridyl)Ruthenium(II) and Its Analogues. *Coord. Chem. Rev.* **1982**, *46*, 159–244. [https://doi.org/10.1016/0010-8545\(82\)85003-0](https://doi.org/10.1016/0010-8545(82)85003-0).
- (12) Juris, A.; Balzani, V.; Barigelletti, F.; Campagna, S.; Belser, P.; Zelewsky, V. Ru(II) Polypyridine Complexes: Photophysics, Photochemistry, Electrochemistry and Chemiluminescence. *Coord. Chem. Rev.* **1988**, *84*, 85–277.
- (13) Thompson, D. W.; Ito, A.; Meyer, T. J. [Ru(Bpy)₃]^{2+*} and Other Remarkable Metal-to-

- Ligand Charge Transfer (MLCT) Excited States. *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 1257–1305. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-13-03-04>.
- (14) Dongare, P.; Myron, B. D. B.; Wang, L.; Thompson, D. W.; Meyer, T. J. [Ru(Bpy)₃]²⁺ Revisited. Is It Localized or Delocalized? How Does It Decay? *Coord. Chem. Rev.* **2017**, *345*, 86–107. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.03.009>.
- (15) Watts, R. J. Ruthenium Polypyridyls: A Case Study. *J. Chem. Educ.* **1983**, *60*, 834–842. <https://doi.org/10.1021/ed060p834>.
- (16) Orellana, G.; Braun, A. M. Quantum Yields of ³MLCT Excited State Formation and Triplet-Triplet Absorption Spectra of Ruthenium(II) Tris-Chelate Complexes Containing Five- and Six-Membered Heterocyclic Moieties. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1989**, *48*, 277–289. [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(89\)87009-1](https://doi.org/10.1016/1010-6030(89)87009-1).
- (17) Suzuki, K.; Kobayashi, A.; Kaneko, S.; Takehira, K.; Yoshihara, T.; Ishida, H.; Shiina, Y.; Oishi, S.; Tobita, S. Reevaluation of Absolute Luminescence Quantum Yields of Standard Solutions Using a Spectrometer with an Integrating Sphere and a Back-Thinned CCD Detector. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 9850–9860. <https://doi.org/10.1039/b912178a>.
- (18) Orellana, G.; Quiroga, M. L.; Braun, A. M. Spectroscopic, Electrochemical, and Kinetic Characterization of New Ruthenium(II) Tris-chelates Containing Five-Membered Heterocyclic Moieties. *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 2073–2086. <https://doi.org/10.1002/hlca.19870700813>.
- (19) Orellana, G.; Quiroga, M. L.; De Dios, C. Spectroscopy, Electrochemistry, and Photochemistry of Ruthenium(II) Complexes Containing Five-Membered Heterocyclic Chelating Ligands. *Trends Inorg. Chem.* **1993**, *3*, 109–130.
- (20) Heinemann, F.; Karges, J.; Gasser, G. Critical Overview of the Use of Ru(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers in One-Photon and Two-Photon Photodynamic Therapy. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2727–2736. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00180>.
- (21) Schweitzer, C.; Schmidt, R. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1685–1757. <https://doi.org/10.1021/cr60043a001>.
- (22) Nonell, S.; Flors, C. Steady-State and Time-Resolved Singlet Oxygen Phosphorescence Detection in the Near-IR. In *Singlet Oxygen Applications in Biosciences and Nanosciences*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2016, Vol 2, pp 9–25 <https://doi.org/10.1039/9781782626992-00007>.
- (23) García-Fresnadillo, D.; Georgiadou, Y.; Orellana, G.; Braun, A. M.; Oliveros, E. Singlet-Oxygen (¹Δ_g) Production by Ruthenium(II) Complexes Containing Polyazaheterocyclic Ligands in Methanol and in Water. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1222–1238. <https://doi.org/10.1002/hlca.19960790428>.
- (24) Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in

- Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1993**, *22*, 113–262. <https://doi.org/10.1063/1.555934>.
- (25) Krumova, K.; Cosa, G. *Overview of Reactive Oxygen Species*; Nonell, S., Flors, C., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2016, Vol 1, pp 3–23. <https://doi.org/10.1039/9781782622208-00001>.
- (26) Entradas, T.; Waldron, S.; Volk, M. The Detection Sensitivity of Commonly Used Singlet Oxygen Probes in Aqueous Environments. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2020**, *204*, 111787. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111787>.
- (27) Kim, S.; Fujitsuka, M.; Majima, T. Photochemistry of Singlet Oxygen Sensor Green. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 13985–13992. <https://doi.org/10.1021/jp406638g>.
- (28) Ragàs, X.; Jiménez-Banzo, A.; Sánchez-García, D.; Batllori, X.; Nonell, S. Singlet Oxygen Photosensitisation by the Fluorescent Probe Singlet Oxygen Sensor Green®. *Chem. Commun.* **2009**, 2920–2922. <https://doi.org/10.1039/b822776d>.
- (29) Liu, H.; Carter, P. J. H.; Laan, A. C.; Eelkema, R.; Denkova, A. G. Singlet Oxygen Sensor Green Is Not a Suitable Probe for $^1\text{O}_2$ in the Presence of Ionizing Radiation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44880-2>.
- (30) Wang, Y. Y.; Liu, Y. C.; Sun, H.; Guo, D. S. Type I Photodynamic Therapy by Organic–Inorganic Hybrid Materials: From Strategies to Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *395*, 46–62. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.05.016>.
- (31) Hayyan, M.; Hashim, M. A.; Alnashef, I. M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 3029–3085. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00407>.
- (32) Paige Davis Volk, A.; Moreland, J. G. ROS-Containing Endosomal Compartments: Implications for Signaling. In *Methods in Enzymology*; Elsevier Inc., 2014; Vol. 535, pp 201–224. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397925-4.00013-4>.
- (33) Michalski, R.; Michalowski, B.; Sikora, A.; Zielonka, J.; Kalyanaraman, B. On the Use of Fluorescence Lifetime Imaging and Dihydroethidium to Detect Superoxide in Intact Animals and Ex Vivo Tissues: A Reassessment. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *67*, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.816>.
- (34) He, W.; Liu, Y.; Wamer, W. G.; Yin, J. J. Electron Spin Resonance Spectroscopy for the Study of Nanomaterial-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species. *J. Food Drug Anal.* **2014**, *22*, 49–63. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.004>.
- (35) Buettner, G. R.; Mason, R. P. Superoxide Hydroxyl Radical. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 127–133.
- (36) Villamena, F. A.; Zweier, J. L. Superoxide Radical Trapping and Spin Adduct Decay of 5-Tert-Butoxycarbonyl-5-Methyl-1-Pyrroline N-Oxide (BocMPO): Kinetics and Theoretical Analysis. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2002**, *2*, 1340–1344. <https://doi.org/10.1039/b201734b>.

- (37) Urriza-arsuaga, I.; Bedoya, M.; Orellana, G. Chemical Tailored Luminescent Sensing of NH₃ in Biomethane Productions. *Sensors Actuators B. Chem.* **2019**, *292*, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.04.109>.
- (38) Urriza-Arsuaga, I.; Bedoya, M.; Orellana, G. Unprecedented Reversible Real-Time Luminescent Sensing of H₂S in the Gas Phase. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 2231–2238. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04811>.
- (39) Wolfbeis, O. S. Probes, Sensors, and Labels: Why Is Real Progress Slow? *Angew. Chem Int. Ed.* **2013**, *52*, 9864–9865. <https://doi.org/10.1002/anie.201305915>.
- (40) Urriza-Arsuaga, I.; Ielasi, G.; Bedoya, M.; Orellana, G. *Luminescence-Based Sensors for Bioprocess Applications in Fluorescence in Industry*; Springer Nature: Switzerland, 2019, pp 1–38. https://doi.org/10.1007/4243_2019_10.
- (41) Orellana, G. Luminescent Optical Sensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *379*, 344–346. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2581-6>.
- (42) Norris, J. O. *Optical Fiber Chemical Sensors: Fundamentals and Applications in Optical Fiber Sensor Technology*; Grattan, K. T. V., Meggitt, B. T., Eds.; Springer, Boston, US, 2000, pp 337–378. <https://doi.org/10.1109/iedm.1985.190906>.
- (43) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: Singapore, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- (44) Orellana, G. *Fluorescence Based Sensors in Optical Chemical Sensors*; Baldini, F., Chester, A. N., Homola, J., Martellucci, S., Eds.; Springer: Amsterdam, 2006; Vol. 224. pp 99–116.
- (45) Lippitsch, M. E.; Draxler, S.; Kieslinger, D. Luminescence Lifetime-Based Sensing: New Materials, New Devices. *Sensors Actuators, B Chem.* **1997**, *38*, 96–102. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(97\)80177-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(97)80177-3).
- (46) Belbruno, J. J. Molecularly Imprinted Polymers. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 94–119. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00171>.
- (47) Haupt, K.; Mosbach, K. Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2495–2504. <https://doi.org/10.1097/00006565-198709000-00020>.
- (48) Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers*; Smithers Rapra Technology Ltd: UK, 2013.
- (49) Cormack, P. A. G.; Elorza, A. Z. Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis and Characterisation. *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.013>.
- (50) Vaughan, A. D.; Sizemore, S. P.; Byrne, M. E. Enhancing Molecularly Imprinted Polymer Binding Properties via Controlled/Living Radical Polymerization and Reaction Analysis. *Polymer* **2007**, *48*, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.11.013>.
- (51) Piletsky, S. A.; Andersson, H. S.; Nicholls, I. A. Combined Hydrophobic and Electrostatic

- Interaction-Based Recognition in Molecularly Imprinted Polymers. *Macromolecules* **1999**, *32*, 633–636. <https://doi.org/10.1021/ma9812736>.
- (52) Spivak, D.; Gilmore, M. A.; Shea, K. J. Evaluation of Binding and Origins of Specificity of 9-Ethyladenine Imprinted Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4388–4393. <https://doi.org/10.1021/ja963510v>.
- (53) Beyazit, S.; Tse Sum Bui, B.; Haupt, K.; Gonzato, C. Molecularly Imprinted Polymer Nanomaterials and Nanocomposites by Controlled/Living Radical Polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **2016**, *62*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.04.001>.
- (54) Urraca, J. L.; Marazuela, M. D.; Merino, E. R.; Orellana, G.; Moreno-Bondi, M. C. Molecularly Imprinted Polymers with a Streamlined Mimic for Zearalenone Analysis. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1116*, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.032>.
- (55) Sellergren, B.; J. Hall, A. *Molecularly Imprinted Polymers In Supramolecular Chemistry*; P.A. Gale and J.W. Steed, Ed.; 2012. <https://doi.org/10.1002/9780470661345.smc137>.
- (56) Alexander, C.; Andersson, H. S.; Andersson, L. I.; Ansell, R. J.; Kirsch, N.; Nicholls, I. A.; O'Mahony, J.; Whitcombe, M. J. Molecular Imprinting Science and Technology: A Survey of the Literature for the Years up to and Including 2003. *J. Mol. Recognit.* **2006**, *19*, 106–180. <https://doi.org/10.1002/jmr.760>.
- (57) Mosbach, K.; Haupt, K. Some New Developments and Challenges in Noncovalent Molecular Imprinting Technology. *J. Mol. Recognit.* **1998**, *11*, 62–68. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1352\(199812\)11:1/6<62::AID-JMR391<3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1352(199812)11:1/6<62::AID-JMR391<3.0.CO;2-5).
- (58) Wulff, G.; Knorr, K. Stoichiometric Noncovalent Interaction in Molecular Imprinting. *Bioseparation* **2001**, *10*, 257–276. <https://doi.org/10.1023/A:1021585518592>.
- (59) Mayes, A. G.; Whitcombe, M. J. Synthetic Strategies for the Generation of Molecularly Imprinted Organic Polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1742–1778. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.011>.
- (60) Vasapollo, G.; Sole, R. Del; Mergola, L.; Lazoi, M. R.; Scardino, A.; Scorrano, S.; Mele, G. Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 5908–5945. <https://doi.org/10.3390/ijms12095908>.
- (61) Benito-Peña, E.; Navarro-Villoslada, F.; Carrasco, S.; Jockusch, S.; Ottaviani, M. F.; Moreno-Bondi, M. C. Experimental Mixture Design as a Tool for the Synthesis of Antimicrobial Selective Molecularly Imprinted Monodisperse Microbeads. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 10966–10976. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b02238>.
- (62) Moad, G. RAFT Polymerization to Form Stimuli-Responsive Polymers. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 177–219. <https://doi.org/10.1039/c6py01849a>.
- (63) Matsumura, S.; Hlil, A. R.; Lepiller, C.; Gaudet, J.; Guay, D.; Shi, Z.; Holdcroft, S.; Hay, A. S. Stability and Utility of Pyridyl Disulfide Functionality in RAFT and Conventional Radical Polymerizations. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2008**, *46*, 7207–7224.

- <https://doi.org/10.1002/pola>.
- (64) Bertolla, M.; Cenci, L.; Anesi, A.; Ambrosi, E.; Tagliaro, F.; Vanzetti, L.; Guella, G.; Bossi, A. M. Solvent-Responsive Molecularly Imprinted Nanogels for Targeted Protein Analysis in MALDI-TOF Mass Spectrometry. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 6908–6915. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b16291>.
- (65) Zielińska, K.; Sun, H.; Campbell, R. A.; Zorbakhsh, A.; Resmini, M. Smart Nanogels at the Air/Water Interface: Structural Studies by Neutron Reflectivity. *Nanoscale* **2016**, *8*, 4951–4960. <https://doi.org/10.1039/c5nr07538f>.
- (66) Turiel, E.; Martín-Esteban, A. Molecularly Imprinted Polymers for Sample Preparation: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *668*, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.019>.
- (67) Rico-Yuste, A.; Walravens, J.; Urraca, J. L.; Abou-Hany, R. A. G.; Descalzo, A. B.; Orellana, G.; Rychlik, M.; De Saeger, S.; Moreno-Bondi, M. C. Analysis of Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether in Foodstuffs by Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Chem.* **2018**, *243*, 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.125>.
- (68) Abou-Hany, R. A. G.; Urraca, J. L.; Descalzo, A. B.; Gómez-Arribas, L. N.; Moreno-Bondi, M. C.; Orellana, G. Tailoring Molecularly Imprinted Polymer Beads for Alternariol Recognition and Analysis by a Screening with Mycotoxin Surrogates. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1425*, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.055>.
- (69) Wulff, G. Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1–27. <https://doi.org/10.1021/cr980039a>.
- (70) Refaat, D.; Aggour, M. G.; Farghali, A. A.; Mahajan, R.; Wiklander, J. G.; Nicholls, I. A.; Piletsky, S. A. Strategies for Molecular Imprinting and the Evolution of MIP Nanoparticles as Plastic Antibodies—Synthesis and Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6304.
- (71) Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. Molecularly Imprinted Polymers for Drug Delivery. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *804*, 231–245. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.12.032>.
- (72) Gómez-Arribas, L. N.; Darder, M. D. M.; García, N.; Rodríguez, Y.; Urraca, J. L.; Moreno-Bondi, M. C. Hierarchically Imprinted Polymer for Peptide Tag Recognition Based on an Oriented Surface Epitope Approach. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 49111–49121. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c14846>.
- (73) Benito-Peña, E.; González-Vallejo, V.; Rico-Yuste, A.; Barbosa-Pereira, L.; Cruz, J. M.; Bilbao, A.; Alvarez-Lorenzo, C.; Moreno-Bondi, M. C. Molecularly Imprinted Hydrogels as Functional Active Packaging Materials. *Food Chem.* **2016**, *190*, 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.128>.
- (74) Peng, H.; Qin, Y. T.; He, X. W.; Li, W. Y.; Zhang, Y. K. Epitope Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Chemo-/Photodynamic Synergistic Cancer Therapy Guided by

- Targeted Fluorescence Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 13360–13370. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c00468>.
- (75) Ahmad, O. S.; Bedwell, T. S.; Esen, C.; Garcia-Cruz, A.; Piletsky, S. A. Molecularly Imprinted Polymers in Electrochemical and Optical Sensors. *Trends Biotechnol.* **2019**, *37*, 294–309. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.009>.
- (76) Rico-Yuste, A.; Carrasco, S. Molecularly Imprinted Polymer-Based Hybrid Materials for the Development of Optical Sensors. *Polymers (Basel)*. **2019**, *11*, 1173. <https://doi.org/10.3390/polym11071173>.
- (77) Wan, W.; Wagner, S.; Rurack, K. Fluorescent Monomers: “Bricks” That Make a Molecularly Imprinted Polymer “Bright.” *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 1753–1771. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9174-4>.
- (78) Gawlitza, K.; Wan, W.; Wagner, S.; Rurack, K. *Fluorescent Molecularly Imprinted Polymers in Advanced Molecularly Imprinting Materials*; Uzun, A., Lokman, T., Eds.; Wiley-VCH, 2016, pp 89–120.
- (79) Rico-Yuste, A.; Abouhany, R.; Urraca, J. L.; Descalzo, A. B.; Orellana, G.; Moreno-Bondi, M. C. Eu(III)-Templated Molecularly Imprinted Polymer Used as a Luminescent Sensor for the Determination of Tenuazonic Acid Mycotoxin in Food Samples. *Sensors Actuators, B Chem.* **2021**, *329*, 129256. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129256>.
- (80) Chen, Z.; Álvarez-Pérez, M.; Navarro-Villoslada, F.; Moreno-Bondi, M. C.; Orellana, G. Fluorescent Sensing of “Quat” Herbicides with a Multifunctional Pyrene-Labeled Monomer and Molecular Imprinting. *Sensors Actuators, B Chem.* **2014**, *191*, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.09.097>.
- (81) Wan, W.; Descalzo, A. B.; Shinde, S.; Weißhoff, H.; Orellana, G.; Sellergren, B.; Rurack, K. Ratiometric Fluorescence Detection of Phosphorylated Amino Acids Through Excited-State Proton Transfer by Using Molecularly Imprinted Polymer (MIP) Recognition Nanolayers. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 15974–15983. <https://doi.org/10.1002/chem.201703041>.
- (82) Wagner, S.; Bell, J.; Biyikal, M.; Gawlitza, K.; Rurack, K. Integrating Fluorescent Molecularly Imprinted Polymer (MIP) Sensor Particles with a Modular Microfluidic Platform for Nanomolar Small-Molecule Detection Directly in Aqueous Samples. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *99*, 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.07.053>.
- (83) Descalzo, A. B.; Somoza, C.; Moreno-Bondi, M. C.; Orellana, G. Luminescent Core-Shell Imprinted Nanoparticles Engineered for Targeted Förster Resonance Energy Transfer-Based Sensing. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 5316–5320. <https://doi.org/10.1021/ac400520s>.
- (84) Ansari, S.; Masoum, S. Recent Advances and Future Trends on Molecularly Imprinted Polymer-Based Fluorescence Sensors with Luminescent Carbon Dots. *Talanta* **2021**, *223*, 121411. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121411>.
- (85) Huang, S.; Guo, M.; Tan, J.; Geng, Y.; Wu, J.; Tang, Y.; Su, C.; Lin, C. C.; Liang, Y. Novel

- Fluorescence Sensor Based on All-Inorganic Perovskite Quantum Dots Coated with Molecularly Imprinted Polymers for Highly Selective and Sensitive Detection of Omethoate. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 39056–39063. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b14472>.
- (86) Lu, H.; Xu, S.; Liu, J. One Pot Generation of Blue and Red Carbon Dots in One Binary Solvent System for Dual Channel Detection of Cr³⁺ and Pb²⁺ Based on Ion Imprinted Fluorescence Polymers. *ACS Sensors* **2019**, *4*, 1917–1924. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00886>.
- (87) Tang, Y.; Gao, Z.; Wang, S.; Gao, X.; Gao, J.; Ma, Y.; Liu, X.; Li, J. Upconversion Particles Coated with Molecularly Imprinted Polymers as Fluorescence Probe for Detection of Clenbuterol. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *71*, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.005>.
- (88) Goyal, S.; Ramawat, K. G.; Mérillon, J. M. *Different shades of fungal metabolites: an overview in Fungal Metabolites*; Springer: Switzerland, 2017, pp 1–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00020-2>.
- (89) Das Chagas Oliveira, F.; Edite Bezerra da Rocha, M. *Impact of Mycotoxins in Human Health In Fungal Metabolites*; Springer: Switzerland, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19456-1>.
- (90) Stein, R. A.; Bulboacă, A. E. *Mycotoxins In Foodborne Diseases: Third Edition*; Academic Press, 2017; pp 407–446. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00021-8>.
- (91) Khoury, D. El; Fayjaloun, S.; Nassar, M.; Sahakian, J.; Aad, P. Y. Updates on the Effect of Mycotoxins on Male Reproductive Efficiency in Mammals. *Toxins* **2019**, *11*, 515. <https://doi.org/10.3390/toxins11090515>.
- (92) Speijers, G. J. A.; Speijers, M. H. M. Combined Toxic Effects of Mycotoxins. *Toxicol. Lett.* **2004**, *153*, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.046>.
- (93) Bullerman, L. B.; Bianchini, A. Stability of Mycotoxins during Food Processing. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035>.
- (94) Commission Regulation (EU) 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Official Journal of the European Union, L 364 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02006R1881-20140701>.
- (95) Mahato, D. K.; Lee, K. E.; Kamle, M.; Devi, S.; Dewangan, K. N.; Kumar, P.; Kang, S. G. Aflatoxins in Food and Feed: An Overview on Prevalence, Detection and Control Strategies. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02266>.
- (96) Yu, J. Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. *Toxins* **2012**, *4*, 1024–1057. <https://doi.org/10.3390/toxins4111024>.
- (97) Ostry, V. *Alternaria* Mycotoxins: An Overview of Chemical Characterization, Producers, Toxicity, Analysis and Occurrence in Foodstuffs . *World Mycotoxin J.* **2008**, *1*, 175–188. <https://doi.org/10.3920/wmj2008.x013>.
- (98) Mujahid, C.; Savoy, M. C.; Baslé, Q.; Woo, P. M.; Ee, E. C. Y.; Mottier, P.; Bessaire, T.

- Levels of *Alternaria* Toxins in Selected Food Commodities Including Green Coffee. *Toxins*. **2020**, *12*, 1–17. <https://doi.org/10.3390/toxins12090595>.
- (99) Arcella, D.; Eskola, M.; Gómez Ruiz, J. A. Dietary Exposure Assessment to *Alternaria* Toxins in the European Population. *EFSA J.* **2016**, *14*, 4654.
- (100) Turner, N. W.; Bramhmbhatt, H.; Szabo-Vezse, M.; Poma, A.; Coker, R.; Piletsky, S. A. Analytical Methods for Determination of Mycotoxins: An Update (2009–2014). *Anal. Chim. Acta* **2015**, *901*, 12–33. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.013>.
- (101) Cheli, F.; Battaglia, D.; Gallo, R.; Dell’Orto, V. EU Legislation on Cereal Safety: An Update with a Focus on Mycotoxins. *Food Control* **2014**, *37*, 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.059>.
- (102) Oliveira, R. C.; Goncalves, S. S.; Oliveira, M. S.; Dilkin, P.; Mallmann, C. A.; Freitas, R. S.; Bianchi, P.; Correa, B. Natural Occurrence of Tenuazonic Acid and Phoma Sorghina in Brazilian Sorghum Grains at Different Maturity Stages. *Food Chem.* **2017**, *230*, 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.079>.
- (103) Mikula, H.; Horkel, E.; Hans, P.; Hametner, C.; Fröhlich, J. Structure and Tautomerism of Tenuazonic Acid - A Synergetic Computational and Spectroscopic Approach. *J. Hazard. Mater.* **2013**, *250–251*, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.02.006>.
- (104) Lebrun, M. H.; Duvert, P.; Gaudemer, F.; Gaudemer, A.; Deballon, C.; Boucly, P. Complexation of the Fungal Metabolite Tenuazonic Acid with Copper (II), Iron (III), Nickel (II), and Magnesium (II) Ions. *J. Inorg. Biochem.* **1985**, *24*, 167–181. [https://doi.org/10.1016/0162-0134\(85\)85001-7](https://doi.org/10.1016/0162-0134(85)85001-7).
- (105) Pose, G.; Patriarca, A.; Kyanko, V.; Pardo, A.; Fernández Pinto, V. Water Activity and Temperature Effects on Mycotoxin Production by *Alternaria Alternata* on a Synthetic Tomato Medium. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *142*, 348–353. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.017>.
- (106) Van de Perre, E.; Deschuyffeleer, N.; Jacxsens, L.; Vekeman, F.; Van Der Hauwaert, W.; Asam, S.; Rychlik, M.; Devlieghere, F.; De Meulenaer, B. Screening of Moulds and Mycotoxins in Tomatoes, Bell Peppers, Onions, Soft Red Fruits and Derived Tomato Products. *Food Control* **2014**, *37*, 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.034>.
- (107) Lohrey, L.; Marschik, S.; Cramer, B.; Humpf, H. U. Large-Scale Synthesis of Isotopically Labeled $^{13}\text{C}_2$ -Tenuazonic Acid and Development of a Rapid HPLC-MS/MS Method for the Analysis of Tenuazonic Acid in Tomato and Pepper Products. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 114–120. <https://doi.org/10.1021/jf305138k>.
- (108) Asam, S.; Lichtenegger, M.; Liu, Y.; Rychlik, M. Content of the *Alternaria* Mycotoxin Tenuazonic Acid in Food Commodities Determined by a Stable Isotope Dilution Assay. *Mycotoxin Res.* **2012**, *28*, 9–15. <https://doi.org/10.1007/s12550-011-0111-x>.
- (109) Rychlik, M.; Lepper, H.; Weidner, C.; Asam, S. Risk Evaluation of the *Alternaria* Mycotoxin

- Tenuazonic Acid in Foods for Adults and Infants and Subsequent Risk Management. *Food Control* **2016**, *68*, 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.035>.
- (110) Terminiello, L.; Patriarca, A.; Pose, G.; Fernández Pinto, V. Occurrence of Alternariol, Alternariol Monomethyl Ether and Tenuazonic Acid in Argentinean Tomato Puree. *Mycotoxin Res.* **2006**, *22*, 236–240.
- (111) Miller, F. A.; Rightsel, W. A.; Sloan, B. J.; Ehrlich, J.; French, J. C.; Bartz, Q. R. Antiviral Activity of Tenuazonic Acid. *Nature* **1963**, *200*, 1338–1339. <https://doi.org/10.1038/2001338a0>.
- (112) Asam, S.; Liu, Y.; Konitzer, K.; Rychlik, M. Development of a Stable Isotope Dilution Assay for Tenuazonic Acid. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2980–2987. <https://doi.org/10.1021/jf104270e>.
- (113) Kumari, A.; Tirkey, N. N. *Tenuazonic Acid: a Potent Mycotoxin In Recent Trends in Human and Animal Mycology*; Springer Nature: Singapore, 2019, 203–211 <https://doi.org/10.1007/978-981-13-9435-5>.
- (114) Yekeler, H.; Bitmiş, K.; Özçelik, N.; Doymaz, M. Z.; Çalta, M. Analysis of Toxic Effects of *Alternaria* Toxins on Esophagus of Mice by Light and Electron Microscopy. *Toxicol. Pathol.* **2001**, *29*, 492–497. <https://doi.org/10.1080/01926230152499980>.
- (115) Chen, S.; Qiang, S. Recent Advances in Tenuazonic Acid as a Potential Herbicide. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2017**, *143*, 252–257. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.01.003>.
- (116) Steyn, P. S.; Rabie, C. J. Characterization of Magnesium and Calcium Tenuazonate from Phoma Sorghina. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1977–1979. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88860-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88860-3).
- (117) Nakhjavan, B.; Ahmed, N. S.; Khosravifard, M. Development of an Improved Method of Sample Extraction and Quantitation of Multi-Mycotoxin in Feed by LC-MS/MS. *Toxins* **2020**, *12*, 462. <https://doi.org/10.3390/toxins12070462>.
- (118) González-Curbelo, M.; Socas-Rodríguez, B.; Herrera-Herrera, A. V.; González-Sálamo, J.; Hernández-Borges, J.; Rodríguez-Delgado, M. Evolution and Applications of the QuEChERS Method. *Trends Anal. Chem.* **2015**, *71*, 169–185. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.012>.
- (119) Walravens, J.; Mikula, H.; Rychlik, M.; Asam, S.; Devos, T.; Njumbe Ediage, E.; Diana Di Mavungu, J.; Jacxsens, L.; Van Landschoot, A.; Vanhaecke, L.; De Saeger, S. Validated UPLC-MS/MS Methods to Quantitate Free and Conjugated *Alternaria* Toxins in Commercially Available Tomato Products and Fruit and Vegetable Juices in Belgium. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 5101–5109. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01029>.
- (120) Rausch, A. K.; Brockmeyer, R.; Schwerdtle, T. Development and Validation of a QuEChERS-Based Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Multi-Method for the Determination of 38 Native and Modified Mycotoxins in Cereals. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 4657–4669. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07491>.
- (121) Xing, L.; Zou, L.; Luo, R.; Wang, Y. Determination of Five *Alternaria* Toxins in Wolfberry

- Using Modified QuEChERS and Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Chem.* **2020**, *311*, 125975. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125975>.
- (122) Koczula, K. M.; Gallotta, A. Lateral Flow Assays. *Essays Biochem.* **2016**, *60*, 111–120. <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>.
- (123) Liang, Y. F.; Zhou, X. W.; Wang, F.; Shen, Y. D.; Xiao, Z. L.; Zhang, S. W.; Li, Y. J.; Wang, H. Development of a Monoclonal Antibody-Based ELISA for the Detection of *Alternaria* Mycotoxin Tenuazonic Acid in Food Samples. *Food Anal. Methods* **2020**, *13*, 1594–1602. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01780-w>.
- (124) Kong, D.; Liu, L.; Song, S.; Zheng, Q.; Wu, X.; Kuang, H. Rapid Detection of Tenuazonic Acid in Cereal and Fruit Juice Using a Lateral-Flow Immunochromatographic Assay Strip. *Food Agric. Immunol.* **2017**, *28*, 1293–1303. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1337085>.
- (125) Prella, A.; Spadaro, D.; Garibaldi, A.; Gullino, M. L. A New Method for Detection of Five *Alternaria* Toxins in Food Matrices Based on LC-APCI-MS. *Food Chem.* **2013**, *140*, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.065>.
- (126) Janić Hajnal, E.; Orčić, D.; Torbica, A.; Kos, J.; Mastilović, J.; Škrinjar, M. *Alternaria* Toxins in Wheat from the Autonomous Province of Vojvodina, Serbia: A Preliminary Survey. *Food Addit Contam Part A* **2015**, *32*, 361–370. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1007533>.
- (127) Hickert, S.; Bergmann, M.; Ersen, S.; Cramer, B.; Humpf, H. U. Survey of *Alternaria* Toxin Contamination in Food from the German Market, Using a Rapid HPLC-MS/MS Approach. *Mycotoxin Res.* **2016**, *32*, 7–18. <https://doi.org/10.1007/s12550-015-0233-7>.
- (128) Guo, W.; Yang, J.; Niu, X.; Tangni, E. K.; Zhao, Z.; Han, Z. A Reliable and Accurate UHPLC-MS/MS Method for Screening of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Alternaria* Mycotoxins in Orange, Grape and Apple Juices. *Anal. Methods* **2021**, *13*, 192–201. <https://doi.org/10.1039/d0ay01787f>.
- (129) Qiao, X.; Yin, J.; Yang, Y.; Zhang, J.; Shao, B.; Li, H.; Chen, H. Determination of *Alternaria* Mycotoxins in Fresh Sweet Cherries and Cherry-Based Products: Method Validation and Occurrence. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 11846–11853. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05065>.
- (130) Wang, F.; Li, Z. F.; Yang, Y. Y.; Wan, D. Bin; Vasylieva, N.; Zhang, Y. Q.; Cai, J.; Wang, H.; Shen, Y. D.; Xu, Z. L.; Hammock, B. D. Chemiluminescent Enzyme Immunoassay and Bioluminescent Enzyme Immunoassay for Tenuazonic Acid Mycotoxin by Exploitation of Nanobody and Nanobody-Nanoluciferase Fusion. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 11935–11942. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02338>.
- (131) Arreguin-campos, R.; Jiménez-Monroy, K. L.; Diliën, H.; Cleij, T. J.; Grinsven, B. V.; Eersels, K. Imprinted Polymers as Synthetic Receptors in Sensors for Food Safety.

- Biosensors* **2021**, *11*, 46–75.
- (132) Bowman-James, K.; Bianchi, A.; García-España, E. *Anion Coordination Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2011. <https://doi.org/10.1002/9783527639502>.
- (133) Gale, P. A.; Sessler, J. L.; Cho, W. S. *Anion Receptor Chemistry*; Fraser-Stoddart, J., Ed.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2006; Vol. 8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/9781847552471>.
- (134) Smith, P. J.; Reddington, M. V.; Wilcox, C. S. Ion Pair Binding. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6085–6088.
- (135) Li, A.-F.; Wang, J.-H.; Wang, F.; Jiang, Y.-B. Anion Complexation and Sensing Using Modified Urea and Thiourea-Based Receptors. *Chem. Soc. Rev* **2010**, *39*, 3279–3745.
- (136) Gunnlaugsson, T.; Davis, A. P.; Hussey, G. M.; Tierney, J.; Glynn, M. Design, Synthesis and Photophysical Studies of Simple Fluorescent Anion PET Sensors Using Charge Neutral Thiourea Receptors. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1856–1863. <https://doi.org/10.1039/b404706k>.
- (137) Descalzo, A. B.; Rurack, K.; Weisshoff, H.; Martínez-Mañez, R.; Marcos, M. D.; Amorós, P.; Hoffmann, K.; Soto, J. Rational Design of a Chromo- and Fluorogenic Hybrid Chemosensor Material for the Detection of Long-Chain Carboxylates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 184–200. <https://doi.org/10.1021/ja045683n>.
- (138) Amendola, V.; Bergamaschi, G.; Boiocchi, M.; Fabbrizzi, L.; Mosca, L. The Interaction of Fluoride with Fluorogenic Ureas: An ON¹-OFF-ON² Response. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6345–6355. <https://doi.org/10.1021/ja4019786>.
- (139) Chen, L.; Berry, S. N.; Wu, X.; Howe, E. N. W.; Gale, P. A. Advances in Anion Receptor Chemistry. *Chem* **2020**, *6*, 1–81. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2019.12.002>.
- (140) Mo, H. J.; Niu, Y. L.; Zhang, M.; Qiao, Z. P.; Ye, B. H. Photophysical, Electrochemical and Anion Sensing Properties of Ru(II) Bipyridine Complexes with 2,2'-Biimidazole-like Ligand. *Dalt. Trans.* **2011**, *40*, 8218–8225. <https://doi.org/10.1039/c0dt01446j>.
- (141) Rommel, S. A.; Sorsche, D.; Fleischmann, M.; Rau, S. Optical Sensing of Anions via Supramolecular Recognition with Biimidazole Complexes. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 18101–18119. <https://doi.org/10.1002/chem.201605782>.
- (142) Kljun, J.; Turel, I. β -Diketones as Scaffolds for Anticancer Drug Design – From Organic Building Blocks to Natural Products and Metallodrugs Components. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 1655–1666. <https://doi.org/10.1002/ejic.201601314>.
- (143) Stanić, Z. Curcumin, a Compound from Natural Sources, a True Scientific Challenge – A Review. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2017**, *72*. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0590-1>.
- (144) Li, S.; Si, T.; Wang, M.; Zhao, H. Development of a Synthetic Malonyl-CoA Sensor in *Saccharomyces Cerevisiae* for Intracellular Metabolite Monitoring and Genetic Screening. *ACS Synth. Biol.* **2015**, *4*, 1308–1315. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00069>.
- (145) Bao, Y.; Li, Q.; Liu, B.; Du, F.; Tian, J.; Wang, H.; Wang, Y.; Bai, R. Conjugated Polymers

- Containing a 2,2'-Biimidazole Moiety—a Novel Fluorescent Sensing Platform. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 118–120. <https://doi.org/10.1039/c1cc15787f>.
- (146) Bao, Y.; Wang, H.; Li, Q.; Liu, B.; Li, Q.; Bai, W.; Jin, B.; Bai, R. 2,2'-Biimidazole-Based Conjugated Polymers As a Novel Fluorescent Sensing Platform for Pyrophosphate Anion. *Macromolecules* **2012**, *45*, 3394–3401. <https://doi.org/10.1021/ma300361t>.
- (147) Robertson, C. A.; Evans, D. H.; Abrahamse, H. Photodynamic Therapy (PDT): A Short Review on Cellular Mechanisms and Cancer Research Applications for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2009**, *96*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>.
- (148) Castano, A. P.; Mroz, P.; Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy and Anti-Tumour Immunity. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 535–545. <https://doi.org/10.1038/nrc1894>.
- (149) O'Connor, A. E.; Gallagher, W. M.; Byrne, A. T. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 1053–1074. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x>.
- (150) Nath, S.; Saad, M. A.; Pigula, M.; Swain, J. W. R.; Hasan, T. Photoimmunotherapy of Ovarian Cancer: A Unique Niche in the Management of Advanced Disease. *Cancers*. **2019**, *11*, 1887. <https://doi.org/10.3390/cancers11121887>.
- (151) Ash, C.; Dubec, M.; Donne, K.; Bashford, T. Effect of Wavelength and Beam Width on Penetration in Light-Tissue Interaction Using Computational Methods. *Lasers Med. Sci.* **2017**, *32*, 1909–1918. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2317-4>.
- (152) Mallidi, S.; Anbil, S.; Bulin, A. L.; Obaid, G.; Ichikawa, M.; Hasan, T. Beyond the Barriers of Light Penetration: Strategies, Perspectives and Possibilities for Photodynamic Therapy. *Theranostics* **2016**, *6*, 2458–2487. <https://doi.org/10.7150/thno.16183>.
- (153) Stolik, S.; Delgado, J. A.; Pérez, A.; Anasagasti, L. Measurement of the Penetration Depths of Red and near Infrared Light in Human "ex Vivo" Tissues. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2000**, *57*, 90–93. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(00\)00082-8](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00082-8).
- (154) Baskaran, R.; Lee, J.; Yang, S. G. Clinical Development of Photodynamic Agents and Therapeutic Applications. *Biomater. Res.* **2018**, *22*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0140-z>.
- (155) Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part One - Photosensitizers, Photochemistry and Cellular Localization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2004**, *1*, 279–293. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4).
- (156) Zhang, J.; Jiang, C.; Figueiró Longo, J. P.; Azevedo, R. B.; Zhang, H.; Muehlmann, L. A. An Updated Overview on the Development of New Photosensitizers for Anticancer Photodynamic Therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **2018**, *8*, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.09.003>.
- (157) Liu, J.; Zhang, C.; Rees, T. W.; Ke, L.; Ji, L.; Chao, H. Harnessing Ruthenium(II) as

- Photodynamic Agents: Encouraging Advances in Cancer Therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *363*, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.002>.
- (158) Monro, S.; Colón, K. L.; Yin, H.; Roque, J.; Konda, P.; Gujar, S.; Thummel, R. P.; Lilge, L.; Cameron, C. G.; McFarland, S. A. Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 797–828. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00211>.
- (159) Huang, Y.; Sharma, S. K.; Dai, T.; Chung, H.; Garcia-diaz, M.; Chang, J.; Chiang, L. Y.; Michael, R. H. Can Nanotechnology Potentiate Photodynamic Therapy? *Nanotechnol Rev.* **2012**, *1*, 111–146.
- (160) Obaid, G.; Broekgaarden, M.; Bulin, A. L.; Huang, H. C.; Kuriakose, J.; Liu, J.; Hasan, T. Photonanomedicine: A Convergence of Photodynamic Therapy and Nanotechnology. *Nanoscale* **2016**, *8*, 12471–12503. <https://doi.org/10.1039/c5nr08691d>.
- (161) Sanoj Rejinold, N.; Choi, G.; Choy, J. H. Recent Trends in Nano Photo-Chemo Therapy Approaches and Future Scopes. *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *411*, 213252. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213252>.
- (162) Lucky, S. S.; Soo, K. C.; Zhang, Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 1990–2042. <https://doi.org/10.1021/cr5004198>.
- (163) McCarthy, J. R.; Perez, J. M.; Brückner, C.; Weissleder, R. Polymeric Nanoparticle Preparation That Eradicates Tumors. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 2552–2556. <https://doi.org/10.1021/nl0519229>.
- (164) Soliman, N.; Sol, V.; Ouk, T. S.; Thomas, C. M.; Gasser, G. Encapsulation of a Ru(II) Polypyridyl Complex into Polylactide Nanoparticles for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 1–10. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100961>.
- (165) Obaid, G.; Jin, W.; Bano, S.; Kessel, D.; Hasan, T. Nanolipid Formulations of Benzoporphyrin Derivative: Exploring the Dependence of Nanoconstruct Photophysics and Photochemistry on Their Therapeutic Index in Ovarian Cancer Cells. *Photochem. Photobiol.* **2019**, *95*, 364–377. <https://doi.org/10.1111/php.13002>.
- (166) Jeong, H.; Huh, M.; Lee, S. J.; Koo, H.; Kwon, I. C.; Jeong, S. Y.; Kim, K. Photosensitizer-Conjugated Human Serum Albumin Nanoparticles for Effective Photodynamic Therapy. *Theranostics* **2012**, *1*, 230–239. <https://doi.org/10.7150/thno/v01p0230>.
- (167) Gao, S.; Wang, J.; Tian, R.; Wang, G.; Zhang, L.; Li, Y.; Li, L.; Ma, Q.; Zhu, L. Construction and Evaluation of a Targeted Hyaluronic Acid Nanoparticle/Photosensitizer Complex for Cancer Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 32509–32519. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b09331>.
- (168) Lee, S. J.; Park, K.; Oh, Y. K.; Kwon, S. H.; Her, S.; Kim, I. S.; Choi, K.; Lee, S. J.; Kim, H.; Lee, S. G.; Kim, K.; Kwon, I. C. Tumor Specificity and Therapeutic Efficacy of Photosensitizer-Encapsulated Glycol Chitosan-Based Nanoparticles in Tumor-Bearing Mice.

- Biomaterials* **2009**, *30*, 2929–2939. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.058>.
- (169) Kunzi-Rapp, K. Photodynamic Therapy in Dermatology. *Photonics Lasers Med.* **2015**, *4*, 378–379. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(00\)90209-3](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(00)90209-3).
- (170) Hu, X.; Huang, Y. Y.; Wang, Y.; Wang, X.; Hamblin, M. R. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01299>.
- (171) Manjón, F.; Santana-Magaña, M.; García-Fresnadillo, D.; Orellana, G. Singlet Oxygen Sensitizing Materials Based on Porous Silicone: Photochemical Characterization, Effect of Dye Reloading and Application to Water Disinfection with Solar Reactors. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 838–845. <https://doi.org/10.1039/c0pp00026d>.
- (172) Li, X.; Wu, B.; Chen, H.; Nan, K.; Jin, Y.; Sun, L.; Wang, B. Recent Developments in Smart Antibacterial Surfaces to Inhibit Biofilm Formation and Bacterial Infections. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 4274–4292. <https://doi.org/10.1039/C8TB01245H>.
- (173) Wiehe, A.; O'Brien, J. M.; Senge, M. O. Trends and Targets in Antiviral Phototherapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 2565–2612. <https://doi.org/10.1039/c9pp00211a>.
- (174) Beaudet, L.; Rodriguez-suarez, R.; Caron, M.; Bédard, J.; Brechler, V.; Parent, S.; Bielefeld-sévigny, M. AlphaLISA Immunoassays: The No-Wash Alternative to ELISAs for Research and Drug Discovery. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 8–9.
- (175) Eglén, R. M.; Reisine, T.; Roby, P.; Rouleau, N.; Illy, C.; Bossé, R.; Bielefeld, M. The Use of AlphaScreen Technology in HTS: Current Status. *Curr. Chem. Genomics* **2008**, *1*, 2–10. <https://doi.org/10.2174/1875397300801010002>.
- (176) Ogilby, P. R. Singlet Oxygen: There Is Indeed Something New under the Sun. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3181–3209. <https://doi.org/10.1039/b926014p>.
- (177) Johnson, E. C.; Sullivan, B. P.; Salmon, D. J.; Adeyemi, S. A.; Meyer, T. J. Synthesis and Properties of the Chloro-Bridged Dimer [(Bpy)₂RuCl]₂²⁺ and Its Transient 3+ Mixed-Valence Ion. *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 2211–2215. <https://doi.org/10.1021/ic50186a038>.
- (178) Orellana, G.; Alvarez Ibarra, C.; Santoro, J. ¹H and ¹³C NMR Coordination-Induced Shifts in a Series of Tris(α-Diimine)Ruthenium(II) Complexes Containing Pyridine, Pyrazine, and Thiazole Moieties. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 1025–1030. <https://doi.org/10.1021/ic00279a018>.
- (179) Cui, Y.; Mo, H. J.; Chen, J. C.; Niu, Y. L.; Zhong, Y. R.; Zheng, K. C.; Ye, B. H. Anion-Selective Interaction and Colorimeter by an Optical Metalloceptor Based on Ruthenium(II) 2,2'-Biimidazole: Hydrogen Bonding and Proton Transfer. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 6427–6436. <https://doi.org/10.1021/ic7004562>.
- (180) Rau, S.; Rüben, M.; Büttner, T.; Temme, C.; Dautz, S.; Görls, H.; Rudolph, M.; Walther, D.; Brodkorb, A.; Duati, M.; O'Connor, C.; Vos, J. G. Bis(R-Bipyridyl)Ruthenium Bibenzimidazole Complexes (R = H, Me or Bu'): Supramolecular Arrangement via Hydrogen Bonds, Photo- And Electro-Chemical Properties and Reactivity towards Carbon

- Dioxide. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2000**, 3649–3657. <https://doi.org/10.1039/b003992f>.
- (181) Sorsche, D.; Rommel, S. A.; Rau, S. Functional Dimming of Pincer-Shaped Bibenzimidazole-Ruthenium(II) Complexes with Improved Anion-Sensitive Luminescence. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, 1503–1513. <https://doi.org/10.1002/ejic.201501472>.
- (182) Mo, H. J.; Chao, H. Y.; Ye, B. H. A Ruthenium Biimidazole-like Anion Receptor with Two Chelating NH-O Intramolecular Hydrogen Bonds. *Inorg. Chem. Commun.* **2013**, *35*, 100–103. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2013.06.004>.
- (183) Abdel-Shafi, A. A.; Beer, P. D.; Mortimer, R. J.; Wilkinson, F. Photosensitized Generation of Singlet Oxygen from (Substituted Bipyridine)Ruthenium(II) Complexes. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 2784–2795. [https://doi.org/10.1002/1522-2675\(20010919\)84:9<2784::AID-HLCA2784>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1522-2675(20010919)84:9<2784::AID-HLCA2784>3.0.CO;2-U).
- (184) Haga, M. A. Synthesis and Protonation-Deprotonation Reactions of Ruthenium(II) Complexes Containing 2, 2'-Bibenzimidazole and Related Ligands. *Inorganica Chim. Acta* **1983**, *75*, 29–35. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)91186-1](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)91186-1).
- (185) Bordwell, F. G. Equilibrium Acidities in Dimethyl Sulfoxide Solution. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 456–463. <https://doi.org/10.1021/ar00156a004>.
- (186) O'Donnell, R. M.; Sampaio, R. N.; Li, G.; Johansson, P. G.; Ward, C. L.; Meyer, G. J. Photoacidic and Photobasic Behavior of Transition Metal Compounds with Carboxylic Acid Group(S). *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3891–3903. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b00454>.
- (187) Zhang, Y.; Zhou, N.; Akella, S.; Kuang, Y.; Kim, D.; Schwartz, A.; Bezpalko, M.; Foxman, B. M.; Fraden, S.; Epstein, I. R.; Xu, B. Active Cross-Linkers That Lead to Active Gels. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52*, 11494–11498. <https://doi.org/10.1002/anie.201304437>.
- (188) Puodziukynaite, E.; Oberst, J. L.; Dyer, A. L.; Reynolds, J. R. Establishing Dual Electrogenerated Chemiluminescence and Multicolor Electrochromism in Functional Ionic Transition-Metal Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 968–978. <https://doi.org/10.1021/ja2065297>.
- (189) Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165–195. <https://doi.org/10.1021/cr00002a004>.
- (190) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69. <https://doi.org/10.1589/jpts.29.112>.
- (191) Niu, M.; Pham-Huy, C.; He, H. Core-Shell Nanoparticles Coated with Molecularly Imprinted Polymers: A Review. *Microchim. Acta* **2016**, *183*, 2677–2695. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1930-4>.
- (192) Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Radical Addition-Fragmentation Chemistry in Polymer Synthesis. *Polymer* **2008**, *49*, 1079–1131. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.11.020>.
- (193) Wagner, S.; Zapata, C.; Wan, W.; Gawlitza, K.; Weber, M.; Rurack, K. Role of Counterions in Molecularly Imprinted Polymers for Anionic Species. *Langmuir* **2018**, *34*, 6963–6975.

- <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00500>.
- (194) Moulder, J. E.; Rockwell, S. Tumor Hypoxia: Its Impact on Cancer Therapy. *Cancer Metastasis Rev.* **1987**, *5*, 313–341. <https://doi.org/10.1007/BF00055376>.
- (195) Du, J.; Shi, T.; Long, S.; Chen, P.; Sun, W.; Fan, J.; Peng, X. Enhanced Photodynamic Therapy for Overcoming Tumor Hypoxia: From Microenvironment Regulation to Photosensitizer Innovation. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *427*, 213604. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213604>.
- (196) Shalan, H.; Colbert, A.; Nguyen, T. T.; Kato, M.; Cheruzel, L. Correlating the Para-Substituent Effects on Ru(II)-Polypyridine Photophysical Properties and on the Corresponding Hybrid P450 BM3 Enzymes Photocatalytic Activity. *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 6558–6564. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b00685>.
- (197) Montaldi, M.; Credi, A.; Prodi, L.; Gandolfi, M. T. *Handbook of Photochemistry*, 3rd ed.; CRC Press, 2006. <https://doi.org/10.1201/9781420015195>.
- (198) Karges, J.; Heinemann, F.; Jakubaszek, M.; Maschietto, F.; Subecz, C.; Dotou, M.; Vinck, R.; Blacque, O.; Tharaud, M.; Goud, B.; Viñuelas Zahlnos, E.; Spingler, B.; Ciofini, I.; Gasser, G. Rationally Designed Long-Wavelength Absorbing Ru(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 6578–6587. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b13620>.
- (199) Demas, J. N.; Diemente, D.; Harris, E. W. Oxygen Quenching of Charge-Transfer Excited States of Ruthenium(II) Complexes. Evidence for Singlet Oxygen Production. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 6864–6865. <https://doi.org/10.1021/ja00801a073>.
- (200) Schmidt, R.; Tanielian, C.; Dunsbach, R.; Wolff, C. Phenalenone, a Universal Reference Compound for the Determination of Quantum Yields of Singlet Oxygen O₂(¹Δg) Sensitization. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1994**, *79*, 11–17.
- (201) García-Fresnadillo, D.; Georgiadou, Y.; Orellana, G.; Braun, A. M.; Oliveros, E. Singlet-Oxygen (¹Δg) Production by Ruthenium(II) Complexes Containing Polyazaheterocyclic Ligands in Methanol and in Water. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1222–1238. <https://doi.org/10.1002/hlca.19960790428>.
- (202) Achord, J. M.; Hussey, C. L. Determination of Dissolved Oxygen in Nonaqueous Electrochemical Solvents. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 601–602. <https://doi.org/10.1021/ac50053a061>.
- (203) Chevalet, J.; Rouelle, F.; Gierst, L.; Lambert, J. P. Electrogeneration and Some Properties of the Superoxide Ion in Aqueous Solutions. *J. Electroanal. Chem.* **1972**, *39*, 201–216. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(72\)80488-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(72)80488-1).
- (204) Zielonka, J.; Vasquez-Vivar, J.; Kalyanaraman, B. Detection of 2-Hydroxyethidium in Cellular Systems: A Unique Marker Product of Superoxide and Hydroethidine. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 8–21. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.473>.
- (205) Saneja, A.; Arora, D.; Kumar, R.; Dubey, R. D.; Panda, A. K.; Gupta, P. N. CD44 Targeted PLGA Nanomedicines for Cancer Chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *121*, 47–58.

- <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.05.012>.
- (206) Park, J. K.; Yeom, J.; Oh, E. J.; Reddy, M.; Kim, J. Y.; Cho, D. W.; Lim, H. P.; Kim, N. S.; Park, S. W.; Shin, H. I.; Yang, D. J.; Park, K. B.; Hahn, S. K. Guided Bone Regeneration by Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Grafted Hyaluronic Acid Bi-Layer Films for Periodontal Barrier Applications. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 3394–3403. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.05.019>.
- (207) Tan, H.; Chu, C. R.; Payne, K. A.; Marra, K. G. Injectable in Situ Forming Biodegradable Chitosan-Hyaluronic Acid Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2499–2506. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.080>.
- (208) Thomas, A. P.; Palanikumar, L.; Jeena, M. T.; Kim, K.; Ryu, J. H. Cancer-Mitochondria-Targeted Photodynamic Therapy with Supramolecular Assembly of HA and a Water Soluble NIR Cyanine Dye. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 8351–8356. <https://doi.org/10.1039/c7sc03169f>.
- (209) Cieplik, F.; Deng, D.; Crielaard, W.; Buchalla, W.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A.; Maisch, T. Antimicrobial Photodynamic Therapy—What We Know and What We Don't. *Crit. Rev. Microbiol.* **2018**, *44*, 571–589. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467876>.
- (210) Silva, A. V.; López-Sánchez, A.; Junqueira, H. C.; Rivas, L.; Baptista, M. S.; Orellana, G. Riboflavin Derivatives for Enhanced Photodynamic Activity against Leishmania Parasites. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 457–462. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.11.072>.
- (211) Munteanu, A.-C.; Uivarosi, V. Ruthenium Complexes in the Fight against Pathogenic Microorganisms. An Extensive Review. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 874. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060874>.
- (212) Loutet, S. A.; Valvano, M. A. Extreme Antimicrobial Peptide and Polymyxin B Resistance in the Genus Burkholderia. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00159>.
- (213) Le Gall, T.; Lemercier, G.; Chevreux, S.; Tücking, K. S.; Ravel, J.; Thétiot, F.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Montier, T. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers for Antibacterial Photodynamic Therapy: A Structure–Activity Study on Clinical Bacterial Strains. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2229–2239. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800392>.
- (214) Feng, Y.; Sun, W. Z.; Wang, X. S.; Zhou, Q. X. Selective Photoinactivation of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus by Highly Positively Charged Ru^{II} Complexes. *Chem. - A Eur. J.* **2019**, *25*, 13879–13884. <https://doi.org/10.1002/chem.201903923>.
- (215) Frei, A.; Rubbiani, R.; Tubafard, S.; Blacque, O.; Anstaett, P.; Felgenträger, A.; Maisch, T.; Spiccia, L.; Gasser, G. Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of New Ru(II) Polypyridyl Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7280–7292. <https://doi.org/10.1021/jm500566f>.
- (216) Arenas, Y.; Monro, S.; Shi, G.; Mandel, A.; McFarland, S.; Lilge, L. Photodynamic Inactivation of Staphylococcus Aureus and Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus with Ru(II)-Based Type I/Type II Photosensitizers. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2013**,

10, 615–625. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.07.001>.

