

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Formación de Complejos Moleculares de Dopamina y
Sustancias Estructuralmente Relacionadas con Dos
Receptores Fluorescentes Acíclicos Tipo *Bis-pirenil*
Derivados del Ácido Etilendiaminotetraacético



TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Johanna Guadalupe Peña Del Castillo

Hermosillo, Sonora

Enero 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado calificador designados para revisar la tesis profesional de Johanna Guadalupe Peña Del Castillo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de Químico Biólogo Clínico.

Dra. Lorena Machi Lara
Directora de tesis

Dr. Fernando Rocha Alonzo
Secretario

Dra. Rocío Sugich Miranda
Vocal

M.C. Rosa Esthela Fraga Serrano
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a mi directora de tesis la Dra. Lorena Machi Lara, por el apoyo, paciencia, tiempo y asesoría brindada para poder realizar este trabajo. Y a mis sinodales a la Dra. Rocío Sugich Miranda, Dr. Fernando Rocha Alonzo y M.C. Rosa Esthela Fraga Serrano, por su tiempo y paciencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado para la realización de este trabajo de tesis, a través del Proyecto con No. de Referencia: 79272.

A mis compañeros y amigos, Dr. Refugio Perez (Cuco), M.C. Eduardo Avila (Lalo), el ya casi M.C. Moises Vera (Moi), por su paciencia y ayuda en este trabajo. Leylanie, Menio, Martin (Che), Luis, Yesessita, Cucush, Melgoza (Gusano), Montoya, Cynthia y Chochil, gracias por apoyarme y soportarme.

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis va dedica a mi mama y abuela por todo el amor, tiempo y confianza que me ha mostrado todo el tiempo, ya que siempre ha estado ahí en todo momento, las quiero con todo mi corazón. A demás va dedicada a mis hermanos Ray, Humberto y Enano, que aunque los desesperaba siempre me mostraron su apoyo los quiero!..

CONTENIDO

FORMA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
DEDICATORIA	4
CONTENIDO	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	9
OBJETIVOS	10
Objetivo General	10
Objetivos Particulares	10
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
ANTECEDENTES.....	16
Química Supramolecular	16
Quimiosensores Fluorescentes	17
Aminas Bioactivas	19
Sensores Fluorescentes para Aminas Bioactivas.....	20
Sensores Fluorescentes Derivados del Ácido Fenilborónico.....	20
Sensores Fluorescentes Derivados de Pireno	21
METODOLOGÍA.....	28
Materiales	28
Técnicas y Equipo de Laboratorio Utilizados.....	28
Espectroscopia de Ultravioleta-Visible (UV-Vis).....	28
Espectroscopia de Fluorescencia	28
Programas Computacionales.....	29
Preparación de las Soluciones para las Mediciones.....	29
Obtención de los Espectros de Absorción y Emisión de los Huéspedes.....	30
Estudios de Complejación Molecular.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
Estudios de Complejación Molecular.....	31
Estudios de Complejación con (edta1mpy)H ₂	34
Estudios de Complejación con (edta1py)H ₂	43

CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXO 1	51
Titulaciones Espectrométricas.....	51
ANEXO 2	54

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Componentes de un sensor fluorescente, A) esquema clásico, B) esquema con espaciador, C) esquema de un sensor bicroromofórico.....	18
2.	Formación de excímero, con las correspondientes bandas de monómero y excímero.....	18
3.	A) Puntos de reconocimiento entre el sensor L1 basado en el ácido fenilborónico y L-Dopa; B) Espectros de emisión de L1 (5 μ M) en respuesta al aumento de la concentración de L-Dopa en solución de buffer (0.1 M MOPS) a pH 7.2. Longitud de onda de excitación $\lambda_{exc}=430$ nm	21
4.	A) Sensor fluorescente formado por dos grupos imidazol, dos grupos pireno y un ácido borónico L2; B) Espectros de emisión del receptor L2 en ausencia y en presencia de 100 equiv. de cada una de las siguientes sustancias: catecol, DOPAC, dopamina, L-Dopa, D-fructosa, D-glucosa y L-fenilalanina en buffer HEPES (0.02 M, pH 7,4). Longitud de onda de excitación: 354 nm.....	23
5.	Espectros de emisión de (edta1py)H ₂ en solución acuosa a valores de pH seleccionados. Las intensidades espectrales se normalizan con el pico máximo del espectro más intenso. La longitud de onda de excitación, $\lambda_{exc}=342$ nm, y la concentración del ligante 2×10^{-6} M. Recuadro: intensidad de emisión (a.u) a 490 nm como una función del pH	24
6.	Espectros de emisión de (edta1mpy)H ₂ en solución acuosa a valores de pH seleccionados. Las intensidades espectrales se normalizan con el pico máximo del espectro más intenso. La longitud de onda de excitación, $\lambda_{exc}=342$ nm, y la concentración del ligante 1×10^{-6} M. Recuadro: relación de intensidad excímero-monómero (I_E / I_M) como una función del pH	25
7.	Espectros obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (edta1py)H ₂ con dopamina a pH= 7.0 (KH ₂ PO ₄ , 0.1 M), $\lambda_{exc}=342$ nm, T=25°C. [(edta1py)H ₂]=0.001 mM, [dopamina]= de arriba abajo 0,0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.006, 0.007, 0.008, 0.009,0.01 mM.....	26
8.	Representación de las que conforman cada grupo de huéspedes.	33
9.	Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (edta1mpy)H ₂ con dopamina en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS), $\lambda_{exc}=342$ nm, T=25°C, [L]= 5×10^{-7} M. La concentración de dopamina fue: 0 M (—), 2×10^{-5} M (—), 1×10^{-4} M (.....), 1.2×10^{-4} M (---), 2.4×10^{-4} M (---). Recuadro: Variación en la intensidad de emisión a $\lambda=494$ nm (normalizada) en función de la razón molar huésped/ligante [H]/[L]. I ₀ representa la intensidad de emisión a [H]=0.	34
10.	Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (edta1mpy)H ₂ con L-Dopa en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS), $\lambda_{exc}=342$ nm, T=25°C, [L]= 5×10^{-7} M. La concentración de L-Dopa fue: 0 M (—), 2×10^{-5} M (—) (la flecha indica la intensidad multiplicada por 0.9), 1×10^{-4} M (.....), 2.4×10^{-4} M (---), 4.4×10^{-4} M (---). Recuadro: Variación en la	

- intensidad de emisión a $\lambda_{exc} = 494$ nm (normalizada) en función de la razón molar huésped/ligante $[H]/[L]$. I_0 representa la intensidad de emisión a $[H]=0$ 37
11. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (edta1mpy) H_2 con catecol en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS), $\lambda_{exc} = 342$ nm, $T=25^\circ C$, $[L]= 5 \times 10^{-7}$ M. La concentración de catecol fue: a) 0 M, b) 2×10^{-5} M, c) 2.2×10^{-4} M, d) 5.2×10^{-4} M. Recuadro: Cambio de la intensidad de fluorescencia (I_F) a $\lambda=394$ nm en función de la razón molar huésped/ligante $[H]/[L]$ 38
12. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (edta1mpy) H_2 con tiramina en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS), $\lambda_{exc} = 342$ nm, $T=25^\circ C$, $[L]= 5 \times 10^{-7}$ M. La concentración de tiramina fue: a) 0 M, b) 6×10^{-5} M, c) 1.2×10^{-4} M, d) 2×10^{-4} M, e) 3.2×10^{-4} M, f) 4.6×10^{-4} M, g) 5.2×10^{-4} M. Recuadro: Variación en la intensidad de emisión a $\lambda= 494$ nm (normalizada) en función de la razón molar huésped/ligante $[H]/[L]$. I_0 representa la intensidad de emisión a $[H]=0$ 39
13. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (edta1mpy) H_2 con fenetilamina en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS), $\lambda_{exc} = 342$ nm, $T=25^\circ C$, $[L]= 5 \times 10^{-7}$ M. La concentración de fenetilamina fue: a) 0 M, b) 2×10^{-5} M, c) 8×10^{-5} M, d) 1.6×10^{-4} M, e) 2×10^{-4} M, f) 3.4×10^{-4} M, g) 5.2×10^{-4} M. Recuadro: Relación de la intensidad excímero/monómero ($I_E=480$ nm; $I_M=380$ nm)..... 41
14. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (edta1mpy) H_2 con L-fenilalanina en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS), $\lambda_{exc} = 342$ nm, $T=25^\circ C$, $[L]= 5 \times 10^{-7}$ M. La concentración de L-fenilalanina fue: a) 0 M, b) 4×10^{-5} M, c) 1×10^{-4} M, d) 1.4×10^{-4} M, e) 2×10^{-4} M, f) 2.6×10^{-4} M, g) 3.6×10^{-4} M. Recuadro: Cambio de la intensidad de fluorescencia (I_F) a $\lambda=380$ nm en función de la razón molar huésped/ligante $[H]/[L]$ 42
15. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (edta1py) H_2 con L-fenilalanina en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS), $\lambda_{exc} = 342$ nm, $T=25^\circ C$, $[L]= 5 \times 10^{-7}$ M. La concentración de L-fenilalanina fue: a) 0 M, b) 2×10^{-5} , c) 1.2×10^{-4} M, d) 2×10^{-4} M, e) 3.6×10^{-4} M, f) 4.4×10^{-4} M, g) 5×10^{-4} M. Recuadro: Relación de la intensidad de emisión I_{500}/I_{480} en función de la razón molar huésped/ligante $[H]/[L]$ 44
16. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (edta1py) H_2 con catecol en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS), $\lambda_{exc} = 342$ nm, $T=25^\circ C$, $[L]= 5 \times 10^{-7}$ M. La concentración de catecol fue: 0 M (—), 2×10^{-5} M (---), 1×10^{-4} M (----), 2.4×10^{-4} M (---). Recuadro: relación de la intensidad excímero/monómero ($I_E=480$ nm; $I_M=380$ nm)..... 45

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Constantes de formación ($\log K_f$) de los complejos de (edta1mpy) H_2 con los diferentes huéspedes	35
2.	Constantes de formación ($\log K_f$) de los complejos de (edta1py) H_2 con los diferentes huéspedes	46

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar las propiedades de reconocimiento molecular de dopamina y sustancias estructuralmente relacionadas por dos receptores fluorescentes acíclicos tipo *bis*-pirenil derivados del ácido etilendiaminotetraacético.

Objetivos Particulares

1. Estudiar la formación de los complejos moleculares mediante espectroscopia de fluorescencia.
2. Evaluar el efecto de la estructura química de los huéspedes en la estabilidad de los complejos, con base en las constantes de asociación determinadas por fluorescencia.
3. Establecer el potencial de aplicación de los receptores como sensores fluorescentes de dopamina.

RESUMEN

En el presente trabajo se realizaron estudios de complejación molecular dirigidos a dopamina y moléculas análogas (L-Dopa, tiramina, fenetilamina, L-fenilalanina y catecol) con los ligantes (edta1py) H_2 y (edta1mpy) H_2 en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS). Estos ligantes presentan las bandas de emisión típicas de pireno, localizadas entre 375 y 400 nm, y una banda de emisión ancha, centrada en 480 nm, la cual es característica de excímeros de pireno. De acuerdo con los valores de pK_a , al pH del estudio ambos ligantes se encontraban predominantemente en su forma monoaniónica, con los dos grupos carboximeto ionizados y la cadena de interconexión edta protonada y con una carga positiva, y los huéspedes se encontraban ya sea en su forma catiónica (dopamina, tiramina y fenetilamina), neutra (catecol) o zwitteriónica (L-Dopa y L-fenilalanina).

El ligante (edta1mpy) H_2 presentó mejores respuestas fluorescentes que (edta1py) H_2 al interactuar con los huéspedes y formó complejos con dopamina, L-Dopa, tiramina y fenetilamina, con el siguiente orden de estabilidad: dopamina ($\log K_F = 7.91$) > fenetilamina (4.05) > tiramina (3.92) > L-Dopa (3.46). El complejo (edta1mpy) H_2 -dopamina fue el único con estequiometría 2:1 huésped:ligante (1:1 para los demás complejos) y su mayor estabilidad se atribuyó a que se establecen diferentes fuerzas intermoleculares: 1) Carga-carga entre el grupo CH_2COO^- del ligante y el grupo $-CH_2CH_2NH_3^+$ del huésped, 2) Interacciones π - π aromáticas entre el grupo catecol y los pirenos, y 3) puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del anillo catecol y sitios específicos del receptor.

Los resultados de este estudio muestran que el ligante (edta1mpy) H_2 tiene un alto potencial de ser aplicado como sensor fluorescente de dopamina en medio acuoso bajo condiciones de pH fisiológico.

INTRODUCCIÓN

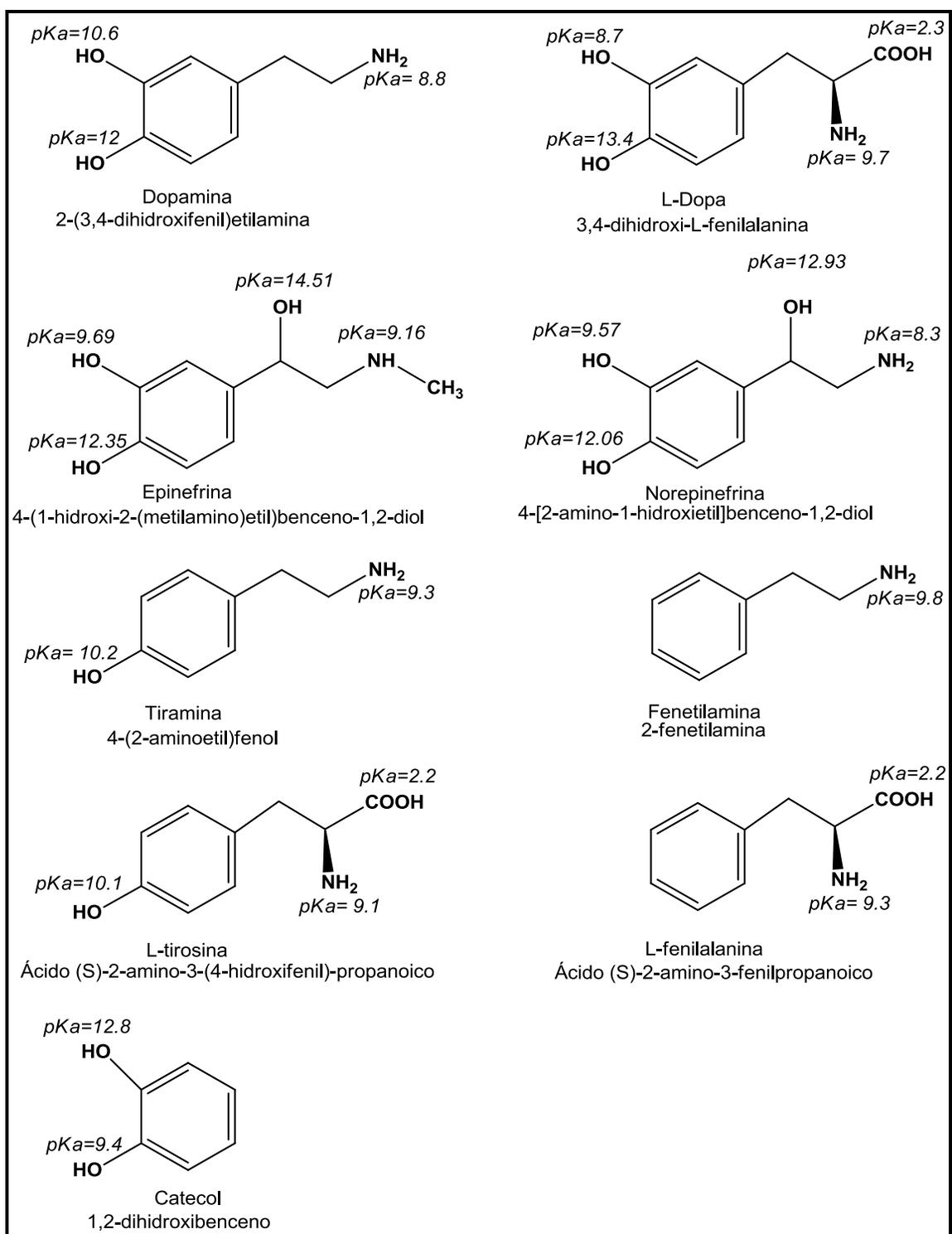
La importancia de algunas aminas bioactivas ha sido un tema de constante interés, ya que tanto el aumento como la disminución de sus niveles en el organismo puede causar problemas graves a la salud. Entre las aminas que se han vinculado con ciertas enfermedades está la dopamina (Esquema I), un importante neurotransmisor del grupo de las catecolaminas. Esta sustancia se relaciona con enfermedades como Parkinson, esquizofrenia, epilepsia, alcoholismo, entre otras (Bahena y col.,2000). La sustancia precursora de dopamina en el organismo, la L-Dopa (Esquema I), ha sido ampliamente utilizada como medicamento en el tratamiento de los pacientes con Parkinson (Lloyd, Davidson y Hornykiewicz, 1975).

Además de la dopamina, existen otros importantes neurotransmisores como son epinefrina y norepinefrina (Esquema I). La epinefrina es liberada en situaciones de estrés o de ejercicio intenso para aumentar los niveles de energía disponible en sangre. Esta sustancia estimula la degradación a glucosa del polisacárido de almacenamiento glucógeno dentro de las células del hígado y del musculo esquelético. Por su parte, la norepinefrina regula el estado de alerta, estado de ánimo, así como la temperatura corporal (Gennaro, 2003). Las cuatro aminas mencionadas anteriormente son sintetizadas a partir del aminoácido L-tirosina (Esquema I).

Debido a la importancia de las aminas citadas y de otras moléculas relacionadas, a través de los años se han desarrollado diferentes métodos de detección. El método más utilizado hasta el momento es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con la cual se pueden medir los niveles séricos o en orina de dichos analitos. La desventaja de este método es que tiene una baja sensibilidad (Peaston y Weinkove, 2004).

Es en el campo de la detección y cuantificación de analitos donde la química supramolecular ha contribuido con el desarrollo de sensores químicos, denominados también quimiosensores. Los quimiosensores fluorescentes, que están basados en la fluorescencia como modo de señalización, son altamente sensibles, ya que alcanzan límites de detección de hasta 10^{-7} M. El diseño clásico de estos compuestos consta de una unidad receptora, que tiene como función unirse al analito de interés, una unidad activa (fluoróforo), que se encarga de emitir la señal, y un espaciador el cual tiene como finalidad modular la interacción entre la unidad receptora y la unidad activa. En la actualidad existe una amplia variedad de sensores moleculares fluorescentes que se pueden adquirir comercialmente. Sin embargo, aún existe la

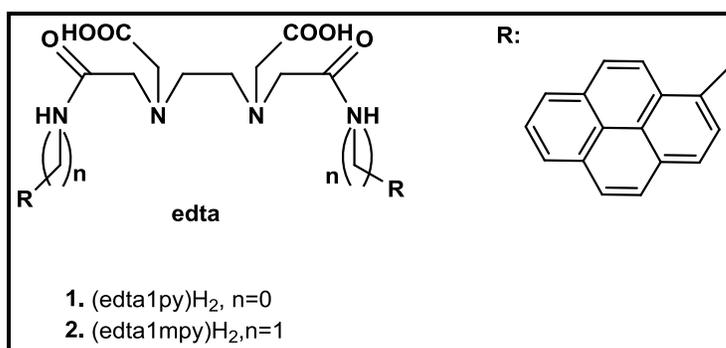
necesidad de sensores con selectividad mejorada y que sean de utilidad para detectar analitos bioquímicos, como son aminoácidos, coenzimas, neurotransmisores, nucleótidos, etc.



Esquema I

En la literatura se han reportado ejemplos de receptores para dopamina y otras aminas con función biológica. Entre ellos se incluyen agentes transportadores de dopamina, receptores que funcionan en disolventes orgánicos y receptores asociados a membranas que reconocen a dopamina en medio acuoso. Además de los compuestos anteriores, se han reportado ciclofanos útiles para el reconocimiento selectivo de dopamina (Secor y Glass, 2004).

En el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora (DIPM-UNISON), el grupo de Química Supramolecular ha trabajado en la preparación de ligantes de cadena abierta tipo *bis*-cromofóricos que contienen dos fluoróforos idénticos (naftaleno (nf), antraceno (an) o pireno (py)) unidos a través de cadenas de interconexión poliaminopolicarboxílicas (ácido etilendiaminotetraacético (edta), ácido dietilentriaminopentaacético (dtpa) y ácido trietilentetraaminohexaacético (ttha)) (Machi y col., 2009; Machi y col., 2007). Dichos ligantes poseen la capacidad de coordinarse con metales y moléculas aromáticas en solución acuosa. Entre los ligantes desarrollados se encuentran los compuestos (edta1py)₂ y (edta1mpy)₂ (Esquema II), los cuales presentan características de particular interés, entre las que sobresalen la alta solubilidad en agua y la intensa emisión de fluorescencia de excímero en medio alcalino, atribuida a la asociación de los pirenos en un arreglo tipo sándwich (Machi y col., 2009; Pérez-González y col., 2011); Esto indica que (edta1py)₂ y (edta1mpy)₂ pueden actuar como receptores de moléculas aromáticas (Palma, 2006).



Esquema II

En un trabajo previo realizado en el DIPM-UNISON (Mascareñas, 2004) se estudiaron las propiedades de reconocimiento molecular del ligante (edta1py)₂ hacia dopamina, tiramina, histamina y fenetilamina. El resultado más relevante fue que el ligante formó complejos moleculares en solución acuosa con las aminas y que la formación de estos complejos causó

apagamiento de la banda de excímero de pireno a 484 nm e incremento en la intensidad de las bandas de monómero.

Con base en lo anterior, en este trabajo de tesis se plantea llevar a cabo un estudio de complejación más amplio, que incluya tanto al ligante (edta1py) H_2 como a su análogo de cadena más larga, (edta1mpy) H_2 , el cual se realizará bajo condiciones de pH fisiológico (pH=7.2). Se pretende estudiar un grupo amplio de huéspedes que incluya a dopamina, L-Dopa, norepinefrina y epinefrina, así como a L-tirosina, tiramina, fenetilamina, L-fenilalanina y catecol (Esquema I). Se determinarán las constantes de asociación por fluorescencia y se establecerá la influencia de las variantes estructurales, tanto de los receptores como de los huéspedes, en la estabilidad de los complejos. El desarrollo de este estudio tiene como objetivo investigar el potencial de los ligantes (edta1py) H_2 y (edta1mpy) H_2 de actuar como sensores fluorescentes de estas moléculas y elucidar el tipo de interacciones que se establecen entre ellas.

ANTECEDENTES

Química Supramolecular

El término Química Supramolecular fue introducido por Jean Marie Lehn en 1978, de la que dijo: “más allá de la química molecular, basada en el enlace covalente, se encuentra el campo de la química supramolecular, el objetivo de la cual es llegar a controlar el enlace intermolecular” (Lehn, 1978).

En la actualidad, el concepto de química supramolecular se refiere a un área de la química que se encarga del estudio de entidades de gran complejidad, que resultan de la asociación de dos o más especies químicas por interacciones no covalentes. Estas incluyen típicas interacciones intermoleculares como enlaces de hidrógeno, interacciones π - π , efecto hidrofóbico, fuerzas de dispersión, interacciones electrostáticas, entre otras (Núñez, 2009).

En esta organización de especies químicas está implicado un principio fundamental, el reconocimiento molecular, que se puede definir como un proceso en el que la molécula receptora selecciona y se une a un sustrato para realizar una función específica. La especie reconocida es la que presenta mayor grado de complementariedad electrónica y estructural con el receptor (Ocampo, 2008). Para un efectivo reconocimiento, una de las moléculas (el receptor o anfitrión) debe poseer una cavidad que reúna la forma y el tamaño de la otra molécula (el sustrato o huésped) y también debe contener grupos de unión capaces de interactuar con regiones complementarias de dicha molécula.

Las interacciones intermoleculares son las responsables de numerosos procesos biológicos tales como reacciones enzimáticas, asociaciones antígeno-anticuerpo, señales de inducción por neurotransmisores, transcripción del código genético, etc. Con base en estos procesos es posible construir y diseñar moléculas capaces de imitar procesos biológicos e incluso generar nuevas formas de reconocimiento y activación (Atwood y col., 1996; Ocampo, 2008).

Quimiosensores Fluorescentes

Un quimiosensor es una molécula o unidad supramolecular que es capaz de unirse selectivamente al analito de interés y proporcionar información de esta unión. Esta unión debe ser detectable y de ser posible cuantificable. Para que esto suceda es necesario algún mecanismo de transducción de dicha unión (Coskun y Akkaya, 2004). Existe una variedad de quimiosensores que utilizan distintas formas de transducción de la señal, ya sea, electroquímicos, calorimétricos, colorimétricos, fluorescente, etc.

La Fluorescencia es una de las técnicas más utilizadas debido a que cuenta con características que la hacen altamente recomendable como alta sensibilidad (10^{-7} M), selectividad y alta velocidad de respuesta (10^{-8} a 10^{-10} segundos). Además el carácter no destructivo y no invasivo de detección de fluorescencia puede ser beneficioso principalmente para muchas aplicaciones biológicas y médicas (Ocampo, 2008; Valeur, 2002).

Un sensor fluorescente está formado por una unidad receptora la cual es la encargada de unirse al analito, una unidad activa o fluoróforo, que tiene como función emitir la señal, y un espaciador el cual tiene como finalidad modular la interacción entre la unidad receptora y la unidad activa. Además de la conformación antes mencionada, en los últimos años, se ha trabajado en la elaboración de sensores fluorescentes en los cuales se unan dos unidades activas o fluoróforos a través de una cadena de interconexión. A este tipo de compuestos se les denomina sensores biscromofóricos (Figura 1).

Los ligantes biscromofóricos tienen la ventaja de que al momento de interactuar con el analito pueden presentar cambios conformacionales que favorezcan la unión de las unidades activas o fluoróforas con la consecuente formación de excímeros, que son dímeros en estado excitado. La longitud de onda de emisión de excímero es mayor (menor energía) que la correspondiente a emisión de monómero y en muchos casos se presenta dentro del rango visible, lo cual amplía la posibilidad de aplicación de estos compuestos (Figura 2).

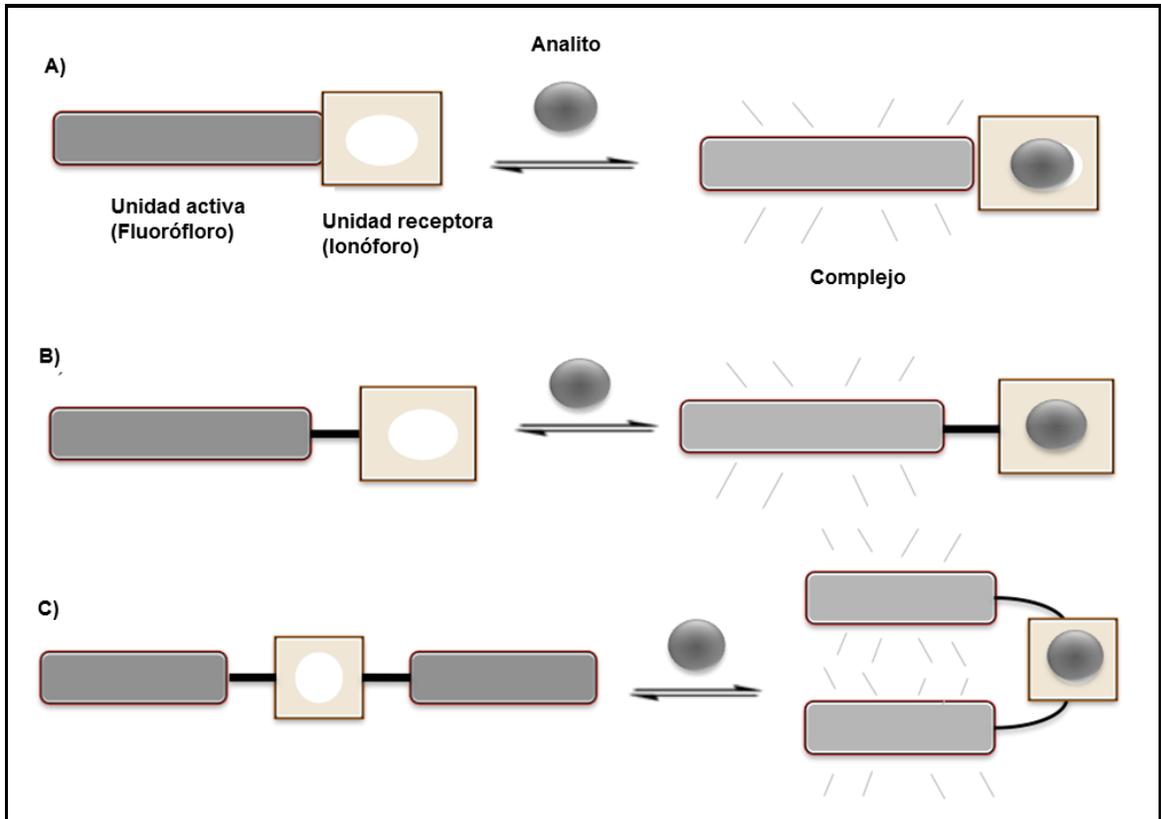


Figura 1. Componentes de un sensor fluorescente, A) esquema clásico, B) esquema con espaciador, C) esquema de un sensor biscromofórico.

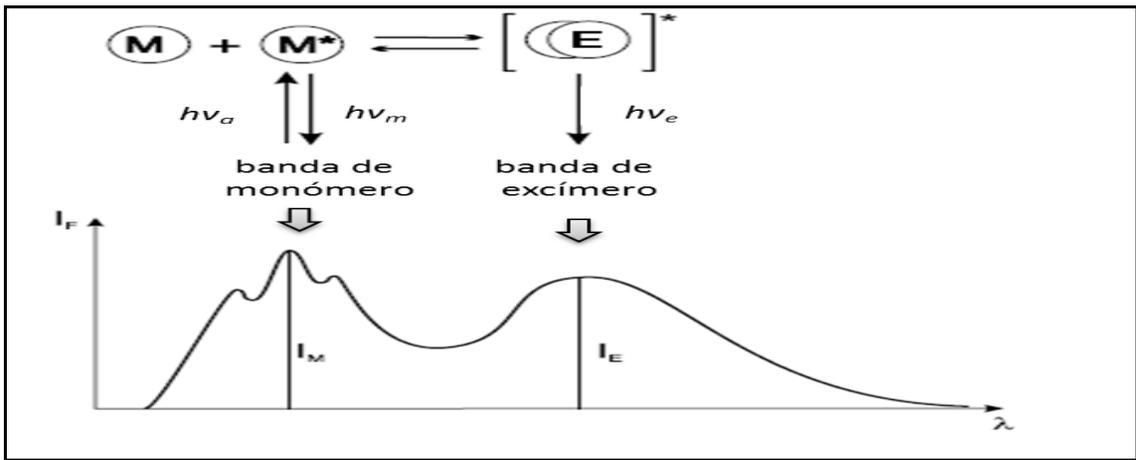


Figura 2. Formación de excímero, con las correspondientes bandas de monómero y excímero (Valeur, 2002).

Aminas Bioactivas

El presente trabajo de tesis tiene como principal interés el reconocimiento molecular de aminas de importancia a nivel biológico entre las cuales destaca la dopamina, la cual además de ser el neurotransmisor dopaminérgico más importante del sistema nervioso central, se ha encontrado que tiene relación con algunas enfermedades, como las que se citan a continuación.

En el caso del Parkinson se ha demostrado una disminución del contenido de dopamina en los pacientes que padecen esta enfermedad. Otra enfermedad que se encuentra relacionada es la esquizofrenia, ya que se ha encontrado que este padecimiento produce una hiperactividad de la transmisión dopaminérgica. Lo contrario ocurre en la epilepsia, en la cual existe una hipoactividad de la transmisión dopaminérgica. Además de las enfermedades mencionadas se conoce que existe una relación entre la dopamina y el abuso de alcohol y otras drogas (Bahena y col., 2000; Barrett y col., 2008).

El principal tratamiento farmacológico de la enfermedad de Parkinson se basa en el uso de un precursor de la dopamina, la L-Dopa, ya que esta sustancia atraviesa la barrera hematoencefálica y es capturada por las neuronas dopaminérgicas que la convierten a dopamina. Debido a la presencia en el plasma de enzimas que convierten a la L-Dopa a dopamina, el precursor se administra a la par de un inhibidor de las descarboxilasas periféricas, ya que la dopamina no puede atravesar la barrera hematoencefálica (Bahena y col., 2000). El tratamiento prolongado con L-Dopa conduce a una pérdida de la eficacia del mismo, así como a la aparición de efectos adversos severos, como movimientos involuntarios después de un periodo de 3 a 10 años (Campbell y Reece, 2007).

Además de la dopamina, existen otros importantes neurotransmisores como son epinefrina y norepinefrina. La epinefrina es liberada en situaciones de estrés o de ejercicio intenso para aumentar los niveles de energía disponible en sangre al estimular la degradación del polisacárido de almacenamiento glucógeno dentro de las células del hígado y del músculo esquelético y a partir del glucógeno producir glucosa. Por su parte la norepinefrina regula el estado de alerta, estado de ánimo, así como la temperatura corporal. Las cuatro aminas mencionadas anteriormente son sintetizadas a partir del aminoácido L-tirosina.

Es por lo mencionado anteriormente que es importante estudiar las interacciones que se dan entre diferentes aminas con actividad biológica y receptores sintéticos, así como conocer las diferencias en selectividad y los mecanismos de reconocimiento. Este tipo de estudios abren la posibilidad de desarrollar sensores capaces de detectar de forma selectiva alguna de estas moléculas y cuantificar su concentración.

Sensores Fluorescentes para Aminas Bioactivas

En la literatura existen distintos tipos de sensores capaces de detectar las aminas con importancia biológica, entre ellos se incluyen agentes transportadores de dopamina, receptores que funcionan en disolventes orgánicos y receptores asociados a membranas que reconocen a dopamina en medio acuoso. Además de los compuestos anteriores, se han reportado ciclofanos útiles para el reconocimiento selectivo de dopamina (Secor y Glass, 2004).

Sensores Fluorescentes Derivados del Ácido Fenilborónico

Coskun y Akkaya reportaron un sensor fluorescente basado en ácido fenilborónico derivado del colorante amarillo de lucifer (L1, Figura 3), en el cual observó que al aumentar la concentración de L-Dopa disminuye la intensidad de emisión debido al evento de reconocimiento selectivo. El sensor reconoce a L-Dopa a través de una combinación de procesos: formación de éster borónico, interacciones carga-carga e interacciones π - π entre los anillos aromáticos tanto de L-Dopa como del sensor (Coskun y Akkaya, 2004).

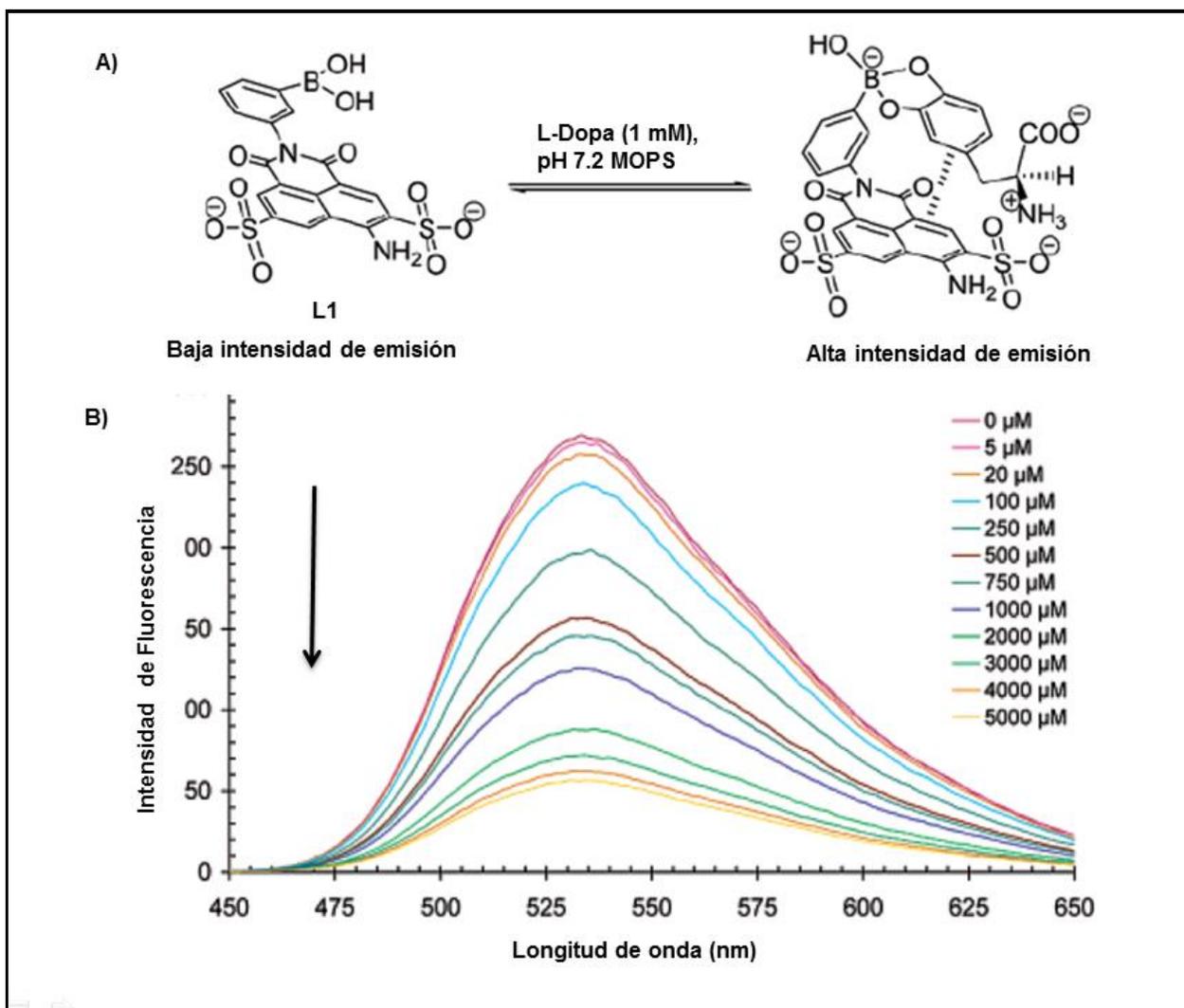


Figura 3. A) Puntos de reconocimiento entre el sensor L1 basado en el ácido fenilborónico y L-Dopa; B) Espectros de emisión de L1 (5 μM) en respuesta al aumento de la concentración de L-Dopa en solución de buffer (0.1 M MOPS) a pH 7.2. Longitud de onda de excitación $\lambda_{\text{exc}}=430$ nm (Coskun y Akkaya, 2004).

Sensores Fluorescentes Derivados de Pireno

El diseño y síntesis de sensores fluorescentes basados en pireno han atraído considerable atención en los últimos años, debido al alto rendimiento cuántico de emisión de fluorescencia de esta molécula, el largo tiempo de vida de su estado excitado y su capacidad de formar excímeros. En particular, la introducción de dos unidades pireno en los extremos de cadenas de interconexión que contengan átomos donadores de electrones ha generado una variedad de sistemas de detección capaces de producir cambios en la emisión de monómero y/o excímero

al coordinarse con huéspedes específicos. Sin embargo, la mayoría de estos sistemas actúan sólo en medios orgánicos, lo cual complica su aplicación en sistemas biológicos (Machi y col., 2009; Pérez-González y col., 2011).

Jun y col. reportaron un nuevo receptor fluorescente compuesto de dos grupos imidazol, dos grupos pireno y un ácido borónico (L2, Figura 4), el cual fue sintetizado para el estudio de reconocimiento del ácido 3,4- dihidroxifenilacético (DOPAC) metabolito de la dopamina. Tanto DOPAC, como dopamina, L-Dopa y catecol indujeron efectos de extinción de fluorescencia, sin embargo, el sensor mostró una mayor constante de asociación con DOPAC. Por el contrario, al estudiar la formación de complejos con D-fructosa, D-glucosa y L-fenilalanina, el receptor L2 no mostró cambios significativos de la fluorescencia. Al formarse el complejo se da una interacción π - π tipo cara-cara entre los dos anillos pireno del ligante y el anillo bencénico de la DOPAC y catecol, debido a la cercanía de dichos grupos lo que conlleva a la formación del dímero en estado excitado (excímero) (Jun y col., 2012).

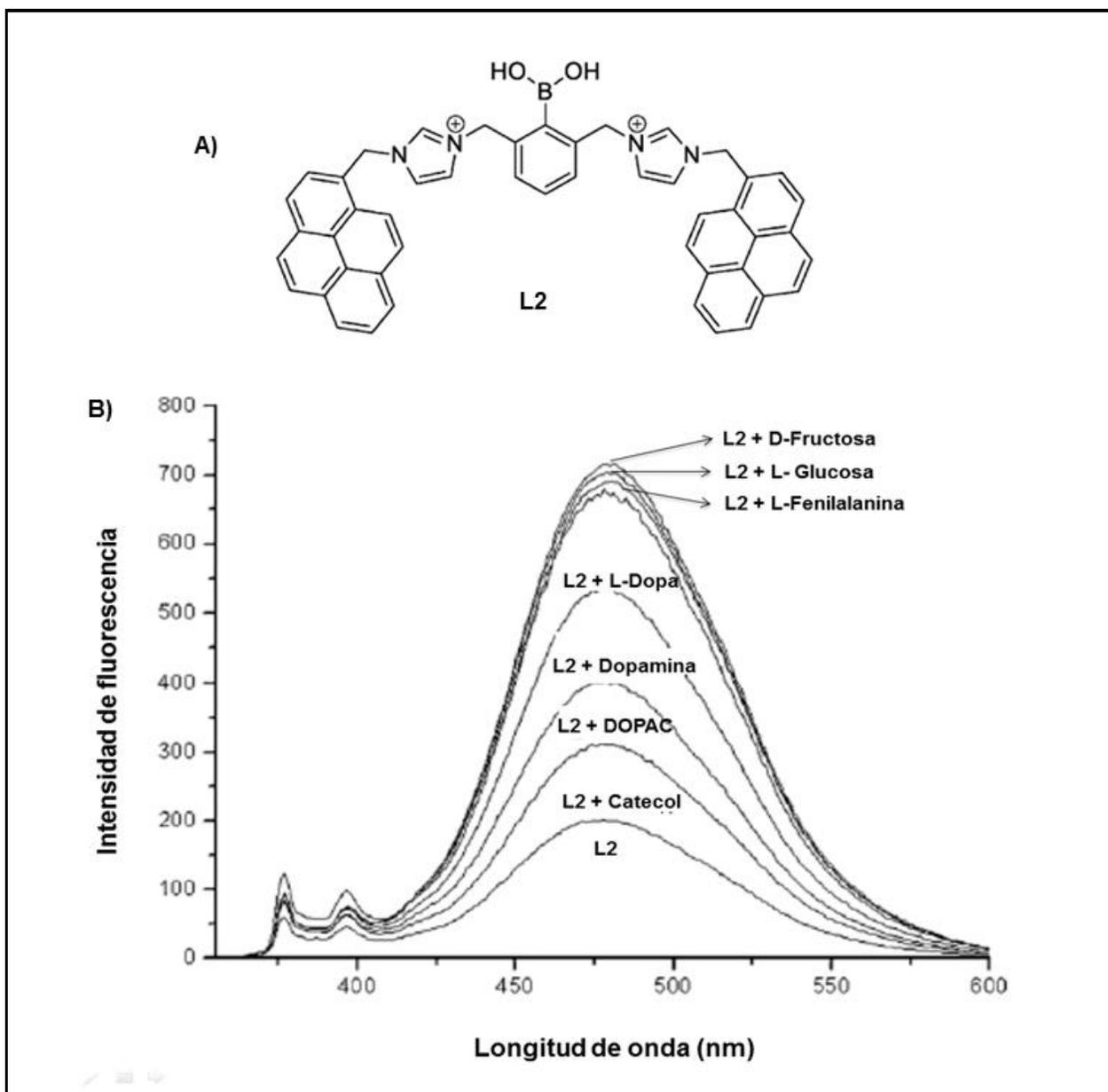


Figura 4. A) Sensor fluorescente formado por dos grupos imidazol, dos grupos pireno y un ácido borónico L2; B) Espectros de emisión del receptor L2 en ausencia y en presencia de 100 equiv. de cada una de las siguientes sustancias: catecol, DOPAC, dopamina, L-Dopa, D-fructosa, D-glucosa y L-fenilalanina en buffer HEPES (0.02 M, pH 7,4). Longitud de onda de excitación: 354 nm (Jun y col., 2012).

Por otra parte, el grupo de Química Supramolecular del DIPM-UNISON, ha desarrollado en los últimos años sensores moleculares los cuales están formados por cadenas de ácidos poliaminopolicarboxílicos edta, dtpa o ttha, funcionalizadas con grupos pireno terminales (Machi

y col., 2009; Pérez-González y col., 2011). Entre los ligantes desarrollados se encuentran los derivados de edta: (edta1py) H_2 y (edta1mpy) H_2 (**1** y **2**, Esquema II), los cuales son solubles en agua y presentan una intensa emisión de fluorescencia dependiente del pH (Figura 5 y 6). A $pH \geq 10$, las moléculas se encuentran en su estado totalmente desprotonado L^{2-} (donde L representa a (edta1py) H_2 o (edta1mpy) H_2) y presentan la emisión de excímero más alta. Al disminuir el pH la intensidad de emisión de excímero disminuye y las curvas de intensidad en función del pH (I vs. pH) muestran un cambio sigmoidal a $pH \approx 8$, lo cual indica que ocurre la protonación de las aminas de las cadenas edta para formar las especies monoprotonadas LH^- . Los valores de $\log K_{p1}$ determinados fueron 8.19 y 7.43 para (edta1py) H_2 y (edta1mpy) H_2 , respectivamente (Machi y col., 2009; Pérez-González y col., 2011). Esta primera protonación produce cambios conformacionales en las moléculas que provocan que los pirenos se separen y se pierda la asociación intramolecular tipo apilamiento cara-a-cara que existe en las especies L^{2-} (Pérez-González y col., 2011).

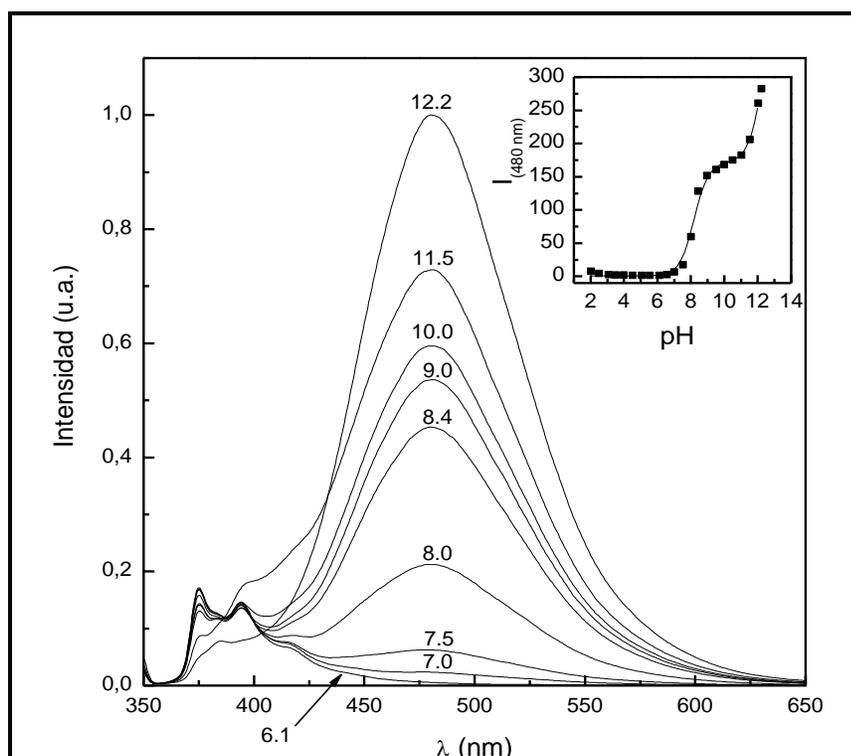


Figura 5. Espectros de emisión de (edta1py) H_2 en solución acuosa a valores de pH seleccionados. Las intensidades espectrales se normalizan con el pico máximo del espectro más intenso. La longitud de onda de excitación, $\lambda_{exc} = 342$ nm, y la concentración del ligante 2×10^{-6} M. Recuadro: intensidad de emisión (a.u) a 490 nm como una función del pH (Machi y col., 2009).

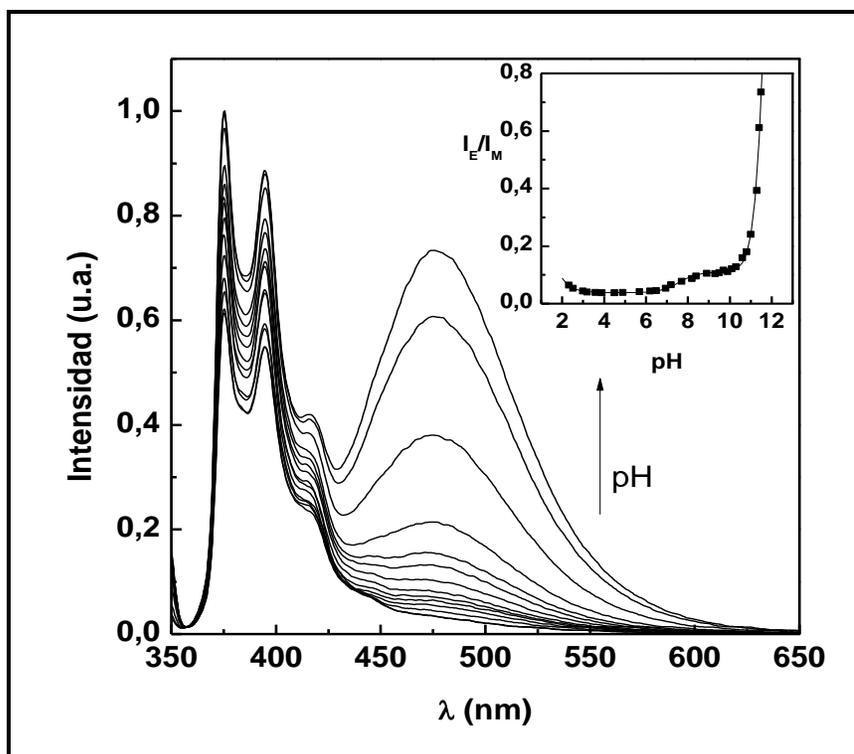


Figura 6. Espectros de emisión de (edta1mpy)H₂ en solución acuosa a valores de pH seleccionados. Las intensidades espectrales se normalizan con el pico máximo del espectro más intenso. La longitud de onda de excitación, $\lambda_{exc} = 342$ nm, y la concentración del ligante 1×10^{-6} M. Recuadro: relación de intensidad excímero-monómero (I_E / I_M) como una función del pH (Pérez-González y col., 2011).

En un trabajo previo se llevó a cabo un estudio de reconocimiento molecular del ligante (edta1py)H₂ hacia las moléculas dopamina, tiramina, histamina y fenetilamina. Dicho estudio se realizó bajo dos diferentes condiciones de pH, pH=10 y pH= 8.5, en las cuales tanto el receptor como las aminas se encuentran en distintos estados de protonación. El resultado más relevante del trabajo fue que el ligante (edta1py)H₂ formó complejos moleculares en solución acuosa con las aminas. La formación de estos complejos causó apagamiento de la banda de excímero de pireno a 484 nm e incremento en la intensidad de las bandas de monómero (Figura 7). Se considera que este efecto ocurre por la intercalación del grupo aromático de los sustratos entre las unidades pireno del receptor. Aun cuando esto es de relevancia, las condiciones de pH utilizadas difieren de las que prevalecen en medios biológicos. (Mascareñas, 2004)

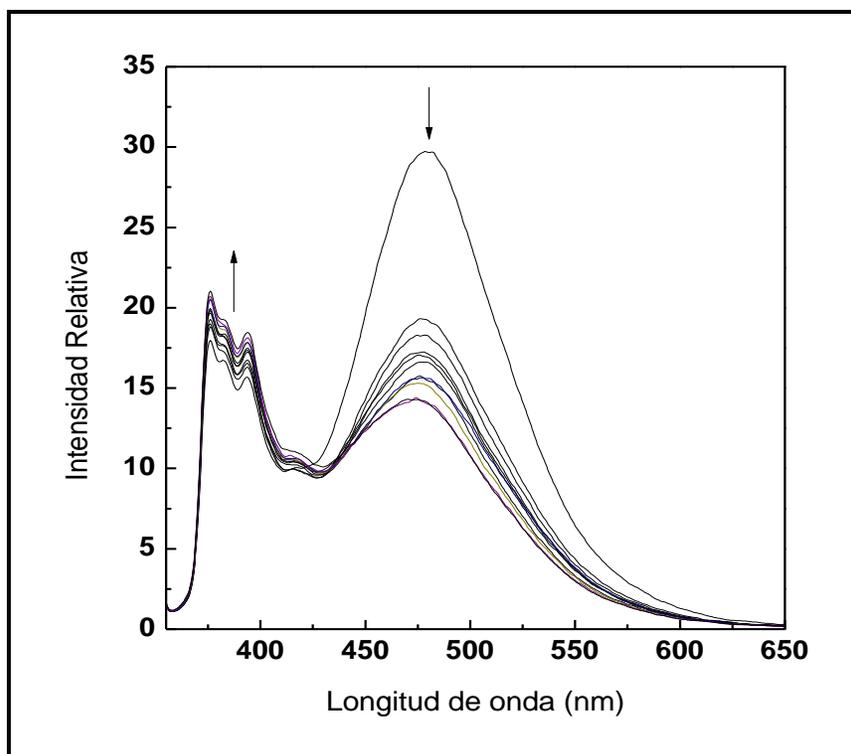


Figura 7. Espectros obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de $(\text{edta1py})\text{H}_2$ con dopamina a $\text{pH}= 7.0$ (KH_2PO_4 , 0.1 M), $\lambda_{\text{exc}}=342 \text{ nm}$, $T=25^\circ\text{C}$. $[(\text{edta1py})\text{H}_2]=0.001 \text{ mM}$, $[\text{dopamina}]$ = de arriba abajo $0,0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.006, 0.007, 0.008, 0.009,0.01 \text{ mM}$ (Mascareñas, 2004).

Con base en lo anterior, en este trabajo de tesis se plantea llevar a cabo un estudio de complejación más amplio, que incluya tanto al ligante $(\text{edta1py})\text{H}_2$ como a su análogo de cadena más larga 2, el cual se realizará bajo condiciones de pH fisiológico ($\text{pH}=7.2$). Se pretende estudiar un grupo amplio de huéspedes que incluya a dopamina, L-Dopa, norepinefrina y epinefrina, así como a L-tirosina, tiramina, fenetilamina, L-fenilalanina y catecol (Esquema I). Se determinarán las constantes de asociación por fluorescencia y se establecerá la influencia de las variantes estructurales, tanto de los receptores como de los huéspedes, en la estabilidad de los complejos. El desarrollo de este estudio tiene como objetivo investigar el potencial de los ligantes $(\text{edta1py})\text{H}_2$ y $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ de actuar como sensores fluorescentes de estas moléculas y elucidar el tipo de interacciones que se establecen entre ellas.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, al pH seleccionado para este estudio ($\text{pH}=7.2$), los ligantes $(\text{edta1py})\text{H}_2$ y $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ se encontrarán predominantemente en su forma

monoaniónica LH^- , con los dos grupos carboximetilo ionizados y la cadena de interconexión con una carga positiva. Se asume que esta especie tiene una conformación más abierta o desplegada, en relación a la que presenta la especie L^{2-} . Bajo estas condiciones, los receptores pueden establecer con los huéspedes seleccionados diferentes tipos de interacciones intermoleculares: carga-carga, enlaces de hidrógeno, π - π aromáticas, hidrofóbicas, entre otras, de acuerdo a la estructura molecular y al estado de protonación en la que éstos se encuentren.

Entre las moléculas huésped que se estudiarán están dopamina, epinefrina, norepinefrina, tiramina y fenetilamina, las cuales a $pH=7.2$ estarán en forma catiónica (Esquema I). En cambio, los aminoácidos L-Dopa, L-tirosina y L-fenilalanina estarán en forma zwitteriónica y catecol en forma neutra (Esquema I). Se espera que las diferencias tanto en carga como en estructura molecular, tenga efecto en la formación de los complejos y en su estabilidad.

Por otro lado, se considera que la diferencia estructural entre los receptores $(edta1py)H_2$ y $(edta1mpy)H_2$ afectará su capacidad de asociación a las moléculas. En el caso de $(edta1mpy)H_2$, la mayor flexibilidad que le confieren los puentes metileno que conectan a los grupos amida con los pirenos puede favorecer los cambios de conformación que ocurren en la complejación molecular.

METODOLOGÍA

Materiales

Los reactivos que se emplearon para realizar los estudios de complejación molecular del ligante (edta1py)₂ y su análogo (edta1mpy)₂ se enlistan a continuación.

- Clorhidrato de tiramina 98 % (HOC₆H₄CH₂CH₂NH₂ · HCl) marca Sigma.
- Feniletilamina 99% (C₆H₅CH₂CH₂NH₂) marca Sigma.
- Clorhidrato de dopamina 98% ((HO)₂C₆H₃CH₂CH₂NH₂·HCl) marca Sigma.
- (±)-Norepinefrina (+)- sal de bitartrato (C₈H₁₁NO₃ · C₄H₆O₆) marca Sigma.
- (±)- Epinefrina (+)- sal de bitartrato (C₉H₁₃NO₃ · C₄H₆O₆) marca Sigma.
- L- fenilalanina 98% (C₆H₅CH₂CH(NH₂)CO₂H) marca Sigma.
- L-Dopa 98% ((HO)₂C₆H₃CH₂CH(NH₂)CO₂H) marca Sigma
- Catecol 99% (C₆H₄-1,2-(OH)₂) marca Sigma.
- L- tirosina 98% (4-(HO)C₆H₄CH₂CH(NH₂)CO₂H) marca Sigma.
- Tiosulfato de sodio 99% (Na₂S₂O₃) marca Sigma.
- Buffer MOPS 99.5% marca Sigma.
- Hidróxido de Sodio 98.6% (NaOH) marca Merck.
- Bicarbonato de sodio 98% (NaHCO₃) marca Aldrich.
- (edta1py)₂ (sintetizado en los laboratorios del DIPM).
- (edta1mpy)₂ (sintetizado en los laboratorios del DIPM).

Técnicas y Equipo de Laboratorio Utilizados

Espectroscopia de Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

Los espectros de absorción electrónica se obtuvieron en un espectrofotómetro UV-Vis de arreglo de diodos marca Agilent Technologies modelo 8453.

Espectroscopia de Fluorescencia

Los espectros de emisión y de excitación se obtuvieron en un espectrofotómetro de Luminiscencia marca Perkin-Elmer, modelo LS50.

Programas Computacionales

Para el análisis de datos de espectrometría y elaboración de graficas se utilizó el programa Origin Lab 8.6.

Para la obtención de las constantes de asociación a partir de los datos de las titulaciones se utilizaron los programas K(AB)Ct, K(AB)CtI y K(ABn2)CtI, desarrollados en Excel por el Dr. Motomichi Inoue (Inoue, 2009). (Ver Anexo 1)

Preparación de las Soluciones para las Mediciones

Soluciones madre de los ligantes: Para la preparación de 10 mL de solución madre de cada uno de los ligantes se pesaron alrededor de 1 mg del compuesto (edta1py: 0.977 mg; edta1mpy: 1.30 mg) y se disolvió en NaCl 0.01 M, para solubilizar el compuesto se agregó una pequeña cantidad de Na₂CO₃, y se dejó en agitación por aproximadamente 24 horas, para después aforar. Para obtener una solución de edta1py con concentración de 1.09×10^{-4} M y edta1mpy de 2.4×10^{-6} M.

Soluciones de trabajo de los ligantes: Se utilizó una solución 5×10^{-7} M de cada uno de los ligantes las cuales fueron preparadas en buffer MOPS 0.01 M a un pH=7.2.

Soluciones madre de los huéspedes: Se prepararon 10 mL de cada solución a una concentración de 30 mM con las siguientes cantidades de las diferentes sustancias: catecol (33.0 mg), dopamina (56.9 mg), tiramina (52.1 mg), fenetilamina (36.4 mg), L-Dopa (59.2 mg) y L- fenilalanina (49.6 mg). Debido a que estas aminas presentan grupos altamente sensibles a la oxidación se diluyó cada una de las cantidades pesadas de estas sustancias en aproximadamente 5 mL de una solución de Na₂S₂O₃ 0.01 M, después se ajustó el pH a 7.2 utilizando NaHCO₃ con agitación constante y se aforó a 10 mL con buffer MOPS 0.01 M (pH=7.2). En el caso de tirosina su solubilidad en agua es de 0.479 g/l por lo cual no fue posible realizar la solución madre.

Soluciones de trabajo de los huéspedes: Para la obtención de los espectros de absorción y emisión de los huéspedes, a partir de las soluciones madre se prepararon diluciones en el intervalo de concentraciones de 1×10^{-5} M a 5×10^{-3} M, con buffer MOPS 0.01 M (pH=7.2). Para los estudios de complejación molecular, en todos los casos se utilizó una concentración de 3×10^{-3} M.

Obtención de los Espectros de Absorción y Emisión de los Huéspedes

Para establecer si los huéspedes propuestos absorbían a la longitud de onda de excitación que se utilizará en este estudio ($\lambda_{exc}=342$ nm) se obtuvieron los espectros UV-Vis de las moléculas a pH=7.2 (buffer MOPS). De igual manera, una vez obtenidos los espectros de absorción, se verificó que las moléculas no emitieran en el intervalo de longitudes de onda correspondiente a los espectros de fluorescencia de los receptores (350-650 nm) al ser excitadas a 342 nm.

Estudios de Complejación Molecular

Para conocer el efecto de la formación de complejos moleculares en la fluorescencia de los receptores, se llevaron a cabo titulaciones espectrofotométricas a temperatura y pH constantes (25 °C, pH=7.2, buffer MOPS). Se colocaron en la celda del espectrofotómetro 3 mL de solución del ligante (5×10^{-7} M para ambos ligantes) y se agregaron alícuotas de 20 μ L de solución de huésped para variar la razón molar [H]/[L] en el intervalo de 0 -1000. A partir de este estudio se obtuvieron las constantes de asociación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Espectros de Absorción y Emisión de los Huéspedes

Para el estudio de las propiedades de complejación de los ligantes (edta1py) H_2 y (edta1mpy) H_2 hacia los diferentes huéspedes se realizaron titulaciones espectrofluorimétricas y se determinaron las constantes de asociación de los complejos formados. Previo a dicho estudio, se verificó que los huéspedes seleccionados no absorben a la longitud de onda de excitación de los ligantes ($\lambda_{exc}=342$ nm) ni emiten significativamente a las longitudes de onda de interés: $\lambda_{em}=375$ y 480 nm (ver Figuras A1-A4 en la sección de Anexos). Se encontró que ninguno de los huéspedes absorbe a 342 nm. Por otro lado, los espectros de fluorescencia de todas las moléculas presentan la banda Raman característica del agua a 380 nm (Larkin, 2011) y solo una cola de emisión en la región de los 480 nm. Se considera que esta emisión no causará interferencia con los estudios de complejación ya que su intensidad representa en general del 5-10% de la intensidad de fluorescencia de los receptores a esas longitudes de onda.

Estudios de Complejación Molecular

El principal objetivo de este trabajo tesis es conocer las propiedades de reconocimiento molecular de los ligantes fluorescentes (edta1py) H_2 y (edta1mpy) H_2 hacia dopamina y sustancias estructuralmente relacionadas. Las diferencias estructurales, tanto de los receptores como de los huéspedes, así como la variación en la carga eléctrica de estos últimos bajo las condiciones del estudio (pH=7.2), permitirá establecer el tipo de fuerzas de atracción que se establecen en los complejos. Para conocer la influencia de cada uno de estos factores en la estabilidad del complejo, se incluyó en este estudio al resto de los huéspedes que se muestran en el Esquema I. Con base en sus diferencias estructurales con dopamina, los huéspedes se agruparon en tres diferentes grupos: Grupo-1 (diferente cadena lateral); Grupo-2 (diferente grupo aromático) y Grupo-3 (diferentes cadena lateral y grupo aromático) (Figura 8).

Dentro del Grupo-1 de huéspedes están L-Dopa, epinefrina, norepinefrina y catecol, siendo este último un compuesto de referencia útil por la ausencia de cadena lateral. L-Dopa solo difiere de dopamina en el tipo de cadena lateral, ya que es un aminoácido que al pH del estudio se encuentra en estado zwitteriónico (el grupo ácido desprotonado, $-COO^-$, y el grupo amino protonado, $-NH_3^+$). La epinefrina y norepinefrina difieren de dopamina en que contienen

un grupo hidroxilo adicional en las cadenas laterales, además de que en la primera de ellas la amina terminal es secundaria (metilamina). Las variaciones en la estructura y carga de los grupos laterales de estos tres huéspedes permitiría establecer la influencia de las interacciones catión-anión en la estabilidad del complejo $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ -dopamina. Sin embargo, en el caso de norepinefrina y epinefrina, a pesar de utilizar $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ como agente reductor, las soluciones se oxidaban en un lapso menor de 1 hora, lo cual no permitió llevar a término las titulaciones. Por este motivo, fueron excluidas del presente estudio.

La tiramina y fenetilamina constituyen el Grupo-2 de huéspedes, ya que comparten con dopamina el mismo tipo de cadena lateral 2-aminoetil, pero difieren en las características del grupo aromático. La tiramina contiene un solo grupo hidroxilo en la posición para del anillo bencénico y fenetilamina no contiene ninguno. Estas diferencias permitirán conocer la influencia de los hidroxilos en la estabilización del complejo $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ -dopamina.

Los aminoácidos L-tirosina y L-fenilalanina constituyen el Grupo-3 de huéspedes y fueron incluidos con el mismo propósito que L-Dopa, conocer la influencia de una cadena lateral zwitteriónica en relación a una catiónica en la estabilización de los complejos. En este caso se pretendía comparar las constantes de asociación de los complejos $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ -tiramina vs. $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ -L-tirosina y $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ -fenetilamina vs. $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ -fenilalanina. Sin embargo, debido a la baja solubilidad de L-tirosina, no fue posible incluirla en este estudio.

Dado que la dopamina es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del sistema nervioso central y se sabe que está involucrado en distintas enfermedades como el Parkinson, la presentación de los resultados de este trabajo se hará tomando como punto de partida la formación del complejo $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ -Dopamina.

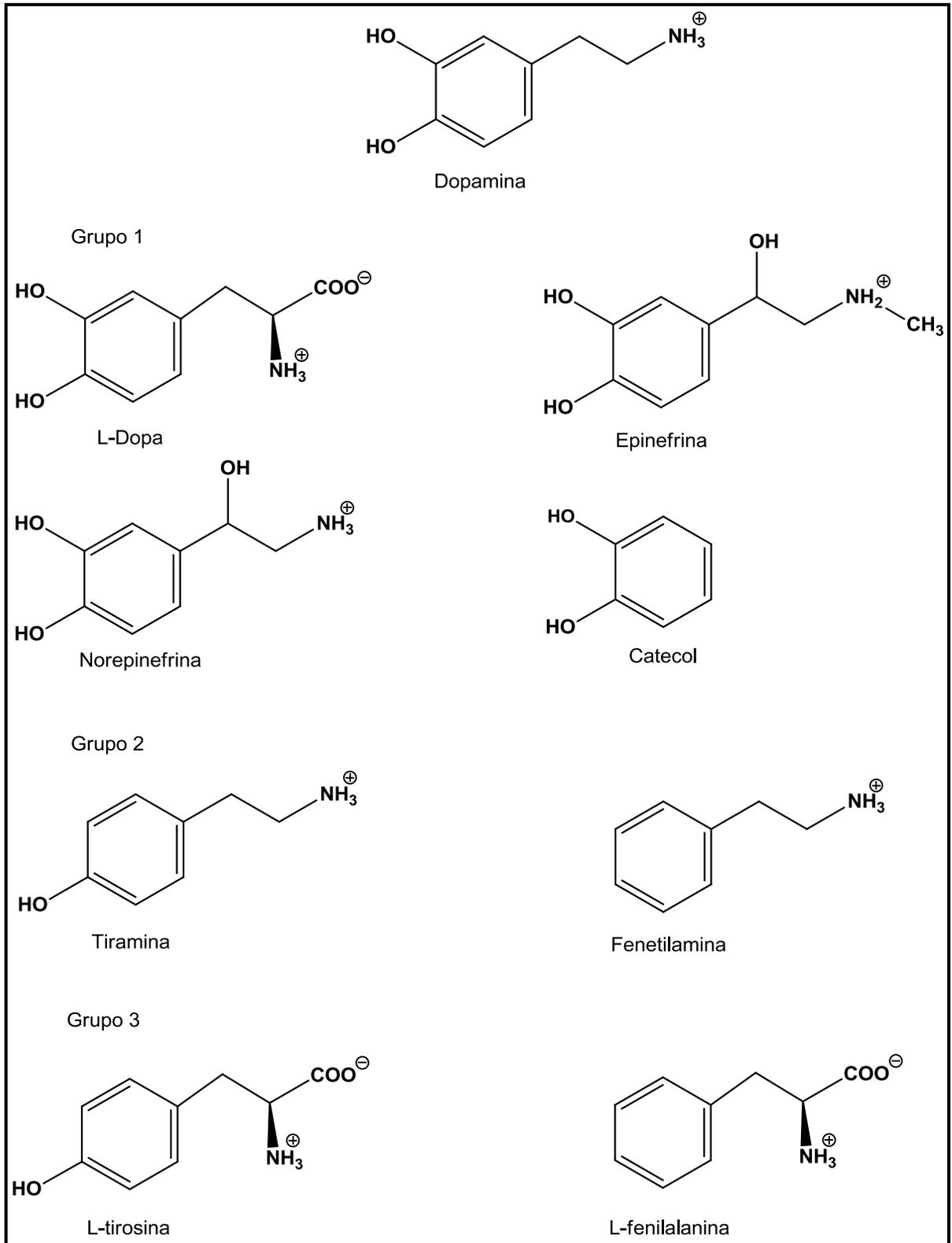


Figura 8. Representación de las que conforman cada grupo de huéspedes.

Estudios de Complejación con (edta1mpy) H_2

Como se comentó anteriormente, el presente trabajo se basó en la comparación de la formación de los complejos con dopamina, por lo que el inicio de este estudio fue la titulación de este compuesto con el ligante (edta1mpy) H_2 . En la Figura 9 se muestran espectros de emisión seleccionados, obtenidos durante la titulación del ligante (edta1mpy) H_2 con dopamina. La adición inicial de dopamina produce una disminución de intensidad en todo el intervalo de longitudes de onda. Sin embargo, las adiciones subsecuentes provocan un incremento de intensidad tanto en la banda de excímero como de monómero.

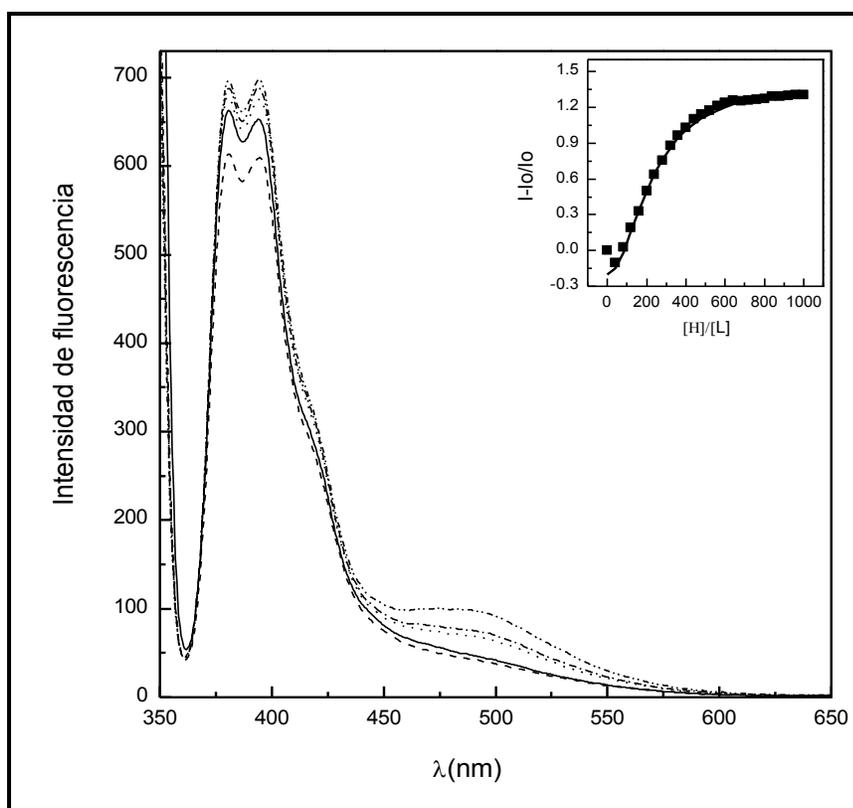


Figura 9. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (edta1mpy) H_2 con dopamina en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS), λ_{exc} =342 nm, T=25°C, [L]= 5×10^{-7} M. La concentración de dopamina fue: 0 M (—), 2×10^{-5} M (---), 1×10^{-4} M (.....), 1.2×10^{-4} M (-·-·-), 2.4×10^{-4} M (-·-·-). Recuadro: Variación en la intensidad de emisión a $\lambda=494$ nm (normalizada) en función de la razón molar huésped/ligante $[H]/[L]$. I_0 representa la intensidad de emisión a $[H]=0$.

La gráfica de intensidad a $\lambda=494$ nm en función de la razón molar huésped/ligante (recuadro en la Figura 9) muestra un comportamiento típico para la formación de un complejo.

El ajuste de los datos experimentales se realizó con el programa K(ABn2)Ctl desarrollado en Excel por M. Inoue (Inoue, 2013), el cual considera la formación de un complejo con estequiometría 1:2 huésped:ligante, además de que proporciona un valor calculado de intensidad inicial (I_0) que corrige el efecto de la primera adición (ver sección de Metodología). El valor calculado de la constante de formación fue: $\log K_f = 7.91$ (Tabla 1).

Tabla 1. Constantes de formación ($\log K_f$) de los complejos de (edta1mpy) H_2 con los diferentes huéspedes

Huésped	Log K_f
Dopamina	7.91 ^a
L-Dopa	3.46
Tiramina	3.92
Fenetilamina	4.12
Catecol	----- ^b
L-fenilalanina	----- ^b

^a Complejo 1:2 receptor:huésped

^b No calculadas

Si se toma en cuenta tanto la presencia del grupo catecol como la del brazo lateral con carga positiva de dopamina, se puede asumir que las interacciones huésped-receptor que se establecen son de tipo carga-carga (entre los grupos carboximetil desprotonados del ligante y el grupo amina protonado del huésped), π - π aromáticas (entre el anillo aromático catecol y los grupo pireno del ligante) y/o puentes de hidrógeno (entre los grupos hidroxilo de catecol y grupos donadores o aceptores de puente de hidrógeno del receptor).

En la siguiente sección se discuten los resultados del estudio de complejación de (edta1mpy) H_2 con L-Dopa y catecol y en secciones subsecuentes los del estudio con el resto de los huéspedes.

A partir de la clasificación antes mencionada el Grupo-1 quedo conformado por L-Dopa y catecol, en la Figura 10 se muestran espectros de emisión seleccionados, obtenidos durante la titulación del ligante (edta1mpy)₂H₂ con L-Dopa. Los resultados son similares a los obtenidos con dopamina, ya que la adición inicial de L-Dopa produce una disminución de intensidad a la longitud de onda de emisión de excímero, seguida de un incremento de la misma al aumentar la concentración del huésped. La gráfica de intensidad a $\lambda=494$ nm en función de la razón molar huésped/ligante (recuadro en Figura 10) muestra un comportamiento típico para la formación de un complejo. El ajuste de los datos experimentales se realizó con el programa K(AB)Ctl desarrollado en Excel por M. Inoue (Inoue, 2013), el cual considera la formación de un complejo con estequiometría 1:1 huésped:ligante, además de que proporciona un valor calculado de I_o que corrige el efecto de la primera adición. El valor determinado para la constante de formación ($\log K_f$) del complejo (edta1mpy)₂H₂-L-Dopa fue 3.46 (Figura 10), el cual es significativamente menor que el calculado para el complejo (edta1mpy)₂H₂-dopamina ($\log K_f = 7.91$). Esto sugiere que el estado de carga zwitteriónico de la cadena lateral de L-Dopa no contribuye de manera importante a la estabilización del complejo vía interacciones carga-carga con los grupos aniónicos del receptor. Las fuerzas intermoleculares que determinan la estabilidad del complejo (edta1mpy)₂H₂-L-Dopa son las π - π aromáticas y/o los puentes de hidrógeno entre el grupo catecol y sitios específicos en el receptor.

Un aspecto común de los dos sistemas discutidos hasta ahora, es que la formación de ambos complejos, (edta1mpy)₂H₂-dopamina y (edta1mpy)₂H₂-L-Dopa, incrementa la intensidad de emisión en todo el intervalo de longitudes de onda estudiado. Esto indica que los complejos son más emisivos que el receptor y que su formación cancela procesos de amortización de fluorescencia presentes en el ligante libre y favorece la formación de excímeros de pireno. Este último efecto es más significativo en el caso del complejo con dopamina, ya que la razón de intensidades excímero/monómero (I_E/I_M) incrementa ~ 2.3 veces, mientras que L-Dopa solo causa un aumento de I_E/I_M de ~ 1.5 .

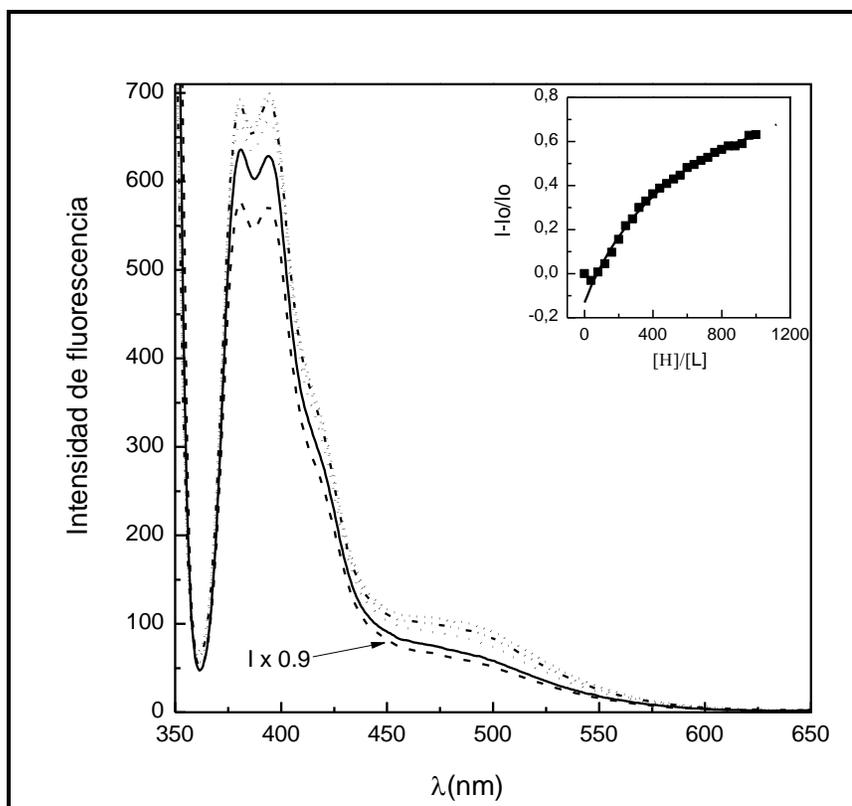


Figura 10. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ con L-Dopa en solución acuosa a $\text{pH}=7.2$ (buffer MOPS), $\lambda_{\text{exc}}=342$ nm, $T=25^\circ\text{C}$, $[\text{L}]=5\times 10^{-7}$ M. La concentración de L-Dopa fue: 0 M (—), 2×10^{-5} M (--) (la flecha indica la intensidad multiplicada por 0.9), 1×10^{-4} M (.....), 2.4×10^{-4} M (-.-), 4.4×10^{-4} M (---). Recuadro: Variación en la intensidad de emisión a $\lambda_{\text{exc}}=494$ nm (normalizada) en función de la razón molar huésped/ligante $[\text{H}]/[\text{L}]$. I_0 representa la intensidad de emisión a $[\text{H}]=0$.

Al realizar la titulación del ligante $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ con catecol solo se observó disminución en la intensidad de fluorescencia en la banda de monómero, sin cambios significativos en la banda excímero (Figura 11). La curva de intensidad de fluorescencia (I_F) a 394 nm en función de la razón molar $[\text{H}]/[\text{L}]$ (recuadro en Figura 11) no pudo ajustarse satisfactoriamente a ningún modelo teórico de formación de complejos moleculares, por lo que se asumió que el cambio observado es debido únicamente a un efecto de amortización de fluorescencia provocado por el catecol. Esta molécula es rica en electrones y puede inducir transferencia electrónica fotoinducida (PET) y apagar la fluorescencia.

Los resultados del estudio con catecol muestran la importancia de la cadena lateral con carga positiva presente en dopamina en la formación del complejo $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ -dopamina. La

interacción carga-carga o puente salino que se establece entre el grupo carboximetil desprotonado del receptor, $-\text{CH}_2\text{COO}^-$, y el grupo etilamino protonado del huésped, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ es la fuerza directriz en la formación del complejo, el cual se estabiliza por interacciones adicionales (π - π aromáticas y/o los puentes de hidrógeno).

Una vez establecida la importancia de la cadena lateral de dopamina en la formación del complejo $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ -dopamina, se planteó estudiar la influencia de los hidroxilos del anillo catecol en la estabilidad. Para ello se realizaron titulaciones con los huéspedes del Grupo-2 y los resultados se discuten en la siguiente sección.

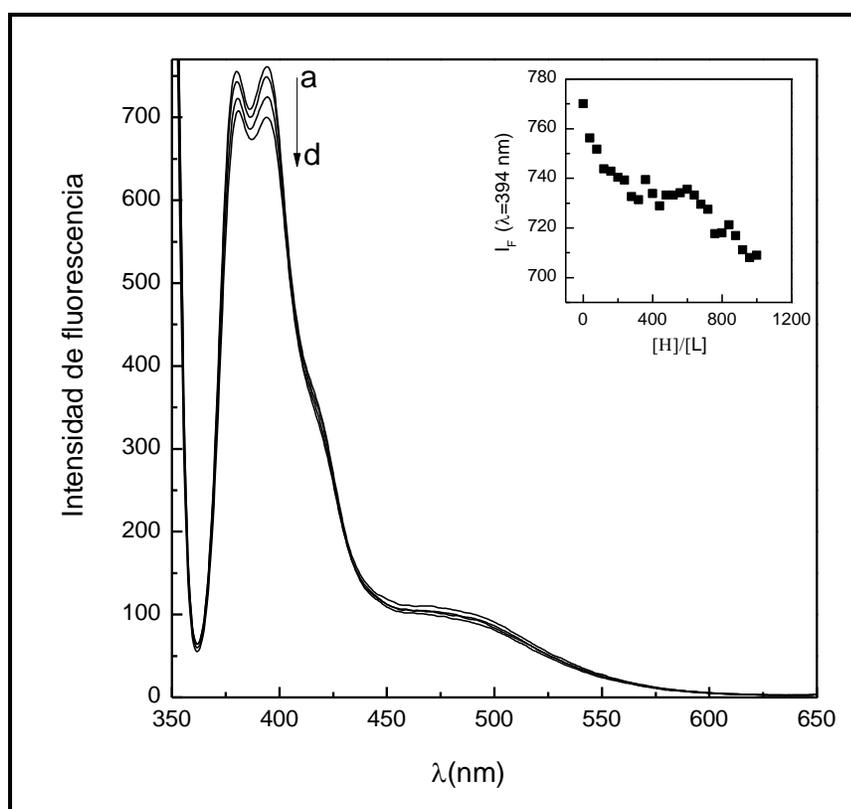


Figura 11. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ con catecol en solución acuosa a $\text{pH}=7.2$ (buffer MOPS), $\lambda_{\text{exc}} = 342$ nm, $T=25^\circ\text{C}$, $[\text{L}] = 5 \times 10^{-7}$ M. La concentración de catecol fue: a) 0 M, b) 2×10^{-5} M, c) 2.2×10^{-4} M, d) 5.2×10^{-4} M. Recuadro: Cambio de la intensidad de fluorescencia (I_F) a $\lambda = 394$ nm en función de la razón molar huésped/ligante $[\text{H}]/[\text{L}]$.

El Grupo-2 está conformado por fenetilamina y tiramina, en la Figura 12 se muestran espectros de emisión seleccionados, obtenidos durante la titulación del ligante $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ con tiramina. Se puede observar que al incrementar la concentración del huésped, ocurre una disminución de la intensidad de fluorescencia en todo el intervalo de longitudes de onda, lo cual es opuesto a lo observado con dopamina. La gráfica de intensidad a $\lambda=494$ nm en función de la razón molar huésped/ligante (recuadro en 12) muestra un comportamiento típico para la formación de un complejo. El ajuste de los datos experimentales se realizó con el programa $K(\text{AB})\text{CtI}$ el cual considera la formación de un complejo con estequiometría 1:1 huésped:ligante. El valor calculado de la constante de formación fue: $\log K_f = 3.92$ (Figura 12) el cual es significativamente menor que el del complejo 1:2 $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ -dopamina ($\log K_f = 7.91$).

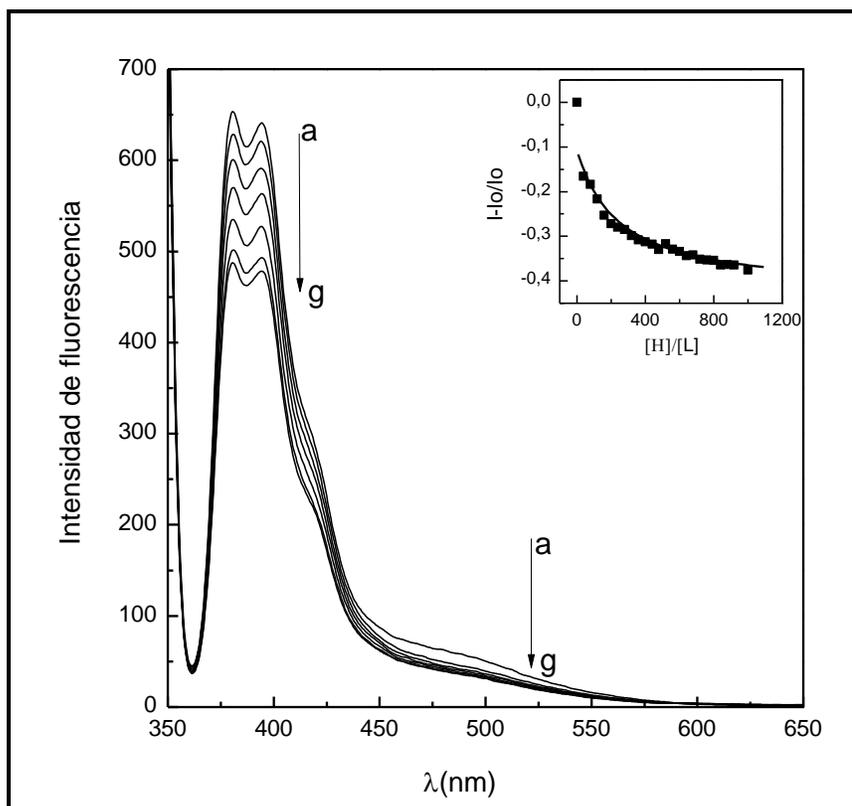


Figura 12. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ con tiramina en solución acuosa a $\text{pH}=7.2$ (buffer MOPS), $\lambda_{\text{exc}} = 342$ nm, $T=25^\circ\text{C}$, $[\text{L}] = 5 \times 10^{-7}$ M. La concentración de tiramina fue: a) 0 M, b) 6×10^{-5} M, c) 1.2×10^{-4} M, d) 2×10^{-4} M, e) 3.2×10^{-4} M, f) 4.6×10^{-4} M, g) 5.2×10^{-4} M. Recuadro: Variación en la intensidad de emisión a $\lambda = 494$ nm (normalizada) en función de la razón molar huésped/ligante $[\text{H}]/[\text{L}]$. I_0 representa la intensidad de emisión a $[\text{H}]=0$.

El menor valor de la constante de formación del complejo (edta1mpy) H_2 -tiramina, en relación al de dopamina, así como las diferencias en estequiometría (1:2 vs. 1:1), indican que el anillo catecol de dopamina y el grupo fenol de tiramina interactúan de modos distintos con el receptor al formarse los complejos. De hecho, a diferencia del complejo (edta1mpy) H_2 -dopamina, el complejo (edta1mpy) H_2 -tiramina es menos emisivo que el receptor y su formación provoca una caída casi lineal de la emisión de monómero, lo cual, una vez estandarizado, podría ser utilizado con fines cuantitativos (ver en sección de anexos Figura A5).

En el caso de fenetilamina, una molécula que no contiene grupos hidroxilo en el anillo bencénico, la formación del complejo con (edta1mpy) H_2 produjo una respuesta radiométrica en la emisión del receptor (incremento en la emisión de excímero y disminución de la emisión de monómero) (Figura 13). Este tipo de respuesta es típica para complejaciones en las que el receptor *bis*-cromofórico cambia su conformación a una que favorece la emisión de excímero a expensas de la emisión de monómero.

La grafica de relación de la intensidad excímero/monómero ($I_E=480\text{ nm}; I_M=380\text{ nm}$) en función de la razón molar huésped/ligante (recuadro en Figura 13) se ajustó satisfactoriamente con el programa K(AB)Ct (Inoue, 2013) el cual considera la formación de un complejo con estequiometría 1:1 huésped:ligante. El valor calculado de la constante de formación fue ($\log K_f = 4.12$) menor que el encontrado para el complejo (edta1mpy) H_2 -dopamina ($\log K_f = 7.91$), pero del mismo orden que el de (edta1mpy) H_2 -tiramina ($\log K_f = 3.92$) (Tabla 1). Este resultado indica, tal como se había concluido en la sección anterior, que es la interacción carga-carga entre el grupo $-CH_2COO^-$ del receptor y el grupo $-CH_2CH_2NH_3^+$ del huésped la fuerza directriz en la formación de los complejos. Las interacciones $\pi-\pi$ aromáticas y/o los puentes de hidrógeno imparten estabilidad adicional a los complejos. De estas últimas, las $\pi-\pi$ aromáticas parecen ser más importantes, ya que son las únicas que puede establecer la fenetilamina y con ello formar un complejo con estabilidad comparable a la del complejo (edta1mpy) H_2 -tiramina.

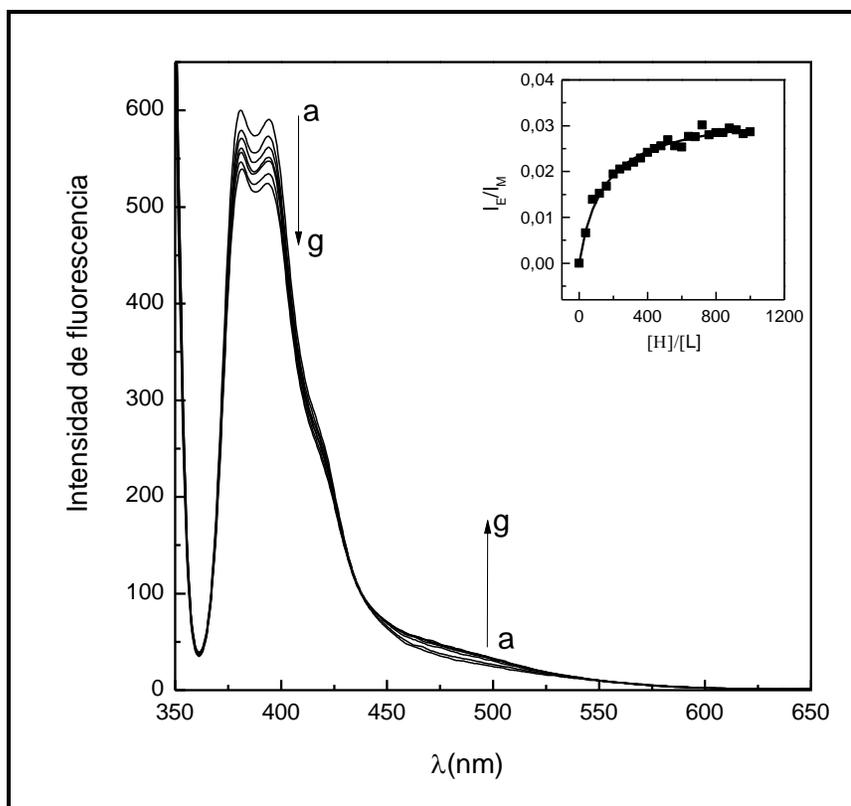


Figura 13. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ con fenetilamina en solución acuosa a $\text{pH}=7.2$ (buffer MOPS), $\lambda_{\text{exc}}=342 \text{ nm}$, $T=25^\circ\text{C}$, $[\text{L}]=5 \times 10^{-7} \text{ M}$. La concentración de fenetilamina fue: a) 0 M , b) $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, c) $8 \times 10^{-5} \text{ M}$, d) $1.6 \times 10^{-4} \text{ M}$, e) $2 \times 10^{-4} \text{ M}$, f) $3.4 \times 10^{-4} \text{ M}$, g) $5.2 \times 10^{-4} \text{ M}$. Recuadro: Relación de la intensidad excímero/monómero ($I_{\text{E}}=480 \text{ nm}$; $I_{\text{M}}=380 \text{ nm}$).

Por último se describe los resultados obtenidos con los huéspedes del Grupo-3, en este caso solo conformado por L-fenilalanina, en la Figura 14 se muestran algunos de los espectros obtenidos en la titulación de $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ con L-fenilalanina y el cambio de la intensidad de fluorescencia a $\lambda=380 \text{ nm}$ en función de la razón molar huésped/ligante $[\text{H}]/[\text{L}]$. Como puede apreciarse, a diferencia de fenetilamina, el incremento en la concentración de L-fenilalanina no provoca emisión de excímero, pero provoca una disminución casi lineal de la intensidad de la banda de monómero hasta $[\text{H}]/[\text{L}] \approx 700$, seguido de una aparente saturación. La gráfica de IF vs. $[\text{H}]/[\text{L}]$ no pudo ajustarse a ningún modelo teórico, por lo que se considera que no ocurrió la formación de complejo con estequiometría definida.

Este efecto de L-fenilalanina sobre la emisión monomérica de $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ es similar a la observada en el sistema $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ -tiramina (ver Figura A5 en anexos). Sin embargo, en

tiramina, los cambios en la emisión de excímero fueron indicativos de la asociación molecular. Por otro lado, si se comparan los efectos de los aminoácidos L-Dopa y L-fenilalanina en la emisión de (edta1mpy) H_2 se encuentra que éstos son muy contrastantes, ya que el primero forma un complejo de estequiometría definida (1:1) con $\log K_f = 3.46$, mientras que, bajo las mismas condiciones, el segundo no forma complejo. Estos resultados muestran una vez más el carácter cooperativo de las fuerzas intermoleculares en la asociación de las moléculas. La L-fenilalanina, con una cadena lateral zwitteriónica en lugar de catiónica, y un anillo aromático bencénico carente de grupos hidroxilo, no puede formar un complejo estable y de estequiometría definida con el receptor.

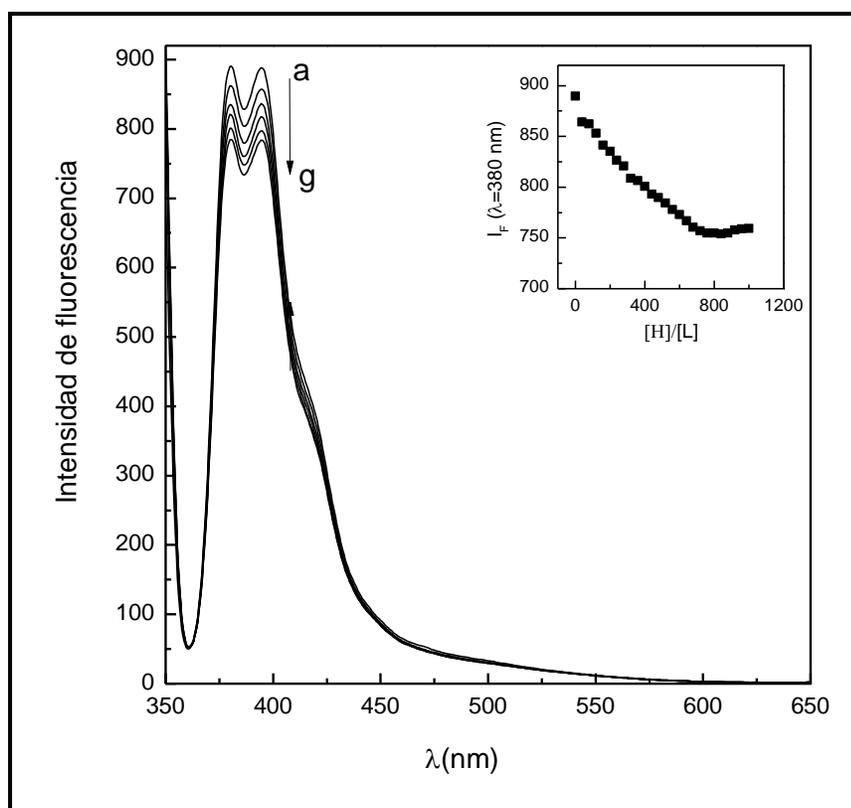


Figura 14. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (edta1mpy) H_2 con L-fenilalanina en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS), $\lambda_{exc} = 342$ nm, T=25°C, [L]= 5×10^{-7} M. La concentración de L-fenilalanina fue: a) 0 M, b) 4×10^{-5} M, c) 1×10^{-4} M, d) 1.4×10^{-4} M, e) 2×10^{-4} M, f) 2.6×10^{-4} M, g) 3.6×10^{-4} M. Recuadro: Cambio de la intensidad de fluorescencia (I_F) a $\lambda = 380$ nm en función de la razón molar huésped/ligante [H]/[L].

Estudios de Complejación con (edta1py)H₂

A diferencia de la respuesta fluorescente del receptor (edta1mpy)H₂ frente a los diferentes huéspedes, el ligante (edta1py)H₂ no presentó un comportamiento que indique formación de complejos, salvo en el caso de los sistemas (edta1mpy)H₂ -L-fenilalanina y (edta1mpy)H₂ - catecol, los cuales se discuten más adelante.

Las gráficas de intensidad en función de la razón molar [H]/[L] para la titulación de (edta1py)H₂ con dopamina, L-Dopa, tiramina y fenetilamina, se presentan en la sección de Anexos (Figuras A6-A9). Estas mostraron algunas de las siguientes características: a) una alta dispersión de datos (dopamina, Figura A6); b) una disminución o incremento abrupto de intensidad durante las primeras adiciones, seguido de una tendencia casi lineal de la intensidad (L-Dopa y tiramina, Figuras A7 y A8) (este comportamiento se atribuyó al “efecto electrolito”, pero la fuerte desviación no permitió llevar a cabo un ajuste satisfactorio de los datos experimentales); c) una caída casi lineal de la intensidad al incrementarse la concentración del huésped (fenetilamina, Figura A9).

Los resultados obtenidos de la titulación espectrofluorimétrica de (edta1py)H₂ con L-fenilalanina se muestra en la Figura 15. La formación del complejo provocó una respuesta radiométrica en la emisión del receptor. A partir de la relación en la intensidad de emisión a $\lambda=500$ nm y $\lambda=480$ nm (I_{500}/I_{480}) en función de la razón molar huésped/ligante [H]/[L] pudo calcularse la constante de formación del complejo 1:1 con el programa K(AB)Ct. El valor calculado fue: $\log K_f = 3.30$ (Tabla II). Como se discutió antes, este tipo de respuesta indica que el receptor *bis*-cromofórico cambia su conformación al formar el complejo y se favorece la emisión de excímero con decremento de la emisión de monómero.

La respuesta fluorescente de (edta1py)H₂ a la presencia de L-fenilalanina en la solución, es muy diferente a la que presentó (edta1mpy)H₂ (ver Figura 14 en sección la anterior), el cual solo muestra una disminución lineal de la intensidad a $\lambda=380$ nm, sin cambios en la emisión de excímero. Las diferencias en las respuestas de los receptores al aminoácido L-fenilalanina están relacionadas con sus estructuras. El ligante (edta1py)H₂ contiene una cadena de interconexión más corta y es menos flexible que (edta1mpy)H₂, ya que no presenta puentes metileno entre los pirenos y los grupos amida (ver Esquema II). Estas propiedades favorecen la asociación molecular para formar el complejo (edta1py)H₂-L-fenilalanina.

Por otro lado, cuando se compara el valor de la K_f del complejo (edta1mpy) H_2 - fenetilamina ($\log K_f = 4.12$, Tabla I) con el de (edta1py) H_2 -L-fenilalanina ($\log K_f = 3.30$), se encuentra que el primero es mayor. Esto apoya lo que se mencionó anteriormente, la interacción catión-anión es la principal fuerza que estabiliza a los complejos. El aminoácido L-fenilalanina, por ser un zwitterión, no establece de forma efectiva estas interacciones.

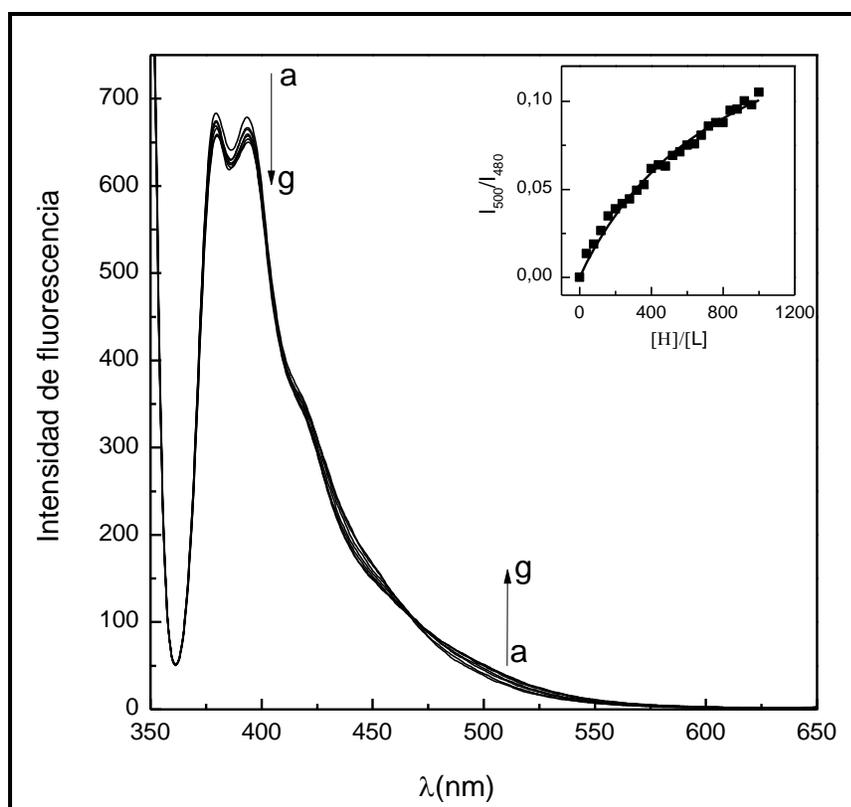


Figura 15. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (edta1py) H_2 con L-fenilalanina en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS), $\lambda_{exc} = 342$ nm, $T=25^\circ C$, $[L]= 5 \times 10^{-7}$ M. La concentración de L-fenilalanina fue: a) 0 M, b) 2×10^{-5} , c) 1.2×10^{-4} M, d) 2×10^{-4} M, e) 3.6×10^{-4} M, f) 4.4×10^{-4} M, g) 5×10^{-4} M. Recuadro: Relación de la intensidad de emisión I_{500}/I_{480} en función de la razón molar huésped/ligante $[H]/[L]$.

Otro de los huéspedes que mostró respuesta con el ligante (edta1py) H_2 es catecol, en la Figura 16 se muestran espectros seleccionados de la titulación de (edta1py) H_2 con catecol, donde se aprecia un aumento en la intensidad correspondiente a la banda de monómero y una disminución inicial de intensidad de excímero seguida por un incremento de la misma.

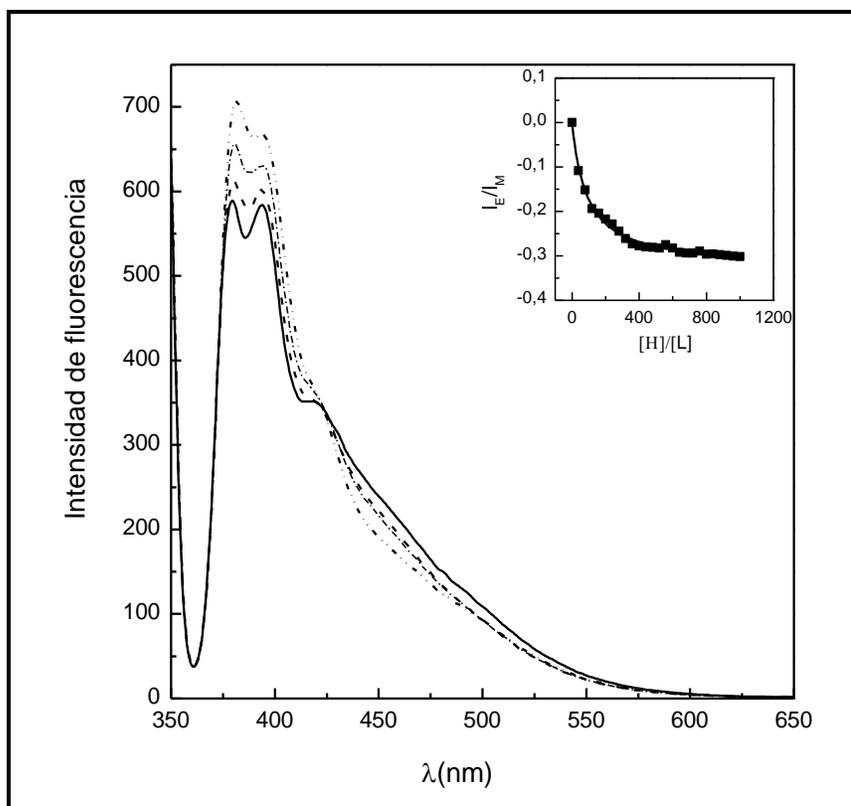


Figura 16. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (edta1py)H₂ con catecol en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS), λ_{exc} =342 nm, T=25°C, [L]= 5x10⁻⁷ M. La concentración de catecol fue: 0 M (—), 2x10⁻⁵ M (---), 1x10⁻⁴ M (.....), 2.4x10⁻⁴ M (-.-). Recuadro: relación de la intensidad excímero/monómero (I_E=480 nm; I_M=380 nm).

La gráfica de relación de la intensidad excímero/monómero (I_E=480 nm; I_M=380 nm) en función de la razón molar huésped/ligante (recuadro en Figura 16), se ajustó satisfactoriamente con el programa K(AB)Ct. El valor calculado de la constante fue: $\log K_f = 4.34$ (Tabla 2). Este valor de la constante de formación es más alto que el encontrado para el complejo (edta1py)H₂-L-fenilalanina ($\log K_f = 3.30$) y más alto que cualquiera de los calculados para los complejos 1:1 de (edta1mpy)H₂ (ver Tabla 1). Este resultado sugiere la preferencia de un receptor más pequeño y rígido, como es (edta1py)H₂, por un huésped también pequeño con el que establece interacciones π - π aromáticas y puentes de hidrógeno. Esta afinidad receptor-catecol no se observó en el caso de (edta1mpy)H₂, el cual no formó complejo definido con dicho huésped (ver Figura 11 en sección anterior).

Tabla 2. Constantes de formación ($\log K_f$) de los complejos de (edta1py) H_2 con los diferentes huéspedes.

Huésped	<i>Log K_f</i>
Catecol	4.34
L-fenilalanina	3.30

CONCLUSIONES

1. Los estudios de complejación molecular llevados a cabo con los ligantes (edta1py) H_2 y (edta1mpy) H_2 muestran que estas moléculas pueden actuar como receptores de dopamina y sustancias análogas, y que señalizan la asociación molecular mediante cambios en sus espectros de fluorescencia.
2. El ligante (edta1mpy) H_2 presentó las mejores respuestas fluorescentes al interactuar con los huéspedes y formó complejos de estequiometrias definidas huésped:ligante (2:1 en el caso de dopamina, 1:1 con los demás huéspedes) y altas constantes de estabilidad con dopamina, L-Dopa, tiramina y fenetilamina. El orden de estabilidad de los complejos, tomando en cuenta el valor de $\log K_f$, es el siguiente: dopamina (7.91) > fenetilamina (4.12) > tiramina (3.92) > L-Dopa (3.46). Los estudios con los dos huéspedes restantes (catecol y L-fenilalanina) no indicaron la formación de complejos definidos.
3. La mayor estabilidad del complejo (edta1mpy) H_2 -dopamina se atribuyó a que se establecen diferentes fuerzas intermoleculares: a) carga-carga entre el grupo CH_2COO^- del ligante y el grupo $-CH_2CH_2NH_3^+$ del huésped, b) interacciones π - π aromáticas entre el grupo catecol y los pirenos, y c) puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del anillo catecol y sitios específicos del receptor.
4. Se estableció que la estructura química de los huéspedes influye en la formación de los complejos, ya que la naturaleza del grupo lateral (catiónico o zwitteriónico), así como la presencia y número de grupos hidroxilo en el anillo aromático tienen efecto en la estabilidad y en el tipo de respuesta fluorescente del receptor.
5. Con base en los resultados de este estudio se puede concluir que el ligante (edta1mpy) H_2 tiene potencial de ser aplicado como sensor fluorescente de dopamina en medio acuoso bajo condiciones de pH fisiológico.

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de complejación con $(\text{edta1py})\text{H}_2$ a pH 7.2, con concentraciones más bajas de los huéspedes, para obtener una relación huésped:ligante menor y así evitar el efecto electrolítico.
2. Evaluar la estabilidad de los complejos mediante otras técnicas. Se recomienda de manera especial hacer esta evaluación mediante resonancia magnética de protón (^1H RMN), ya que esta técnica además de permitir el cálculo de las constantes de estabilidad, hace posible la deducción de las interacciones ligante-huésped de manera más precisa mediante el análisis de los desplazamientos químicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Atwood, L. J., Davis, J. E., Macnicol, D., Vogtle, F. (1996). *Comprehensive Supramolecular Chemistry: Supramolecular reactivity and transport: bioinorganic systems* (1 ed. Vol. 5): Ed. Pergamon.
- Barrett, S. P., Pihl, R. O., Benkelfat, C., Brunelle, C., Young, S. N., & Leyton, M. (2008). The role of dopamine in alcohol self-administration in humans: individual differences. *European Neuropsychopharmacology*, 18(6), 439-447.
- Bahena Trujillo, R., Flores, G., Arias Montaña, J. A., de Puebla, P. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*, 11, 39-60.
- Campbell, N. A., Reece, J. B. (2007). *Biología* (7ma ed.). Madrid, España: Ed. Médica Panamericana. 62-63 p.
- Coskun, A., Akkaya, E. U. (2004). Three-point recognition and selective fluorescence sensing of L-DOPA. *Organic Letters*, 6(18), 3107-3109.
- Gennaro, A. R. (2003). *Remington farmacia* (20 ed. Vol. 2). Buenos Aires, Argentina: Ed. Médica Panamericana. 1539, 1585 p.
- Inoue, M. (2009). *Excel® Worksheets for Spectrometry*. Universidad de Sonora.
- Inoue, M. (2013). *Spectrometric Titration: A guide to experimental methods* (1er ed.). Hermosillo, Sonora: Universidad de Sonora. 14-16, 51-54 p.
- Jun, E. J., Liu, H., Choi, J., Lee, J. Y., Yoon, J. (2012). New fluorescent receptor composed of two imidazoliums, two pyrenes and a boronic acid for the recognition of DOPAC. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 176, 611– 617.
- Larkin, P. (2011). *Infrared and Raman spectroscopy; principles and spectral interpretation* (1er ed). San Diego, California : Ed. Elsevier. 8,9,33 p.
- Lloyd, K. G., Davidson, L., Hornykiewicz, O. (1975). The neurochemistry of Parkinson's disease: effect of L-dopa therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics*, 195(3), 453-464.
- Machi, L., Muñoz, I. C., Pérez-González, R., Sánchez, M., Inoue, M. (2009). Pyrene bichromophores composed of polyaminopolycarboxylate interlink: pH response of excimer emission. *Supramolecular Chemistry*, 21(8), 665-673.
- Machi, L., Santacruz, H., Sánchez, M., Inoue, M. (2007). Cd²⁺-sensitizing bichromophore: Excimer emission from an EDTA-methylnaphthalene derivative. *Inorganic Chemistry Communications*, 10(5), 547-550.

- Mascareñas Cariño, L. (2004). *Estudios de Reconocimiento Molecular de Dopamina, Tiramina y Fenetilamina, con el Nuevo Ligante Fluorescente 1,4-bis (metilencarboxi)-1,4-bis(pirenilacetamida)-1,4.diazabutano*. Universidad de Sonora.
- Núñez González, C. (2009). *Diseño, síntesis y propiedades de nuevos receptores aza, oxaza y tioaza macrocíclicos y de sus complejos metálicos*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Ocampo Prado, N. (2008). *Estudios sobre el comportamiento de complejos metálicos con bases de schiff compartimentales en la obtención de compuestos polinucleares*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Palma Muñoz, I. C. I. (2006). *Estudio Espectroscópico y de Coordinación Metálica en Solución de Ligantes Macrocíclicos Tipo Ciclofano y de Nuevos Ligantes de Cadena Abierta Derivados de Pireno*. Universidad de Sonora.
- Peaston, R. T., Weinkove, C. (2004). Measurement of catecholamines and their metabolites. *Annals of clinical biochemistry*, 41(1), 17-38.
- Pérez-González, R., Machi, L., Inoue, M., Sánchez, M., Medrano, F. (2011). Fluorescence and conformation in water-soluble bis (pyrenyl amide) receptors derived from polyaminopolycarboxylic acids. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 219(1), 90-100.
- Secor, K. E., Glass, T. E. (2004). Selective amine recognition: development of a chemosensor for dopamine and norepinephrine. *Organic Letters*, 6(21), 3727-3730.
- Valeur, B. (2002). *Molecular fluorescence: principles and applications*. New York: Ed. John Wiley y Sons. 1-9 p.

ANEXO 1

Titulaciones Espectrométricas

Cuando los compuestos A y B reaccionan entre sí para formar un complejo 1:1 y todas las especies se encuentran disueltas alcanzan el equilibrio:



Para una reacción como la de la ecuación 1-1, la constante de equilibrio está definida por:

$$K_f = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad (1-2)$$

La constante de equilibrio es una medida de la estabilidad termodinámica del complejo AB, y es llamada constante de formación, o bien, constante de estabilidad y/o constante de enlace (Inoue, 2013).

Cuando la reacción entre A y B es acompañada por cualquier cambio en el espectro ya sea de A o B, la constante de formación puede ser determinada por los cambios observados en el espectro de uno de los componentes a una concentración constante mientras la otra varía. Algunos parámetros espectrales útiles incluyen:

- Cambio en el desplazamiento químico en RMN ($\Delta\delta$).
- Cambio en la absorbancia en el espectro UV-vis (ΔA).
- Cambio en la fluorescencia (ΔI).
- Longitud de onda de la banda de emisión o absorción ($\Delta\lambda$).

Cuando se observa un cambio espectral de A se observa a una (concentración constante), el parámetro espectral de A se relaciona con las fracciones molares de A y AB de la siguiente manera:

$$I_j = \frac{I_A[A]_j + I_{AC}[AB]_j}{[A]_t} \quad (1-3)$$

Donde, I_j : valor del parámetro espectral observado para A en la muestra j .

ΔI_{AC} : valor de I correspondiente a A en el complejo AB

$[A]_t$: concentración total de A

El balance de masa para A:

$$[A]_t = [A]_j + [AB]_j \quad (1-4)$$

La combinación de las ecuaciones 1-3 y 1-4 nos da la concentración del complejo AB:

$$[AB]_j = \frac{I_j - I_A}{I_{AC} - I_A} [A]_t \quad (1-5)$$

Esta ecuación se rescribe por los cambios espectrales referidos al espectro de A en su estado libre:

$$[AB]_j = \frac{\Delta_j}{\Delta_{AC}} [A]_t \quad (1-6)$$

Donde, $\Delta_j = I_j - I_A$

$$\Delta_{AC} = I_{AC} - I_A$$

La concentración libre de A y B está dada de la siguiente manera:

$$[A]_j = \left(1 - \frac{\Delta_j}{\Delta_{AC}}\right) [A]_t \quad (1-7)$$

$$[B]_j = [B]_{t,j} - \frac{\Delta_j}{\Delta_{AC}} [A]_t \quad (1-8)$$

Obteniendo la ecuación para K_f

$$K_f = \frac{\frac{\Delta_j}{\Delta_{AC}}}{\left(1 - \frac{\Delta_j}{\Delta_{AC}}\right) \left([B]_{t,j} - \frac{[A]_t I_A}{\Delta_{AC}}\right)} \quad (1-9)$$

Sobre la base de esta ecuación, la constante de formación K_f , se puede obtener fácilmente, si se conocen los valores de tanto de I_A y I_{AC} . El valor I_A puede identificarse

simplemente con el parámetro espectral observada en $[B]_t=0$, pero el valor de I_{AC} es generalmente desconocido.

Cuando el parámetro espectral I_j de A se observa por el cambio de $[B]_t$ en una constante $[A]_t$, se obtiene una curva de titulación, en donde un cambio en un parámetro espectral (Δ en ecuación 1-6) se presenta frente a $[B]_t$. Si se observa que Δ se desvía sistemáticamente de la tangente del origen, K_f se puede determinar mediante el cálculo de mínimo cuadrados, en donde tanto K_f como Δ_{AC} son tomados como parámetros desconocidos.

A partir de lo antes explicado fueron desarrollados por el Dr. Motomichi Inoue los programas computacionales K(AB)Ct, K(AB)Ctl y K(ABn2)Ctl utilizados en el presente estudio. Estos programas se basan en la ecuación general 1-3 descrita anteriormente. Si no hay un cambio significativo en el ambiente químico alrededor de A por efecto de la adición de B, el cambio en la intensidad observada, I_j , está dada de acuerdo a la ecuación 1-6 y la K_f puede calcularse con el programa K(AB)Ct. Esta situación se presenta en titulaciones en las que $[B]_t \approx [A]_t$, a fuerza iónica constante.

En cambio, en experimentos donde $[B]_t/[A]_t > 100$, el cambio en el ambiente químico de A es significativo debido al exceso de B, sobre todo en las primeras adiciones, y éste tiende a la saturación en la medida que $[B]_t$ incrementa. Este efecto es conocido como efecto electrolito y puede provocar cambios significativos en la emisión de A durante la primera etapa de la titulación. En este caso, el ajuste de los datos experimentales puede efectuarse de mejor manera si se excluyen datos iniciales a $[B]_t/[A]_t \approx 0$. Los programas K(AB)Ctl y K(ABn2)Ctl, para complejos con estequiometrías 1:1 y 1:2, respectivamente, están diseñados para esta situación y toman la I_A como parámetro de ajuste (denominada I_o en el programa) debido a que ésta no es idéntica a la I_A observada en ausencia de B, y debe ser estimada por extrapolación a $[B]_t = 0$. El programa K(ABn2)Ctl considera la formación de complejos 1:2 de forma sucesiva o en etapas. Sin embargo, si K_1 para el complejo AB es considerada ser mucho menor que K_2 para el complejo AB_2 ($K_1 \ll K_2$) el programa puede utilizarse para calcular la constante de complejos AB_2 que se forman en una etapa.

ANEXO 2

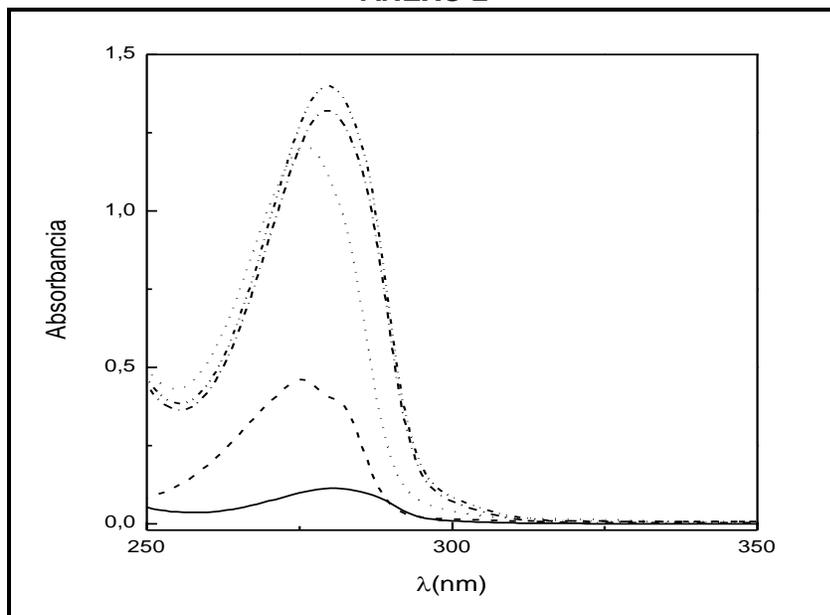


Figura A1. Espectros de absorción UV-Vis de los huéspedes a una concentración de $[5 \times 10^{-4}$ M], el orden de los huéspedes dopamina (—), L-tirosina (---), catecol (.....), norepinefrina (-.-), epinefrina (- - -), T=25°C, pH=7.2 (buffer MOPS).

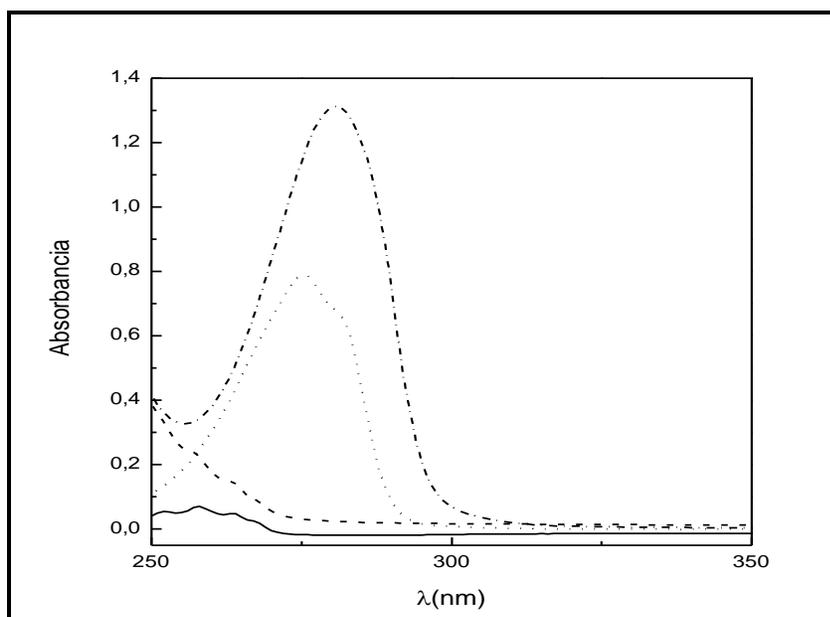


Figura A2. Espectros de absorción UV-Vis de los huéspedes a una concentración de $[5 \times 10^{-4}$ M], el orden de los huéspedes fenetilamina (—), L-fenilalanina (---), tiramina (.....), L-Dopa (-.-), T=25°C, pH=7.2 (buffer MOPS).

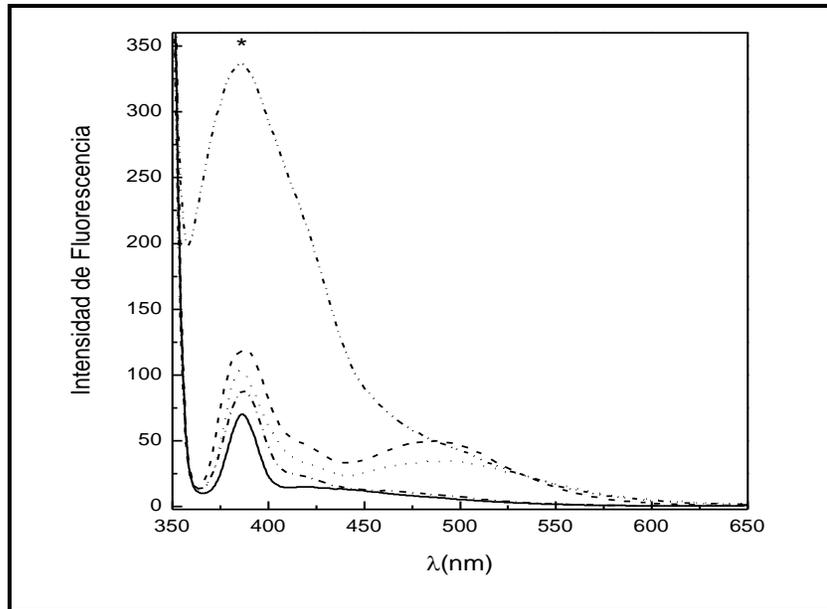


Figura A3. Espectros de fluorescencia de los huéspedes a una concentración de $[5 \times 10^{-5} \text{ M}]$, el orden de los huéspedes es: dopamina (—), catecol (---), y a una concentración de $[1 \times 10^{-4} \text{ M}]$, epinefrina (.....), fenetilamina (---), L-Dopa (-·-·), $T=25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.2$ (buffer MOPS). *Pico correspondiente a la banda Raman del agua. (Larkin, 2011)

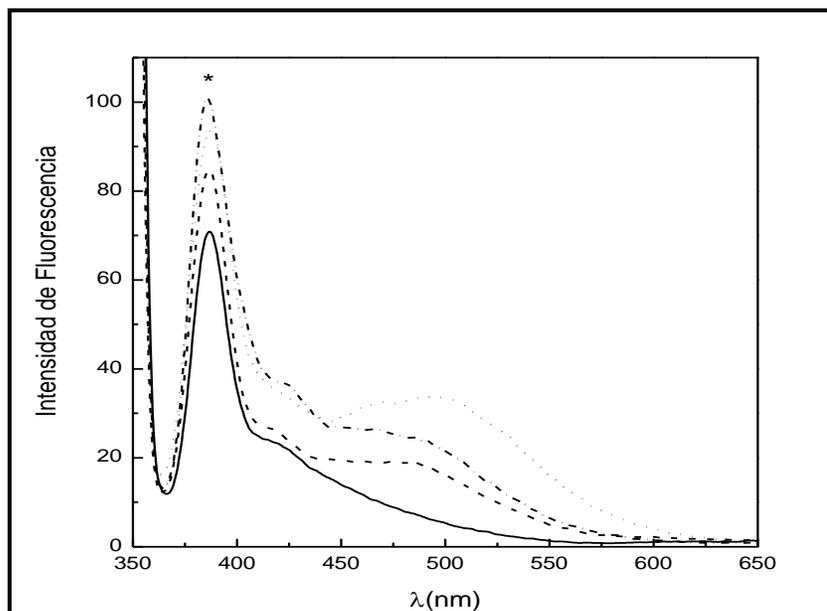


Figura A4. Espectros de fluorescencia de los huéspedes a una concentración de $[5 \times 10^{-5} \text{ M}]$, el orden de los huéspedes es tiramina (—), L-tirosina (---), norepinefrina (.....), L-fenilalanina (-·-·), $T=25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.2$ (buffer MOPS). *Pico correspondiente a la banda Raman del agua. (Larkin, 2011)

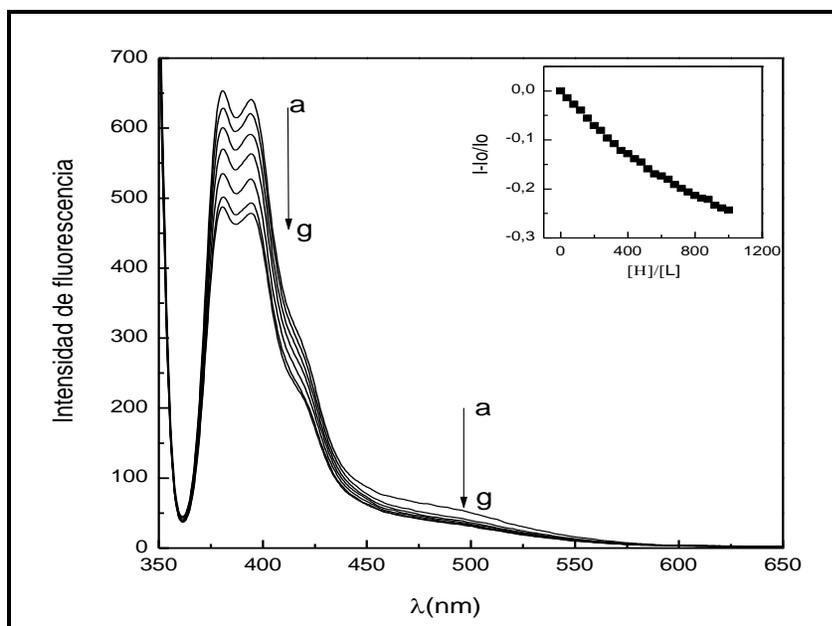


Figura A5. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de $(\text{edta1mpy})\text{H}_2$ con tiramina en solución acuosa a $\text{pH}=7.2$ (buffer MOPS), $\lambda_{\text{exc}}=342$ nm, $T=25^\circ\text{C}$, $[\text{L}]=5 \times 10^{-7}$ M. La concentración de tiramina fue: a) 0 M, b) 6×10^{-5} M, c) 1.2×10^{-4} M, d) 2×10^{-4} M, e) 3.2×10^{-4} M, f) 4.6×10^{-4} M, g) 5×10^{-4} M. Recuadro: Cambio de intensidad normalizada de monómero a (I_f) a $\lambda=380$ nm en función de la razón molar huésped/ligante $[\text{H}]/[\text{L}]$. I_0 representa la intensidad de emisión a $[\text{H}]=0$.

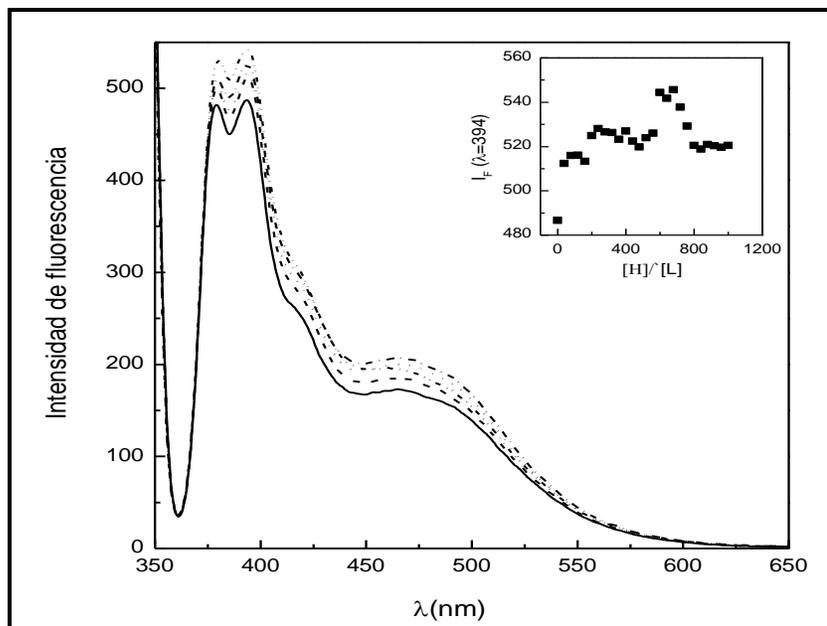


Figura A6. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (edta1py)H₂ con dopamina en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS), $\lambda_{exc} = 342$ nm, T=25°C, [L]= 5×10^{-7} M. La concentración de dopamina fue: 0 M (—), 2×10^{-5} M (---), 6×10^{-5} M (.....), 1.4×10^{-4} M (-·-·-), 5×10^{-4} M (- - -). Recuadro: Cambio de la intensidad de fluorescencia (I_F) a $\lambda=394$ nm en función de la razón molar huésped/ligante [H]/[L].

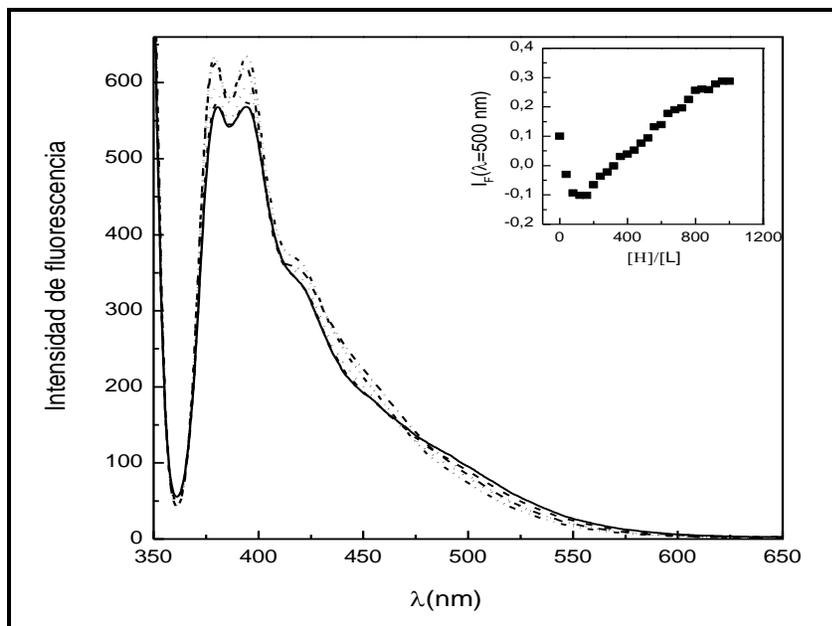


Figura A7. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de $(\text{edta1py})\text{H}_2$ con L-Dopa en solución acuosa a $\text{pH}=7.2$ (buffer MOPS), $\lambda_{\text{exc}}=342$ nm, $T=25^\circ\text{C}$, $[\text{L}]=5\times 10^{-7}$ M. La concentración de L-Dopa fue 0 M (---), 4×10^{-5} M (-·-·-), 1.8×10^{-4} M (·····), 3.6×10^{-4} M (---), 5×10^{-4} M (—). Recuadro: Cambio de la intensidad de fluorescencia (I_F) a $\lambda=500$ nm en función de la razón molar huésped/ligante $[\text{H}]/[\text{L}]$.

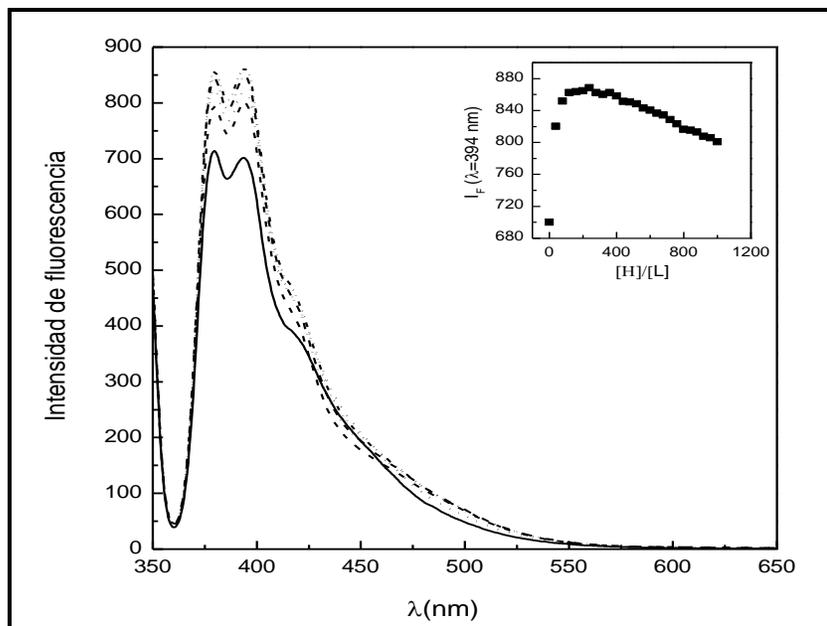


Figura A8. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (edta1py)H₂ con tiramina en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS), λ_{exc} =342 nm, T=25°C, [L]= 5×10^{-7} M. La concentración de tiramina fue: 0 M (—), 2×10^{-5} M (---), 1×10^{-4} M (.....), 2.6×10^{-4} M (-.-), 5×10^{-4} M (-.-.-). Recuadro: Cambio de la intensidad de fluorescencia (I_F) a $\lambda=394$ nm en función de la razón molar huésped/ligante [H]/[L].

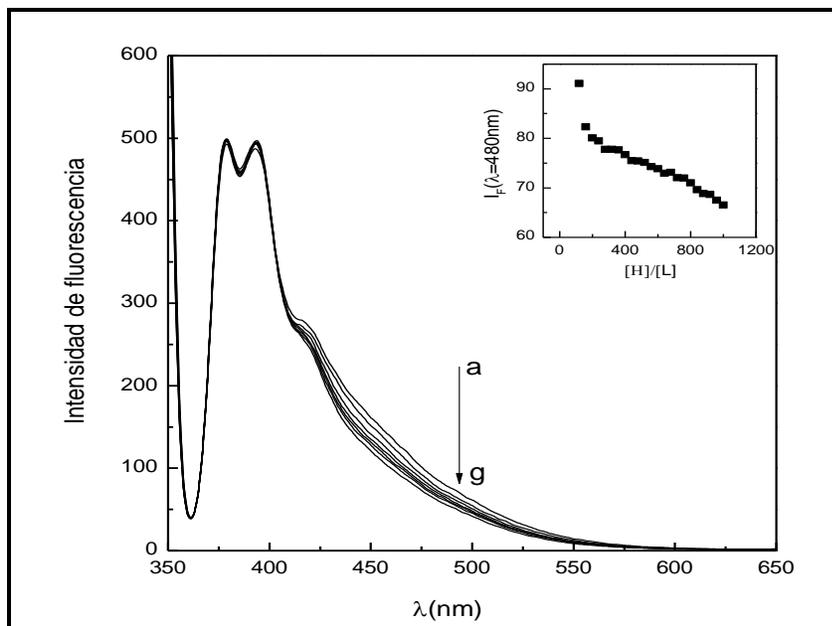


Figura A9. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de $(\text{edta1py})\text{H}_2$ con fenetilamina en solución acuosa a $\text{pH}=7.2$ (buffer MOPS), $\lambda_{\text{exc}}=342$ nm, $T=25^\circ\text{C}$, $[\text{L}]=5 \times 10^{-7}$ M. La concentración de fenetilamina fue: a) 0 M, b) 2×10^{-5} M, c) 1.2×10^{-4} M, d) 2×10^{-4} M, e) 3×10^{-4} M, f) 3.6×10^{-4} M, g) 5×10^{-4} M. Recuadro: Cambio de la intensidad de fluorescencia (I_F) a $\lambda=480$ nm en función de la razón molar huésped/ligante $[\text{H}]/[\text{L}]$.

