

# UNIVERSIDAD DE SONORA

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

Estudio de las Propiedades de Complejación hacia Histamina  
y Moléculas Análogas por el Ligante *bis*-Cromofórico Acíclico  
Derivado de Pireno (dtpa1py)H<sub>3</sub>



Que para obtener el Título de

**QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO**

Presenta:

**Reina Vianey Quevedo Robles**

# 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 del examen profesional de Reina Vianey Quevedo Robles hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado Estudio de las Propiedades de Complejación hacia Histamina y Moléculas Análogas por el Ligante *Bis-Cromofórico* Acíclico Derivado de Pireno (dtpa1py)<sub>3</sub> y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico.

---

Dra. Lorena Machi Lara  
Directora de tesis

---

Dra. Rocío Sugich Miranda  
Secretaria

---

M. C. María Lucila Rascón Duran  
Vocal

---

Dr. Juan Carlos Gálvez Ruíz  
Suplente

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Esta tesis va dedicada especialmente a mis padres por todo amor, confianza, apoyo y paciencia mostrada durante estos años, por siempre estar ahí y no rendirse ante nada, a pesar de estar lejos siempre estuvieron cerca de mí, los adoro con todo mi corazón y les agradezco mucho su apoyo incondicional... otra parte muy importante a quien dedico esta tesis son mis hermanos Hector, Julio, José, Beto y sus familias que también forman una parte esencial en este logro, ya que siempre han estado apoyándome y echándome porritas, gracias los amo!...

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.

Especialmente a mi directora de tesis la Dra. Lorena Machi Lara por el apoyo, asesoría, consejos y confianza brindados para la realización de este trabajo así también por su paciencia y dedicación.

De igual manera a mis sinodales por tu tiempo y paciencia a la Dra. Rocío Sugich Miranda, M. C. María Lucila Rascón Duran y Dr. Juan Carlos Gálvez Ruíz

Al Dr. Refugio Perez (Cuco) por el apoyo, asesoría, por resolver mis dudas existenciales, etc. etc...

A M.C. Eduardo Avila (lalo Hermoso) por su apoyo, asesoría, etc... y por siempre querer hacer de mí una mejor persona y entender que era mejor que yo realizara la síntesis de mi ligante, no era por tirar el ligante en el rotavapor, solo era fortalecer mi aprendizaje, gracias lalo...

A mis compañeros y amigos que me apoyaron durante la realización de mi trabajo de tesis y mi carrera... Mariana, Zelma, Yoly, Mayra, Johanna (flaca), Yesisita, Marcos, Melgozo, Montoya, Manuel y Moises....

## CONTENIDO

UNIVERSIDAD DE SONORA .....	2
DIVISIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD .....	2
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS .....	2
FORMA DE APROBACIÓN .....	2
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS .....	3
CONTENIDO .....	4
LISTA DE TABLAS .....	6
LISTA DE FIGURAS .....	7
OBJETIVOS.....	9
General .....	9
Particulares .....	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
ANTECEDENTES.....	15
Importancia de las Aminas Bioactivas y Compuestos Relacionados.....	15
Química Supramolecular .....	16
Titulaciones Espectrométricas.....	17
Interacciones Moleculares.....	21
Puente de Hidrógeno .....	22
Interacciones $\pi$ - $\pi$ Aromáticas.....	23
Interacciones Electroestáticas .....	23
Quimiosensores Fluorescentes .....	24
Mecanismo de Funcionamiento de los Quimiosensores Fluorescentes.....	25
Quimiosensores Fluorescentes de Histamina.....	30
Técnicas Espectroscópicas .....	33
Niveles de Energía Moleculares y Transiciones Electrónicas.....	34
Fluorescencia.....	36
Tipos de Transición en Fluorescencia.....	39
Factores que Afectan la Fluorescencia .....	40

DISEÑO EXPERIMENTAL.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS .....	44
Materiales .....	44
Técnicas Espectroscópicas y Equipo de Laboratorio.....	44
Obtención de los Espectros de Absorción y Emisión de los Huéspedes .....	44
Estudios de Complejación Molecular .....	45
Equipo de Laboratorio.....	45
Programas Computacionales.....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
CONCLUSIONES .....	56
RECOMENDACIONES .....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	58
ANEXOS.....	61

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1.	Constantes de formación ( $\log K_f$ ) de los complejos de $(dtpa1py)H_3$ con los diferentes huéspedes.....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ligantes <i>bis</i> -cromofóricos derivados de pireno.....	13
2. Estructuras químicas y valores de $pK_a$ de las moléculas huésped incluidas en este estudio.....	14
3. Interacciones no-covalentes: 1) puentes de hidrógeno; 2) Interacciones catión- $\pi$ ; 3) Interacciones $\pi$ - $\pi$ : (a) cara a cara (face-to-face); (b) borde a cara (edge-to face).....	22
4. Interacciones electrostáticas: (a) interacción ion-ion, (b) interacción ion-dipolo, (c) interacción dipolo-dipolo.....	24
5. Representación gráfica de un quimiosensor fluorescente.....	25
6. Diagrama de orbital de energía de fluorescencia para sensores PET antes y después de la unión de cationes a) transferencia de electrones hacia delante b) transferencia de electrones hacia atrás c) proceso de emisión de fluorescencia.....	26
7. Representación gráfica de un quimiosensor fluorescente <i>bis</i> -cromofórico.....	27
8. Estructura química de los compuestos policíclicos aromáticos naftaleno, antraceno y pireno.....	28
9. Ligantes <i>bis</i> -cromofóricos pireno-piridina L1 y L2 y compuesto de referencia L3, utilizados para el reconocimiento molecular de los ácidos cianúrico y parabánico.....	28
10. Dependencia de la fluorescencia en función del cambio de pH ( $\lambda_{exc} = 340$ nm, 298 K) de L en solución acuosa.....	30
11. Espectros de emisión para el ligante (dtpa1py) $H_3$ en solución acuosa a distintos valores de pH.....	33
12. Niveles de energía moleculares electrónicos.....	35
13. Transiciones electrónicas para formaldehído.....	36
14. Diferentes estados de excitación.....	37
15. Diagrama de Jablonski.....	38
16. Desplazamiento de Stokes.....	39
17. Espectro de emisión de (dtpa1py) $H_3$ en solución acusa a pH=7.2 (buffer	

	MOPS), $\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$ , $T = 25^\circ\text{C}$ . $[L] = 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ .....	47
18.	Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (dtpa1py) $H_3$ con histamina en solución acuosa a $\text{pH} = 7.2$ (buffer MOPS), $\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$ , $T = 25^\circ\text{C}$ .....	49
19.	Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (dtpa1py) $H_3$ con triptamina en solución acuosa a $\text{pH} = 7.2$ (buffer MOPS), $\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$ , $T = 25^\circ\text{C}$ .....	50
20.	Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (dtpa1py) $H_3$ con fenetilamina en solución acuosa a $\text{pH} = 7.2$ (buffer MOPS), $\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$ , $T = 25^\circ\text{C}$ .....	51
21.	Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (dtpa1py) $H_3$ con imidazol en solución acuosa a $\text{pH} = 7.2$ (buffer MOPS), $\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$ , $T = 25^\circ\text{C}$ .....	53
22.	Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (dtpa1py) $H_3$ con L-triptófano en solución acuosa a $\text{pH} = 7.2$ (buffer MOPS), $\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$ , $T = 25^\circ\text{C}$ .....	55

## OBJETIVOS

### General

Estudiar las propiedades de complejación molecular hacia histamina y moléculas análogas por el ligante *bis*-cromofórico acíclico derivado de pireno (dtpa1py)<sub>3</sub>.

### Particulares

1. Estudiar la formación de complejos moleculares de histamina y los compuestos análogos triptamina, fenetilamina, imidazol, L-histidina y L-triptofano, con el receptor (dtpa1py)<sub>3</sub> en medio acuoso a pH=7.2 (buffer MOPS) 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 formación determinadas por fluorescencia.
3. Establecer el potencial de aplicación de (dtpa1py)<sub>3</sub> como sensor fluorescente de histamina en medio acuoso bajo condiciones de pH fisiológico.

## RESUMEN

En el presente trabajo se llevaron a cabo estudios de reconocimiento molecular en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS) de histamina y moléculas análogas, con el ligante de cadena abierta derivado de pireno (dtpa1py)<sub>3</sub>. Éste muestra las bandas de emisión típicas de pireno localizadas entre 379 y 395 nm y una banda ancha a 490 nm la cual se atribuye a la formación de dímeros excitados de pireno (excímeros). Bajo las condiciones de pH del estudio y de acuerdo con los p*K*<sub>a</sub> de los huéspedes, éstos se encontrarán ya sea en su forma catiónica (histamina, triptamina y fenetilamina), neutra (imidazol) o zwitteriónica (L-triptófano y L-histidina).

A pH=7.2 el ligante (dtpa1py)<sub>3</sub> se encuentra en su forma monoprotónada (LH<sup>2-</sup>), la cual contiene a los tres grupos carboximetil en su forma ionizada (-CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>) y al grupo amino central de la unidad dtpa en su forma protonada. Se considera que la asociación de los grupos pireno en la especie LH<sup>2-</sup> de (dtpa1py)<sub>3</sub> ocurre mediante interacciones hidrofóbicas y de tipo π-π. Bajo estas condiciones, el ligante puede actuar como un receptor tipo pinza de diferentes tipos de moléculas y formar complejos sustrato-receptor en solución acuosa, estabilizados por interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y/o de tipo π-π.

En todos los sistemas estudiados se observó que la adición del huésped a la solución del receptor causó una disminución de la intensidad de emisión de excímero ( $\lambda_{\text{máx}}=490$  nm) lo cual fue indicativo de la formación de complejos de inclusión. Esta variación de intensidad en función de la razón molar [huésped]/[receptor] permitió calcular las constantes de formación de los complejos *K*<sub>f</sub> y establecer el siguiente orden de estabilidad: (dtpa1py)<sub>3</sub>-histamina > (dtpa1py)<sub>3</sub>-triptamina > (dtpa1py)<sub>3</sub>- L-triptófano > (dtpa1py)<sub>3</sub>- fenetilamina > (dtpa1py)<sub>3</sub>-imidazol. La estabilidad de los complejos se atribuyó principalmente a (1) interacciones electrostáticas catión-anión entre los grupos -RCOO<sup>-</sup> del receptor y el grupo -RNH<sup>3+</sup> de los huéspedes y (2) interacciones hidrofóbicas y/o tipo π-π entre los grupos aromáticos y los pirenos. Se considera que en el caso del complejo (dtpa1py)<sub>3</sub>-histamina, el cual presentó la *K*<sub>f</sub> más alta (log *K*<sub>f</sub> =5.72), además de las interacciones anteriormente mencionadas presenta la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo amino central protonado de la unidad dtpa y el par electrónico libre del nitrógeno-3 del imidazol. Los resultados de este estudio revelan el potencial de aplicación de (dtpa1py)<sub>3</sub> como sensor fluorescente de histamina.

## INTRODUCCIÓN

El alto desarrollo industrial, el aumento de la vida sedentaria, así como los constantes cambios ambientales han provocado en los seres humanos modificaciones en la alimentación y estilo de vida, lo cual se ha relacionado con el aumento de enfermedades.

Los aminoácidos y las aminos biológicas tienen un papel fundamental en los seres vivos. Algunas aminos aromáticas tienen actividad a nivel biológico y su disminución o aumento en los organismos se relaciona con algunas enfermedades. Padecimientos como la epilepsia, Parkinson, esquizofrenia y otras enfermedades neurológicas se deben a cambios en los niveles óptimos en el organismo de ciertas aminos biológicas y/o aminoácidos esenciales.

Una amina relevante a nivel biológico es la histamina, la cual tiene diversas funciones como son la inducción de la contracción del músculo liso intestinal y la vasodilatación, además de ser un neuromodulador y un modulador de la respuesta inmune. Esta sustancia se ha involucrado en varios procesos patológicos como la epilepsia, la enfermedad de Parkinson, alteraciones del ciclo vigilia-sueño y esquizofrenia. Sin embargo, algunas anomalías clínicas como problemas de habla y retraso mental se han asociado con anomalías en el precursor de histamina, el aminoácido L-histidina (Ramos y col., 2009; Wade y Tucker, 1998). Otras aminos importantes a nivel biológico son la triptamina y la fenetilamina, las cuales actúan como neurotransmisores en el sistema nervioso central. (Feng y Kleinermanns, 2009; Yao y col., 2000)

El triptófano, por otro lado, es un aminoácido esencial cuya concentración en el organismo es la más baja de todos los aminoácidos, lo cual puede desempeñar un papel limitante en la síntesis de proteínas. Además, el triptófano es un importante precursor de una variedad de compuestos biológicamente activos, como la serotonina. Se han reportado enfermedades como el síndrome de eosinofilia maligna, enfermedades neurológicas y pulmonares relacionadas a un bajo nivel de triptófano. (Sainio y col., 1996)

En los últimos años se ha incrementado el interés en desarrollar sensores para la detección y cuantificación de una diversidad de analitos bioactivos, tanto orgánicos como inorgánicos. En este contexto, la química supramolecular ha contribuido con el diseño de quimiosensores

fluorescentes con capacidad de coordinarse específicamente a un analito de interés y de expresarlo mediante una señal fluorométrica, ya sea por apagamiento o incremento en la intensidad de emisión, o bien por desplazamiento de la banda en el espectro. Esto no solo permite detectar la presencia del analito sino también abre la posibilidad de llevar a cabo determinaciones cuantitativas.

Los quimiosensores fluorescentes clásicos están compuestos fundamentalmente de una unidad receptora (con afinidad al analito de interés) y una unidad indicadora (fluoróforo), separadas por un grupo espaciador. Sin embargo, un tipo novedoso de quimiosensores, denominados *bis*-cromofóricos, están formados por dos fluoróforos idénticos unidos a través de una cadena de interconexión con capacidad de establecer alguno o varios tipos de fuerzas intermoleculares como pueden ser: puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, enlace de coordinación, entre otras. Este tipo de compuestos puede formar dímeros intramoleculares por asociación de los grupos aromáticos y emitir, además de la señal propia del fluoróforo monomérico, un tipo particular de fluorescencia denominada emisión de excímero (del inglés *excited dimer*). El reconocimiento del analito puede seguirse por el cambio en la intensidad de emisión de excímero o el cambio en la relación de intensidades monómero-excímero, este último denominado respuesta radiométrica.

Recientemente, el grupo de investigación en Química Supramolecular del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora (QS-DIPM-USON) reportó una serie de ligantes *bis*-cromofóricos derivados de pireno (**1-6**, Figura 1) los cuales se caracterizan por su alta solubilidad en agua así como su intensa emisión de fluorescencia. Los compuestos **1-6** presentan bandas de emisión características tanto de monómero como de excímero de pireno, las cuales son sensibles a cambios de pH y a la presencia de cationes metálicos y moléculas orgánicas. (Machi y col., 2009; Pérez-González y col., 2011)

En un estudio previo realizado por el grupo de QS-DIPM-USON se encontró que, en solución acuosa y a pH=11, el ligante **1** forma un complejo de inclusión con histamina. A dicho pH, la molécula **1** tiene una conformación en la cual los pirenos están apilados (conformación tipo pinza). La complejación ocurre por intercalación de la histamina entre los grupos aromáticos altamente hidrofóbicos del receptor, lo cual provoca una respuesta radiométrica de la fluorescencia. (Cariño, 2004)

Un estudio más reciente realizado por el mismo grupo de trabajo demostró que a un pH cercano al fisiológico (7.5 a 8.5) el compuesto **2** presenta una conformación tipo pinza con los

grupos pireno muy próximos entre sí y exhibe un máximo en la intensidad de emisión de excímero. (Machi y col., 2009) Con base en lo anterior, en este trabajo de tesis se plantea llevar a cabo un estudio de reconocimiento molecular de histamina con el ligante fluorescente **2** (que a partir de este punto se designará (dtpa1py)<sub>3</sub> bajo condiciones de pH fisiológico (pH=7.2).

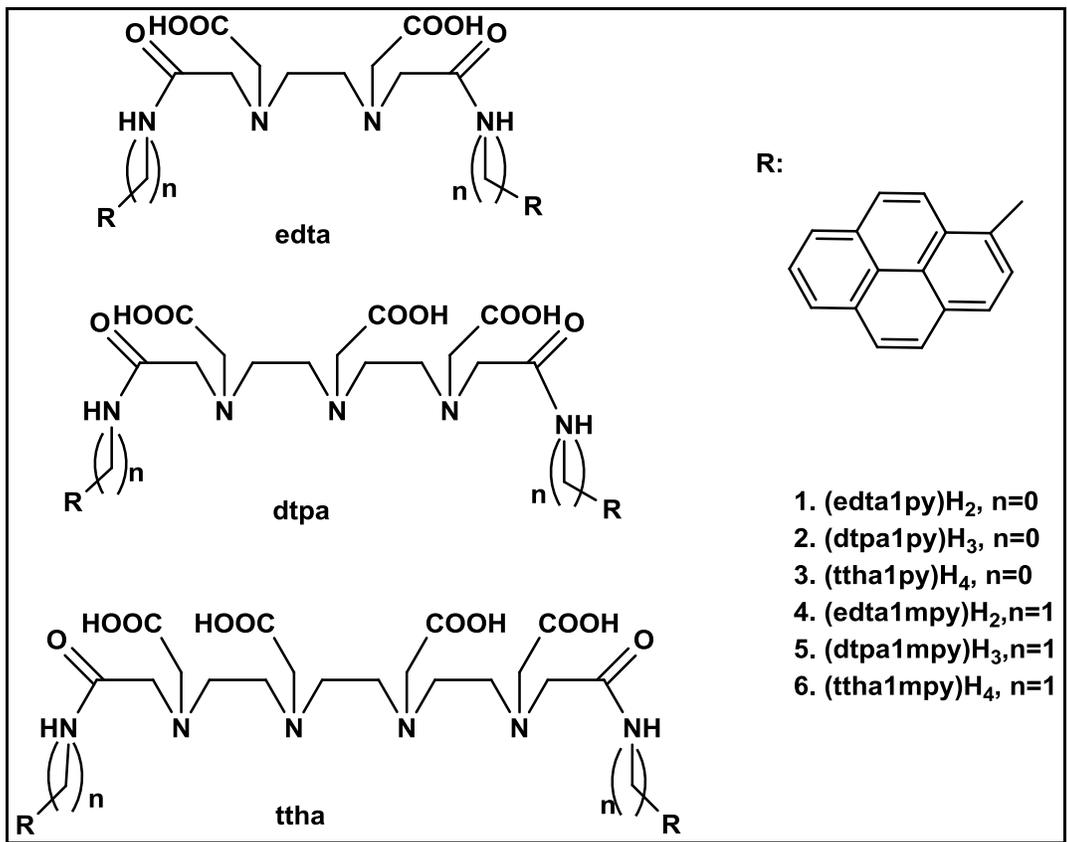


Figura 1. Ligantes bis-cromofóricos derivados de pireno.

En el estudio se incluyeron un conjunto de moléculas huésped estructuralmente relacionadas con histamina como son L-histidina, triptamina, L-triptófano, fenetilamina e imidazol (Figura 2) con el propósito de establecer las fuerzas de enlace principales que rigen la estabilidad de los complejos (hidrofóbica, electrostáticas, etc.). El desarrollo de este estudio bajo condiciones fisiológicas tiene como objetivo investigar la posibilidad de utilizar este tipo de ligantes para detectar los niveles de estas moléculas en el organismo.

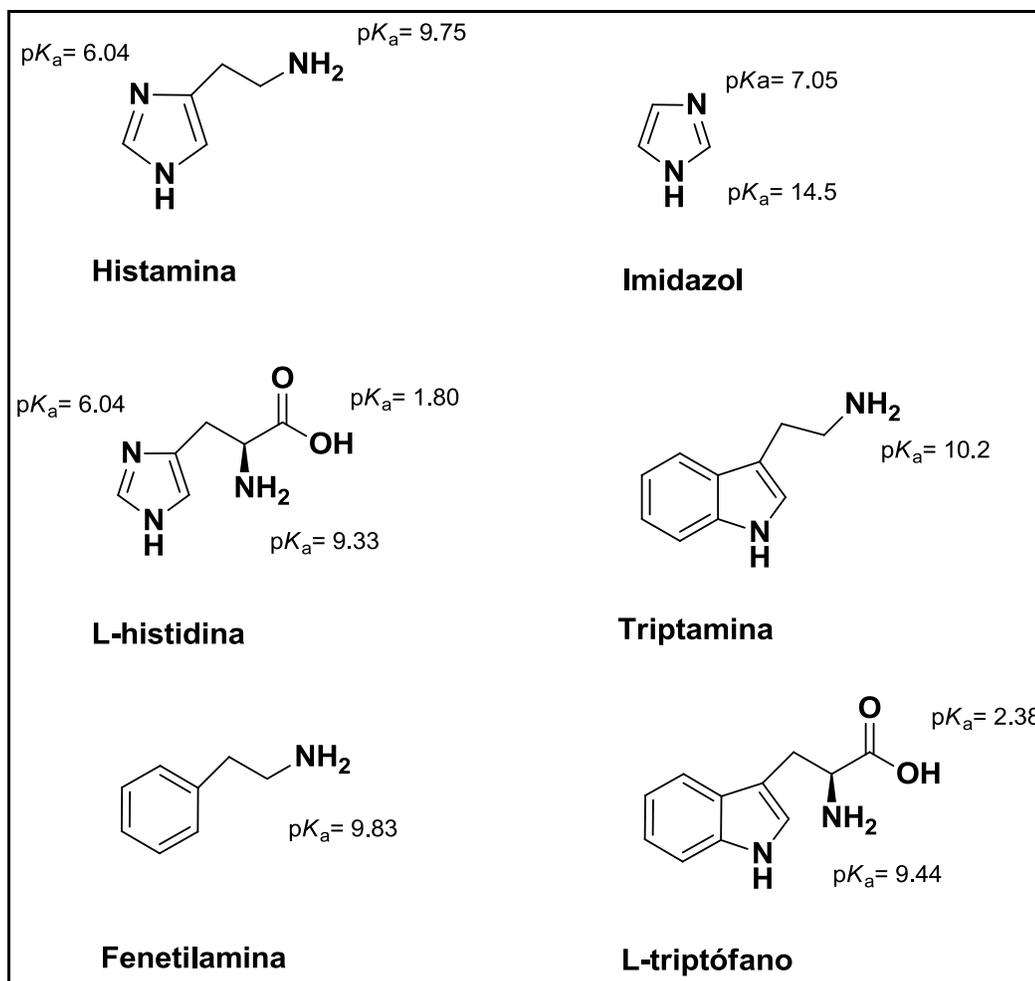


Figura 2. Estructura química y valores de  $pK_a$  de las moléculas huésped incluidas en este estudio.

## ANTECEDENTES

### Importancia de las Aminas Bioactivas y Compuestos Relacionados

Las aminas bioactivas tienen un papel fundamental en los seres vivos. Algunas aminas aromáticas tienen actividad a nivel biológico y su disminución o aumento en los organismos se relaciona con algunas enfermedades. En la figura 2 se muestran las estructuras de algunas aminas bioactivas y de aminoácidos estructuralmente relacionados cuyas funciones y propiedades biológicas se resumen a continuación.

Una de las aminas de gran importancia es la dopamina, la cual es un neurotransmisor del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad así como en la comunicación neuroendocrina. Se ha encontrado una implicación de dopamina en enfermedades como Parkinson, esquizofrenia y epilepsia. (Bahena, 2000)

Otra amina relevante a nivel biológico es la histamina la cual tiene diversas funciones como son la inducción de la contracción del músculo liso intestinal y la vasodilatación, además de ser un neuromodulador y un modulador de la respuesta inmune, de la respuesta alérgica inmediata y de la inflamación, tanto en condiciones normales como patológicas. Si bien ninguna enfermedad del SNC está asociada específicamente con alteraciones en la transmisión histaminérgica, se ha involucrado a la histamina en varios procesos patológicos como son: (1) La epilepsia, en la cual la inhibición de la activación del sistema histaminérgico aumenta las crisis compulsivas; (2) La enfermedad de Parkinson, la cual cursa con un aumento de la transmisión histaminérgica mediada por RH3 en los ganglios basales; (3) Alteraciones del ciclo vigilia-sueño, en las cuales la histamina induce el estado despierto mediante acciones conjuntas de RH1 y RH2 en las neuronas talámicas de relevo y (4) La esquizofrenia en pacientes psicóticos, en los que se ha encontrado un aumento en los niveles del metabolito de la histamina, N-(*tele*)-metilhistamina. Además de todas las anteriores, enfermedades como el Alzheimer y la obesidad se han relacionado con alteraciones de la histamina. (Ramos y col., 2009)

La L-histidina es uno de los 20 aminoácidos esenciales, la cual juega un papel importante en el crecimiento y reparación de tejidos, así como en el control de la transmisión de

elementos metálicos en bases biológicas. La L-histidina es un aminoácido precursor de la histamina, posee una actividad anticonvulsionante y puede ser un adyuvante beneficioso para la terapia anticonvulsiva Sin embargo, una deficiencia en la actividad de la enzima histidinasa provoca una acumulación de histidina en sangre, orina y fluido cerebroespinal. Anomalías clínicas, incluyendo problemas de habla y retraso mental se han asociado a una histidinemia hereditaria. (Wade y Tucker, 1998; Chen y col., 2006)

El L-Triptófano es un aminoácido esencial cuya estructura corresponde a un ácido aromático indolpropiónico. La concentración del L-triptófano en el organismo es más baja que la de todos los aminoácidos lo cual puede desempeñar un papel limitante en la síntesis de proteínas. Es un precursor de una variedad de compuestos biológicamente activos, en la glándula pineal o epífisis se forma la serotonina por acción de la enzima triptófano hidroxilasa-1 (TPH-1), la cual es un neurotransmisor y participa como un factor trófico en la formación del cerebro. En esta glándula, la serotonina es precursor de otra molécula de alta actividad: la melatonina, una hormona que regula el sueño, y sincroniza la actividad de las células. Otra molécula de interés para la salud derivada del triptófano vía quinurenina es una vitamina, la niacina o vitamina B<sub>3</sub>, la cual engloba el ácido nicotínico, la nicotinamida y sus derivados metabólicos activos: nicotín adenín dinucleótido (NAD) y nicotín adenín dinucleótido fosfato (NADP). La niacina es necesaria, en el metabolismo de macronutrientes y la obtención de energía por las células (glucolisis, ciclo de Krebs, cadena respiratoria, etc.), reacciones de transaminación y desaminación de aminoácidos, la formación de urea, entre otras. Se han reportado enfermedades como el síndrome de eosinofilia maligna, enfermedades neurológicas y pulmonares relacionadas a bajo nivel de triptófano.(Sainio y col., 1996)

Otras aminas como la triptamina y la fenetilamina representan funciones importantes a nivel biológico, estas funcionan como neurotransmisores en el sistema nervioso central.(Feng y Kleinermanns, 2009; Yao y col., 2000)

### **Química Supramolecular**

La química es una ciencia de gran importancia y constante transformación que aporta las bases para la obtención de nuevas moléculas con mejores propiedades. En 1987, Donald Cram, Jean-

Marie Lehn y Charles Pedersen fueron galardonados con el premio Nobel de Química “por el desarrollo y uso de moléculas que presentan interacciones de estructura específica de alta selectividad”. Con este acontecimiento surge un nuevo campo emergente dentro de la química: la Química Supramolecular.(Martínez, 2005)

La química supramolecular se describe como “la química más allá de la molécula”, y es la encargada del estudio de sistemas que involucran agregados moleculares o iones unidos a través de interacciones no covalentes, como son interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, enlaces de coordinación, interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre otras.(Steed y col., 2007)

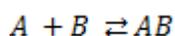
La química supramolecular se divide en dos áreas: química anfitrión-huésped (*host-guest chemistry*) y autoensamble (*self-assembly*) diferenciadas entre sí por el tamaño y la forma de las moléculas involucradas. En el área de la química anfitrión-huésped el anfitrión se define como una molécula orgánica o ion, cuyos sitios de unión convergen en el complejo. En algunos casos, el anfitrión posee una cavidad molecular la cual contiene sitios específicos de unión con el huésped los cuales se caracterizan por formar interacciones no-covalentes. Por otro lado, el huésped es una molécula o ion que presenta sitios de unión divergentes en el complejo.(Steed y col., 2007; Steed y col., 2009) Algunos ejemplos de complejos *anfitrión-huésped* incluyen sistemas biológicos como son las uniones enzima-sustrato así como complejos metal-ligante en donde los ligantes de mayor tamaño funcionan como “anfitriones” hacia cationes metálicos.

Por otra parte un anfitrión dentro del área de *autoensamble* es representado mediante una asociación espontánea y reversible de dos o más componentes formando uno de mayor tamaño unido a través de enlaces no-covalentes.(Steed y col., 2007; Steed y col., 2009)

### Titulaciones Espectrométricas

Cuando los compuestos A y B reaccionan de la forma 1:1 el complejo y todas las especies disueltas en solución alcanzan el equilibrio:

(1-1)



El complejo formado AB puede ser un complejo metálico (ML) o un complejo huésped-receptor (H-L); donde M= metal, L= ligante y H= huésped. Para la reacción dada por la ecuación 1-1, la constante de equilibrio está definida por

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

Donde, [AB], [A] y [B] son concentraciones molares, M (= mol dm<sup>-3</sup>). 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 está acompañada por un cambio en el espectro ya sea de A o B, la constante de formación puede ser determinada por los cambios espectrales de uno de sus componentes a una concentración constante mientras la otra varia. Algunos parámetros espectrales útiles son:

- a) Desplazamiento químico en RMN ( $\delta$ ).
- b) Absorbancia de una banda de absorción electrónica en el espectro UV-vis.
- c) Intensidad de la banda de emisión en el espectro de fluorescencia.
- d) Longitud de onda de la banda de emisión o absorción.

Cuando se observan los cambios espectrales en A variando la concentración de B, el parámetro espectral de A está relacionado 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  $j$ .

$I_A$ : valor de  $I$  correspondiente a A libre (en ausencia de B)

$I_{AC}$ : 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 reescribe por los cambios espectrales referidos al espectro de A en su estado libre:

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

Donde,  $D_j = I_j - I_A$  (1-7)

$$D_{AC} = I_{AC} - I_A \quad (1-8)$$

Las concentraciones de A y B en sus estados libres están dadas de la siguiente manera:

$$[A]_j = \left(1 - \frac{D_j}{D_{AC}}\right) [A]_t \quad (1-9)$$

$$[B]_j = [B]_{t,j} - \frac{D_j}{D_{AC}} [A]_t \quad (1-10)$$

Balance de masas para B:

$$(1-11)$$

$$[B]_j = [B]_j + [AB]_j$$

A partir de la sustitución de las ecuaciones 1-6, 1-9 y 1-10 en la ecuación 1-2 se obtiene la siguiente expresión para  $K_f$ :

$$K_f = \frac{D_j/D_{AC}}{\left\{1 - D_j/D_{AC}\right\} \left\{[B]_{t,j} - [A]_t A_j/D_{AC}\right\}} \quad (1-12)$$

Con base en esta ecuación básica (1-12), la constante de formación  $K_f$  puede obtenerse fácilmente, si se conocen los valores de  $I_A$  y  $I_{AC}$ . El valor de  $I_A$  suele ser igual al parámetro espectral observado a  $[B]_t=0$ , pero el valor de  $I_{AC}$  generalmente se desconoce.

Cuando el parámetro espectral  $I_j$  de A se observa por un cambio  $[B]_{t,j}$  a  $[A]_t$  constante, se obtiene una curva de titulación en la cual se representa un cambio en un parámetro espectral ( $D$  en ecuación 1-7) en función de  $[B]_t$ . Si existe una desviación sistemática del parámetro  $D$  en relación a la tangente al origen,  $K_f$  puede determinarse mediante el cálculo de mínimos cuadrados, en donde  $K_f$  y  $D_{AC}$  son tratados como parámetros desconocidos.

Esta técnica espectroscópica para determinar las constantes de formación se denomina a una titulación espectrométrica. El reactivo A o su señal espectral es denominada sonda mientras que el reactivo B es el valorante.

Existen dos metodologías para llevar a cabo las titulaciones espectrométricas: (1) Titulación en lotes y (2) Titulación continua. Cada una de ellas se explica de manera breve a continuación:

- (1) Titulación en lotes: Este método consiste en lo siguiente: a) Se preparan de manera individual un número determinado de soluciones con una  $[A]_t$  idéntica y concentraciones variables de  $[B]_t$ ; y b) Se determina un parámetro espectral  $I_j$  (o  $D_j$ ) para cada solución. La  $[A]_t$  debe ser constante para cada una de las muestras estudiadas, de forma tal que la ecuación 1-9 sea totalmente válida y pueda calcularse la  $K_f$ .
- (2) Titulación continua: Este tipo de titulación consiste en adicionar alícuotas de B en la solución A colocada en el recipiente de valoración. En este método  $[A]_t$  no es constante por lo que la ecuación 1-9 no es válida. La siguiente ecuación define a  $V_j$ , el volumen

total en la celda después de cada adición  $v_j$ , donde  $V_0$  es el volumen inicial de solución de A en la celda: (1-13)

$$V_j = V_0 + v \times j = V_0 + v_j$$

La concentración de cada especie en la solución  $j$  es representada de la siguiente manera:

$$[A]_{t,j} = \frac{V_0}{V_j} [A]_{t0} \quad (1-14)$$

$$[B]_{t,j} = \frac{v_j}{V_j} [B]_{t0} \quad (1-15)$$

$$[AB]_j = \frac{D_j V_0}{D_{AC} V_j} [A]_{t0} \quad (1-16)$$

Donde  $[A]_{t0}$  es la concentración inicial para la solución A en el recipiente, y  $[B]_{t0}$  representa la concentración de la solución stock de B.

La ecuación 1-10 se reescribe de la siguiente manera y la gráfica de  $D_j$  en función de  $v_j$  permite calcular la  $K_f$ :

$$K_f = \frac{D_j / D_{AC}}{(1 - D_j / D_{AC})([B]_{t0} v_j / V_j - [A]_{t0} D_j V_0 / D_{AC} V_j)} \quad (1-17)$$

### Interacciones Moleculares

Las interacciones moleculares constituyen la base de los procesos altamente específicos de reconocimiento, reactividad, transporte y regulación que se dan en sistemas biológicos, como la unión de un sustrato a una proteína receptora, las reacciones enzimáticas, el ensamblaje de complejos multiproteínicos, la asociación antígeno-anticuerpo, la lectura, transcripción y

traducción del código genético, la regulación de la expresión de los genes a través de las proteínas que se unen a ADN, la entrada de los virus a las células, la señal de inducción nerviosa que generan los neurotransmisores, el reconocimiento celular, etc. (Martínez, 2005)

En general, la química supramolecular diseña sistemas artificiales que presenten comportamientos de alta eficiencia y selectividad, lo cual requiere el perfecto dominio de las características energéticas y estereoquímicas de las fuerzas intermoleculares no-covalentes (interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, etc.) dentro de una arquitectura molecular definida. El término “no covalente” abarca una gran variedad de efectos de atracción y repulsión, lo cual implica un patrón bien definido que se establece en la complementariedad sustrato-receptor. (Steed y col., 2009)

A continuación se describirán algunas de las interacciones no covalentes:

### Puente de Hidrógeno

Un puente de hidrógeno se describe comúnmente como D-H-A en donde un átomo de hidrógeno, el cual está unido a un átomo de un elemento electronegativo D (por ejemplo O ó N), interacciona con otro átomo de un elemento electronegativo (A), el cual presenta pares de electrones libres (Figura 3). (Steed y col., 2009)

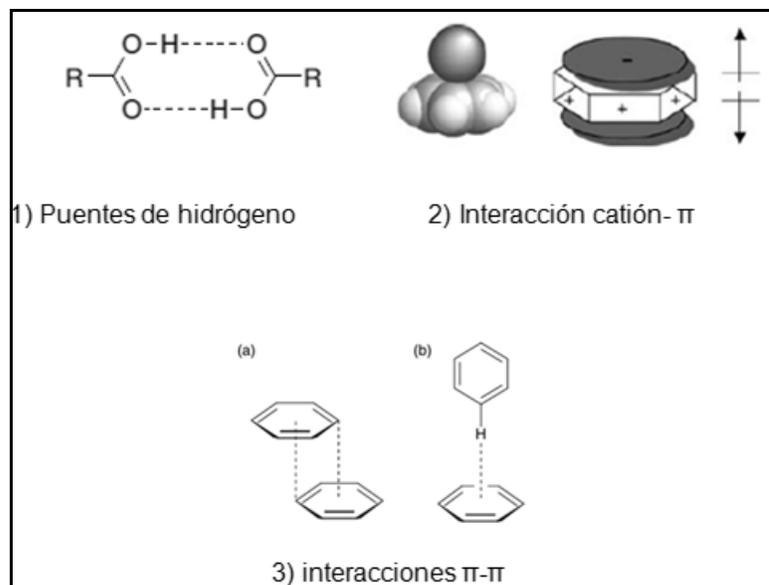


Figura 3. Interacciones no-covalentes: 1) puentes de hidrógeno; 2) Interacciones catión- $\pi$ ; 3) Interacciones  $\pi$ - $\pi$ : (a) cara a cara (face-to-face); (b) borde a cara (edge-to face).

### Interacciones $\pi$ - $\pi$ Aromáticas

Las dos principales interacciones  $\pi$  que podemos encontrar en sistemas supramoleculares son (1) interacción catión- $\pi$ , (2) interacción  $\pi$ - $\pi$ . Las interacciones catión- $\pi$  son conocidas en el campo de la química organometálica para los complejos olefínicos e hidrocarburos aromáticos como ferroceno y sales Zeise. La unión en cada complejo es fuerte y puede ser considerada como no covalente, siendo íntimamente ligado con los orbitales  $d$  parcialmente ocupado por los metales (Figura 3). (Steed y col., 2007; Steed y col., 2009)

El segundo tipo de interacciones  $\pi$  (las  $\pi$ - $\pi$ ) pueden ser: a) cara a cara (face-to-face) paralelo en sistemas aromáticos, en donde existe una interacción entre el centro de un anillo y la esquina del otro; b) borde a cara (edge-to-face) en donde un átomo de hidrógeno de uno de los anillos interacciona en una orientación perpendicular hacia el centro del otro anillo. Este tipo de interacción surge de la atracción entre las carga negativas de la nube del electrones  $\pi$  de un sistema conjugado y la carga positiva  $\sigma$  de la molécula vecina (Figura 3). (Steed y col.,2009; McMurry, 2005)

### Interacciones Electroestáticas

Las interacciones electrostáticas se encuentran clasificadas en tres categorías: (a) interacción ion-ion, (b) interacción ion-dipolo y (c) interacción dipolo-dipolo, las cuales están basadas en una atracción coulombica entre cargas opuestas (Figura 4). La interacción ion-ion representa la interacción más fuerte comparable con interacciones covalentes. Es un tipo de interacción denominada sin dirección, lo que quiere decir que suele ocurrir sin tener una dirección específica, la fuerza de interacción va a depender de las especies involucrada. En cambio en las interacciones ion-dipolo y dipolo-dipolo su orientación depende de la presencia de una alineación entre dos unidades en una dirección óptima. Las interacciones ion-dipolo comparadas con las dipolo-dipolo son de mayor fuerza (50-200 y 5-50 KJ mol<sup>-1</sup> respectivamente). (Steed y col., 2009)

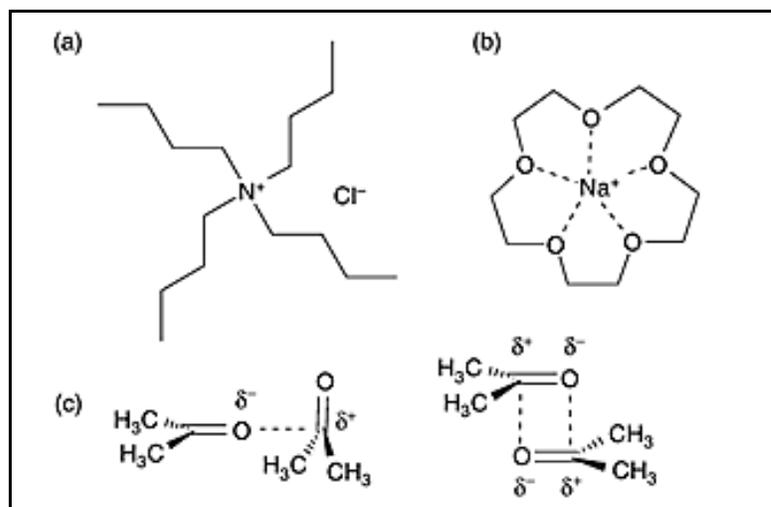


Figura 4. Interacciones electrostáticas: (a) interacción ion-ion, (b) interacción ion-dipolo, (c) interacción dipolo-dipolo.

### Quimiosensores Fluorescentes

El diseño de moléculas capaces de funcionar como sensores es fundamental para el desarrollo de nuevas técnicas de análisis químico, cuyas características como son la selectividad y la sensibilidad sean mayores a las presentadas por métodos convencionales. (Ávila, 2010)

Un sensor es un dispositivo que detecta o mide una propiedad física, registrando e informando cualquier tipo de cambio. Estos dispositivos permiten también detectar y cuantificar sustancias y reacciones químicas específicas. Su eficiencia se relaciona (1) con la selectividad de unión, (2) con la facilidad de detectar y medir señales obtenidas, (3) con la estabilidad y (4) con la reproducibilidad. (Ávila, 2010)

Por otro lado, un quimiosensor se define como una molécula de origen abiótico la cual puede unirse selectiva y reversiblemente al analito de interés con un cambio concomitante en las propiedades del sistema, como pueden ser el potencial redox, los espectros de absorción y/o fluorescencia, entre otros, detectando un límite muy bajo del analito. Los sistemas basados en cambios en la fluorescencia se denominan quimiosensores fluorescentes o fluoroionóforos. Debido a los diferentes procesos que ocurren durante la detección del analito, el reconocimiento molecular y la transducción de señales, los quimiosensores fluorescentes clásicos están

compuestos de una unidad receptora (ionóforo), una unidad indicadora (fluróforo) y una unidad espaciadora (Figura 5).(Prodi y col., 1999)

- Unidad receptora (ionóforo). Discrimina y se une específicamente a una molécula diana (analito). El éxito en la formación de un complejo selectivo receptor-analito dependerá del tamaño, forma y energía de unión de las moléculas que forman el complejo.(Fan et al., 2009)
- Unidad indicadora (fluróforo). Informa al analista que el reconocimiento ha ocurrido.
- Unidad espaciadora. Modula la interacción receptor-analito y transmite información a la unidad indicadora. (Fan y col., 2009)

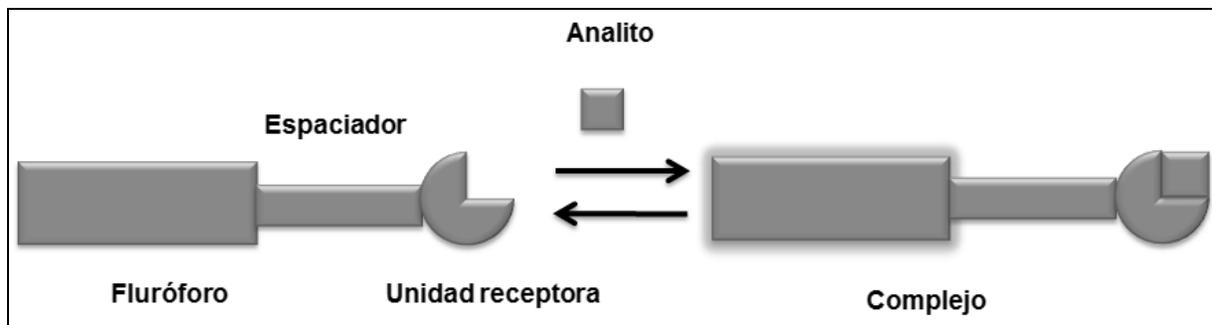


Figura 5. Representación gráfica de un quimiosensor fluorescente.

### Mecanismo de Funcionamiento de los Quimiosensores Fluorescentes

Existen varios mecanismos de operación de los quimiosensores fluorescentes, dentro de ellos se encuentran la transferencia de electrones fotoinducida (PET), la transferencia electrónica (EET), la formación de excímeros, formación de exciplexes, entre otros, los cuales han sido ampliamente estudiados y ampliamente utilizados en el diseño de quimiosensores.(Fan y col., 2009) A continuación se describen dos de ellos: el mecanismo PET y la formación de excímeros.

**Transferencia electrónica fotoinducida (PET).** Los sensores de transferencia electrónica fotoinducida se pueden clasificar en dos categorías 1) fluorescencia de encendido

(*turn-on*) 2) fluorescencia de apagado (*turn-off*). Para los sensores de fluorescencia encendido, los receptores contienen una energía relativamente alta no enlazante con el par de electrones. En la ausencia de analitos, este par de electrones apaga la emisión por la rápida transferencia intramolecular de electrones desde el receptor al fluoróforo excitado (Figura 6). Cuando este par de electrones coordina con cationes de ácidos de Lewis en solución el HOMO del receptor se reduce. Esto disminuye la fuerza impulsora del proceso PET deteniendo el evento activando así la fluorescencia del proceso (ver página 36). (Fan y col., 2009)

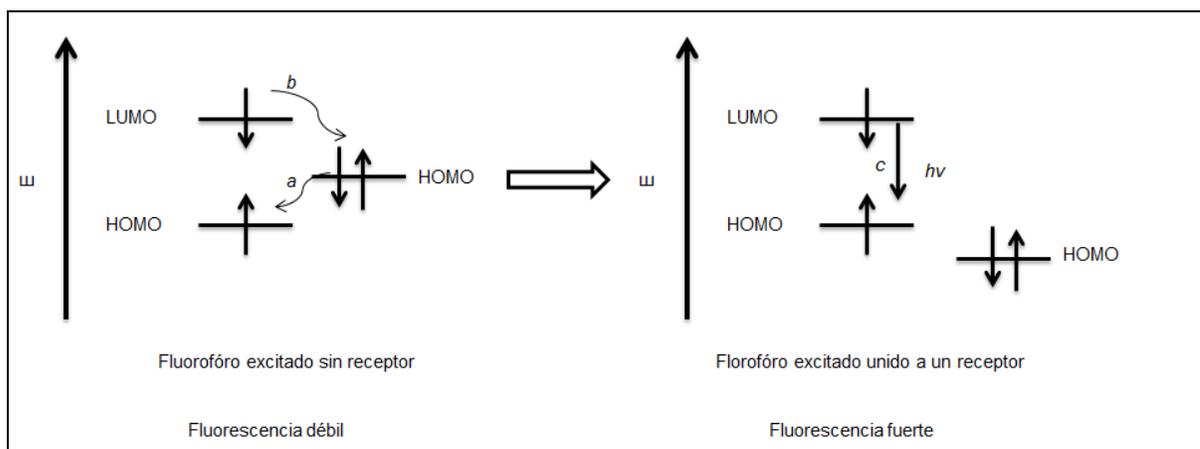


Figura 6. Diagrama de orbital de energía de fluorescencia para sensores PET antes y después de la unión de cationes a) transferencia de electrones hacia delante b) transferencia de electrones hacia atrás c) proceso de emisión de fluorescencia.

En algunos casos el receptor participa de manera indirecta en el proceso fotofísico. El nivel de energía LUMO está entre los niveles de energía del fluoróforo HOMO y LUMO, la unión de los cationes por el receptor proviene de un camino no radiactivo para activar la energía de excitación, el resultado de este proceso es el apagamiento de la emisión de fluorescencia. (Fan y col., 2009)

La diferencia entre estos, es que el proceso PET se lleva a cabo antes o después de la unión de cationes. Para el sensor encendido, en el proceso PET participan el LUMO y HOMO del fluoróforo, el HOMO del receptor antes de la unión del catión. Para el proceso PET apagado involucra el HOMO y LUMO del fluoróforo y el LUMO del catión después de la formación del complejo. (Fan y col., 2009)

Cuando los fluoróforos contienen dos fluoróforos idénticos interconectados a través de un espaciador con propiedades de coordinación se denominan bis-cromofóricos. La distancia entre los fluoróforos puede ser alterada con la formación de un complejo con el analito, lo cual puede facilitar (o cancelar) la formación de excímeros (dímeros de estado excitado) y de esta manera llevar a cabo el reconocimiento del analito monitoreando la señal de emisión característica de estas especies. Dos importantes ventajas de los sensores biscromofóricos son: 1) La sensibilidad del excímero a un cambio en el ambiente químico es mayor que la del cromóforo monomérico; 2) El cambio en la relación de intensidades monómero-excímero, denominado respuesta radiométrica, permite la auto calibración en aplicaciones prácticas (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). (Machi y col., 2009)

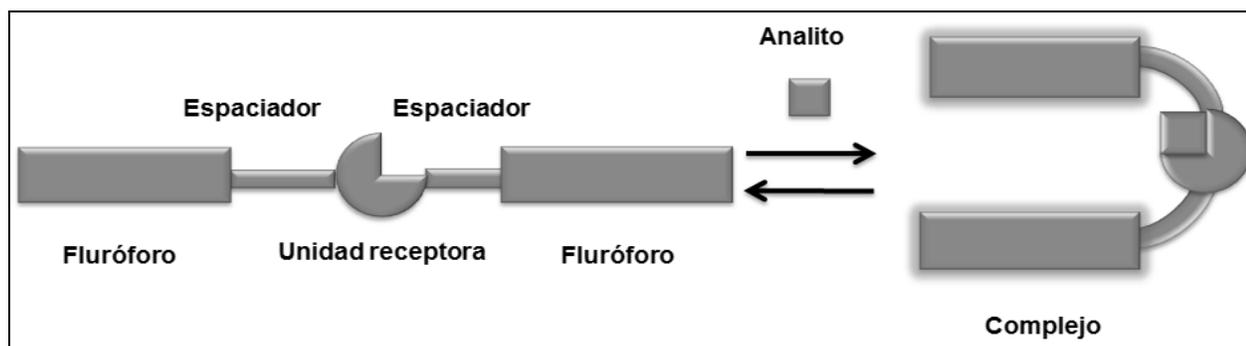


Figura 7. Representación gráfica de un quimiosensor fluorescente *bis*-cromofórico.

Existe una variedad de compuestos biscromofóricos reportados que contienen poliaminas lineales y poliéteres los cuales se componen de unidades terminales de naftaleno, pireno o antraceno (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) que funcionan como cromóforos. Especialmente, el pireno ofrece excelentes ventajas en el diseño de quimiosensores luminiscentes basados en la emisión de excímero, ya que presenta un alto rendimiento cuántico en la emisión de fluorescencia, un tiempo de vida largo en estado excitado y una formación eficiente de excímero comparada con otros cromóforos policíclicos. (Machi y col., 2009; Machi y col., 2006; Pérez-González y col., 2011)

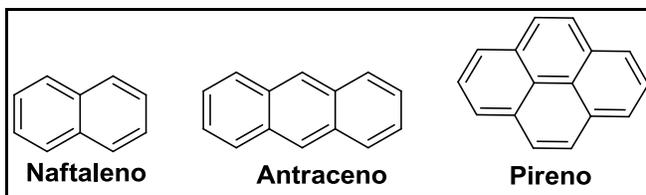


Figura 8. Estructura química de los compuestos policíclicos aromáticos naftaleno, antraceno y pireno.

Loreiro y col. (Lodeiro y col., 2007) reportaron la síntesis de dos sistemas biscromofóricos L1 y L2 derivados de la unión de dos unidades metil pireno al precursor de carbonilo 2,6 -bis (2-formilfenoximetil) piridina, así como el compuesto monofuncionalizado de referencia L3 (Figura 9).

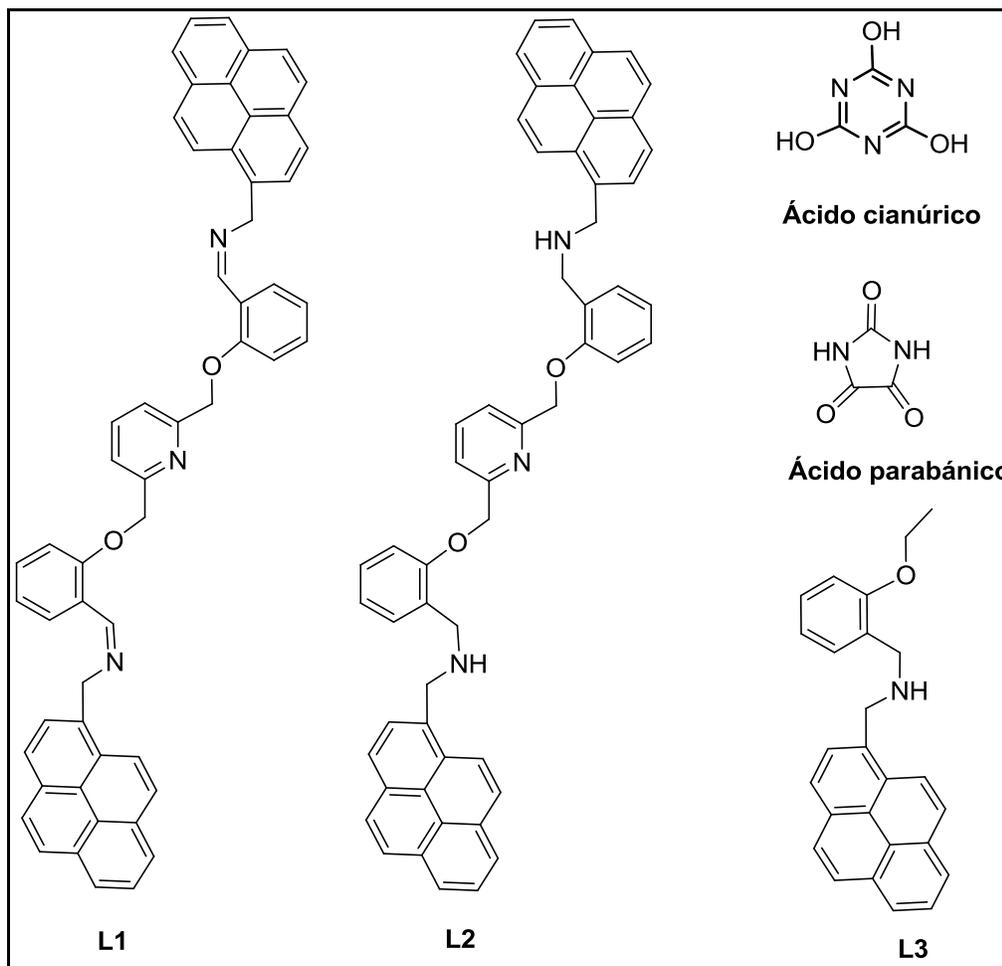


Figura 9. Ligantes biscromofóricos pireno-piridina L1 y L2 y compuesto de referencia L3, utilizados para el reconocimiento molecular de los ácidos cianúrico y parabánico.

En este estudio promueven interacciones anfitrión-huésped entre los complejos de Cu(II) y Zn(II) de los receptores L1 y L3 con moléculas específicas (ácido cianúrico y ácido parabánico). Las propiedades estudiadas se evaluaron en soluciones de agua-acetonitrilo como una función del pH en presencia de Zn(II) y Cu(II) así como ácidos barbitúricos, de las cuales resultaron las propiedades de emisión de fluorescencia, la cual mostró la formación de un excímero intramolecular. Estos compuestos son altamente sensibles al solvente así como a concentraciones de iones hidrógeno del medio, debido a ello existía una diferencia entre la proporción de monómero-excímero. El compuesto con una sola unidad de pireno L3 mostró la ausencia en la formación de excímero razón por la cual se utilizó como compuesto modelo. Los resultados globales de los compuestos determinaron movimientos moleculares, como la transferencia fotoinducida de electrones (PET) con un perfil de fluorescencia apagado-encendido-apagado (*off-on-off*), así como interacciones huésped-huésped con compuestos específicos así como la detección de metales iónicos. En el caso específico del compuesto L2 se encontró un perfil apagado-encendido en la emisión monómero-excímero, en donde la adición de iones metálicos no apagaba la fluorescencia, en cambio, al añadir ácido parabánico apagaba la emisión de excímero (Figura 9).(Lodeiro y col., 2007)

Yasuhiro Shiraishi y col. reportaron el comportamiento de la fluorescencia en solución acuosa de una molécula sencilla derivada de dietiléntriamina L (Figura 10) la cual contiene dos unidades terminales de pireno. La molécula L disuelta en agua muestra una fluorescencia dual que consiste en emisiones de monómero (376 nm) y excímero (centrada a 480 nm). La emisión de monómero muestra un perfil de fluorescencia “encendido- apagado” (*on-off*) en un rango de pH de 2 a 12 mientras que la emisión excímero presenta un perfil opuesto “apagado-encendido” (*off-on*) en el mismo rango de pH (Figura 10). Tras la adición de acetronitrilo a distintas concentraciones (5%, 10% y 50%) el perfil de fluorescencia de monómero se conserva sin embargo el perfil de excímero varía. La emisión de excímero se forma por fotoexcitación intramolecular del dímero en su estado fundamental. Los autores asocian el aumento de la intensidad del excímero al aumentar el pH a la flexión de la cadena de poliamina impulsada por la desprotonación de los átomos de nitrógeno, lo cual aumenta la estabilidad del dímero. (Shiraishi y col., 2007)

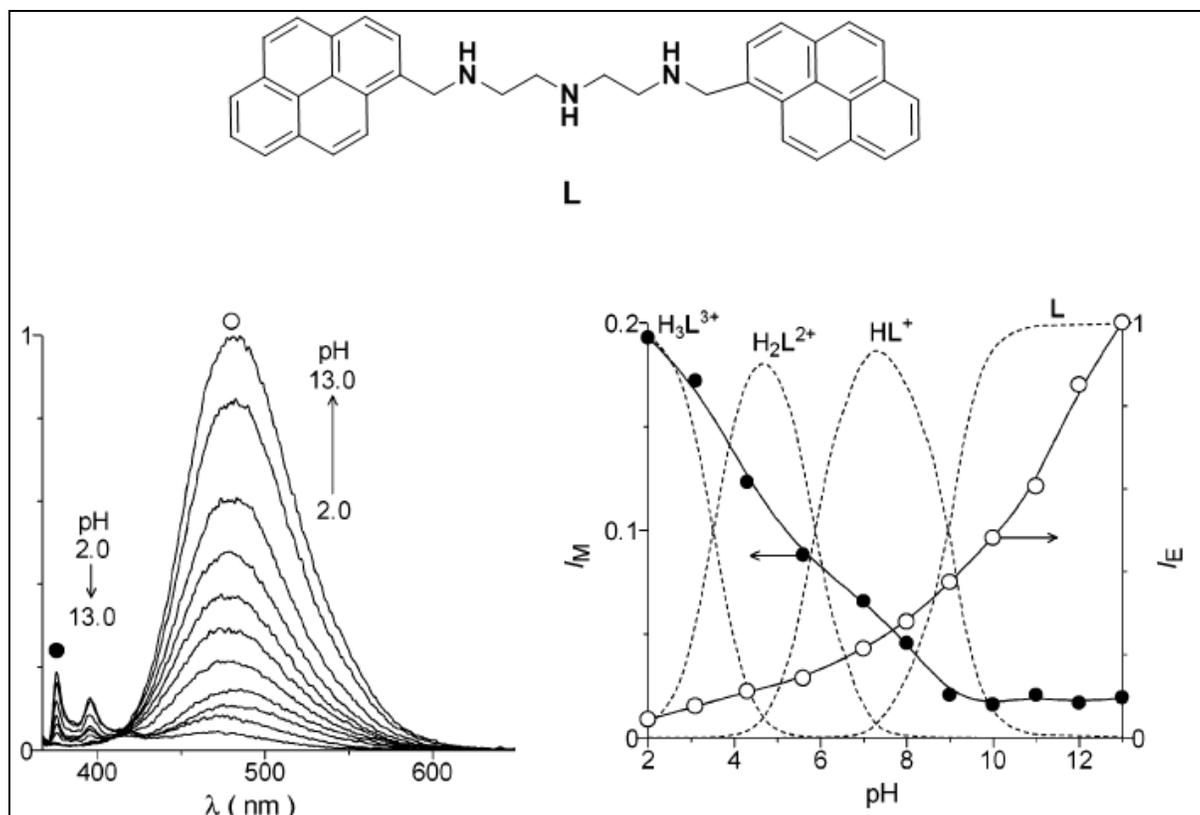


Figura 10. Dependencia de la fluorescencia en función del cambio de pH ( $\lambda_{exc}$  340 nm, 298 K) de L en solución acuosa.

### Quimiosensores Fluorescentes de Histamina

En los últimos años se han reportado diversos sensores moleculares fluorescentes diseñados para la detección de histamina y de su precursor, el aminoácido histidina. (Hortalá y col., 2010) Algunos de estos sensores están basados en complejos de Cu(II) y Zn(II) de porfirinas modificadas, a los cuales se enlaza el grupo imidazol de las moléculas vía interacciones metal-ligante. Otro tipo de sensor fluorescente de histamina reportado está basado en lo que se denomina quimiosensor conjunto (del inglés: chemosensing ensemble) en donde un indicador fluorescente está unido a través de interacciones no covalentes con el receptor, el cual apaga su emisión. Cuando se añade el analito, éste desplaza al indicador, el cual se libera hacia la solución mostrando su fluorescencia por completo. Así, el reconocimiento se manifiesta por la aparición de la fluorescencia del indicador.

Dentro del grupo de investigación en Química Supramolecular del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora (QS-DIPM-USON) se ha encargado del diseño y la síntesis de ligantes de cadena abierta los cuales se caracterizan por presentar unidades aromáticas y grupos carboximetilo en su estructura. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran los ligantes biscromofóricos derivados de pireno **1-6** (Figura 1) los cuales se caracterizan por su alta solubilidad en agua así como su intensa emisión de fluorescencia. Los compuestos **1-6** presentan bandas de emisión características tanto de monómero como de excímero, las cuales son sensibles a cambios de pH y a la presencia de cationes metálicos. (Machi y col., 2009; Pérez-González y col., 2011)

QS-DIMP-UNISON, reportó recientemente la complejación de un *meta*-ciclofano (mcm) con histamina y aminas bioactivas análogas en medio acuoso. (Virues y col., 2009) El mcm posee una distribución asimétrica en sus grupos fenilo, los cuales generan un momento dipolo eléctrico local inducido por los grupos amida atraídos por la posición meta. Esta estructura y propiedades eléctricas generan una mejor capacidad de reconocimiento para moléculas específicas. Los huéspedes utilizados fueron seleccionados de aquellos compuestos que poseen anillo aromático y un brazo cargado positivamente como histamina, tiramina, fenetilamina y triptamina. Para comparación, en el estudio se incluyeron los aminoácidos relacionados histidina y fenilalanina, así como imidazol y ácido 4-aminobenzoico, ninguno de los cuales formó complejo con el ciclofano. Mediante estudios de RMN  $^1\text{H}$  se determinó que el grupo aromático de las aminas huésped es encapsulado dentro de la cavidad teniendo como resultado un solapamiento huésped-anfitrión en el orden: histamina < tiramina ~ fenetilamina < triptamina. Esta relación se correlaciona con la hidrofobicidad de los huéspedes, donde el anillo más hidrofóbico es insertado profundamente en la cavidad del anfitrión. Sin embargo, a pesar de que la triptamina es la que presenta mayor solapamiento, el complejo más estable obtenido fue con histamina quien presenta una menor hidrofobicidad respecto a los otros huéspedes. Otras fuerzas de enlace que estabilizan a los complejos además de la interacción hidrofóbica son: (1) la interacción electrostática entre los grupos pendientes  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$  del ciclofano y los brazos  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$  de los huéspedes y (2) la interacción dipolar. Los autores explican que la mayor estabilidad del complejo con histamina puede deberse a que el anillo de histamina posee un mayor momento dipolo eléctrico local, por lo tanto, la estabilidad de los complejos mcm se correlaciona con la magnitud de dicha propiedad de los huéspedes. (Virues y col., 2009)

Otro trabajo relacionado con la detección de histamina fue el desarrollado por la Q.B.C. Lillian Irene Mascareñas Cariño dentro del grupo de QS-DIPM-UNISON. En su tesis, la Q.B.C. Mascareñas llevó a cabo un estudio de reconocimiento molecular de histamina, dopamina, fenetilamina y tiramina en solución acuosa bajo diferentes condiciones de pH con el receptor  $(\text{edta1py})\text{H}_2$  (**1** en Figura 1), el cual formó complejos de inclusión con los huéspedes. De acuerdo con los valores de las constantes de asociación determinadas por fluorescencia, a  $\text{pH}=11$ , el complejo más estable es el que se forma con histamina. A dicho pH, la molécula del receptor tiene una conformación en la cual los pirenos están apilados y forman un dímero. La adición de histamina provocó una pérdida en la banda de emisión característica del dímero excitado (excímero) y un aumento en la emisión de monómero. (Figura A 1). Este efecto indica que la complejación de la histamina ocurre por intercalación entre los grupos pireno altamente hidrofóbicos. (Cariño, 2004)

Dentro del grupo de compuestos biscromofóricos derivados de pireno **1-6**, el derivado  $(\text{dtpa1py})\text{H}_3$  (**2** Figura 1) sobresale por presentar una máxima emisión de excímero en la región de pH fisiológico ( $\text{pH}=7.0-7.5$ ), (Figura 11), lo cual se atribuyó al apilamiento de los grupos pireno y la formación de una estructura tipo sandwich. Bajo estas condiciones de pH, el ligante **2** puede actuar como receptor de moléculas aromáticas para formar complejos de inclusión por apilamiento o intercalación entre los pirenos. La presencia de diversos grupos funcionales en el receptor (amina, amida y ácido carboxílico) abre la posibilidad de que se establezcan fuerzas de atracción adicionales (puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, etc.) que contribuyan a la estabilización de los complejos.

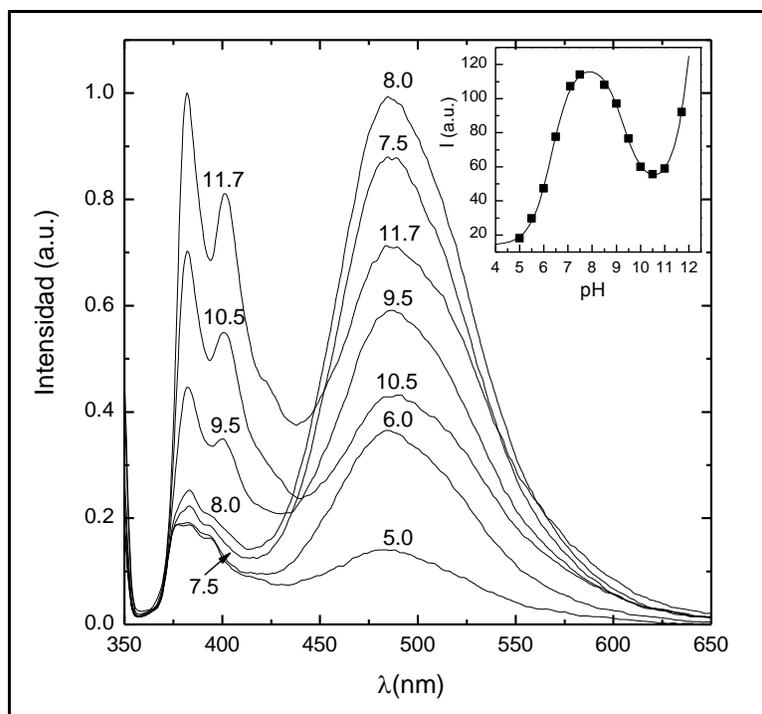


Figura 11. Espectros de emisión para el ligante (dtpa1py)H<sub>3</sub> en solución acuosa a distintos valores de pH. Las intensidades espectrales fueron normalizadas en el pico máximo del espectro más intenso. Longitud de onda de excitación,  $\lambda_{exc} = 342$  nm, a una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M. (Machi, et al., 2009)

## Técnicas Espectroscópicas

### Espectroscopia de Absorción Molecular Ultravioleta/Visible (UV-Vis)

La absorción de radiación ultravioleta o visible por especies moleculares provoca la excitación de los electrones enlazantes y como consecuencia, las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlace que existen en las especies de estudio. Existen varias aplicaciones de relevancia biológica en donde se utilizan técnicas de absorción Uv-Vis, por ejemplo para la determinación de la concentración de ciertas proteínas, moléculas importantes como NADH y ácidos nucleicos, ya que en la mayoría de los casos existe una relación directa entre el número de moléculas presentes y la absorción. Sin embargo, en la actualidad una de las más importantes aplicaciones de la espectroscopia de absorción UV-Vis es la determinación cuantitativa de los compuestos que tienen grupos absorbentes llamados cromóforos. (Skoog y Leary, 2008; Valeur, 2001 )

Los electrones que contribuyen a la absorción por una molécula orgánica son: (1) *electrones enlazantes*, que son aquellos que participan directamente en la formación del enlace entre átomos, entre los cuales encontramos a los sigma ( $\sigma$ ) y pi ( $\pi$ ); (2) *electrones no enlazantes* (n) o electrones que no participan en ningún enlace que están en gran parte localizados alrededor de átomos como oxígeno, halógenos, azufre y nitrógeno.

Las zonas entre los átomos que están ocupadas por electrones enlazantes se denominan *orbitales moleculares* y se pueden considerar como una superposición de orbitales atómicos. Cuando se combinan dos orbitales atómicos, aparece un *orbital molecular enlazante* de baja energía y un *orbital molecular antienlazante* de energía elevada. Los electrones de una molécula en el estado fundamental ocupan el primero de ellos.

Los orbitales moleculares asociados a los enlaces sencillos se designan como orbitales sigma ( $\sigma$ ) y los electrones correspondientes son los  $\sigma$ . El doble enlace en una molécula orgánica contiene dos tipos de orbitales moleculares; un orbital *sigma* ( $\sigma$ ) correspondiente a un par de electrones enlazantes y un *orbital molecular pi*  $\pi$  asociado a otro par. Además de los electrones  $\sigma$  y  $\pi$ , muchos compuestos orgánicos contienen electrones no enlazantes simbolizados n.

### **Niveles de Energía Moleculares y Transiciones Electrónicas**

Una transición electrónica consiste en la promoción de un electrón de orbital en estado fundamental a un orbital desocupado por la absorción de un fotón.

En la figura 12 se muestra un esquema simplificado de orbitales moleculares y se indican los cuatro tipos de transiciones electrónicas que pueden ocurrir en moléculas orgánicas. Cada uno de ellos se describe a continuación:

- Transición  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ . El electrón de una molécula en un orbital  $\sigma$  enlazante es excitado al correspondiente orbital antienlazante por absorción de la radiación. La energía necesaria para provocar una transición  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  es grande y corresponde a las frecuencias radiantes de la región ultravioleta de vacío.

- Transición  $n \rightarrow \sigma^*$ . Los compuestos saturados que contienen átomos con pares de electrones que no participan en los enlaces (electrones no enlazantes) generan transiciones  $n \rightarrow \sigma^*$ . Requieren menor energía que las del tipo  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ .
- Transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  y  $\pi \rightarrow \pi^*$ : En estos dos tipos de transiciones se basan la mayoría de las aplicaciones de la espectroscopia de absorción ya que las energías que se requieren para estos procesos producen picos de absorción dentro de una región espectral accesible (200-700 nm). Ambas requieren la presencia de grupos funcionales no saturados que aportan los electrones  $\pi$ . Es a estos centros absorbentes no saturados a los que se les aplica el término de cromóforos.

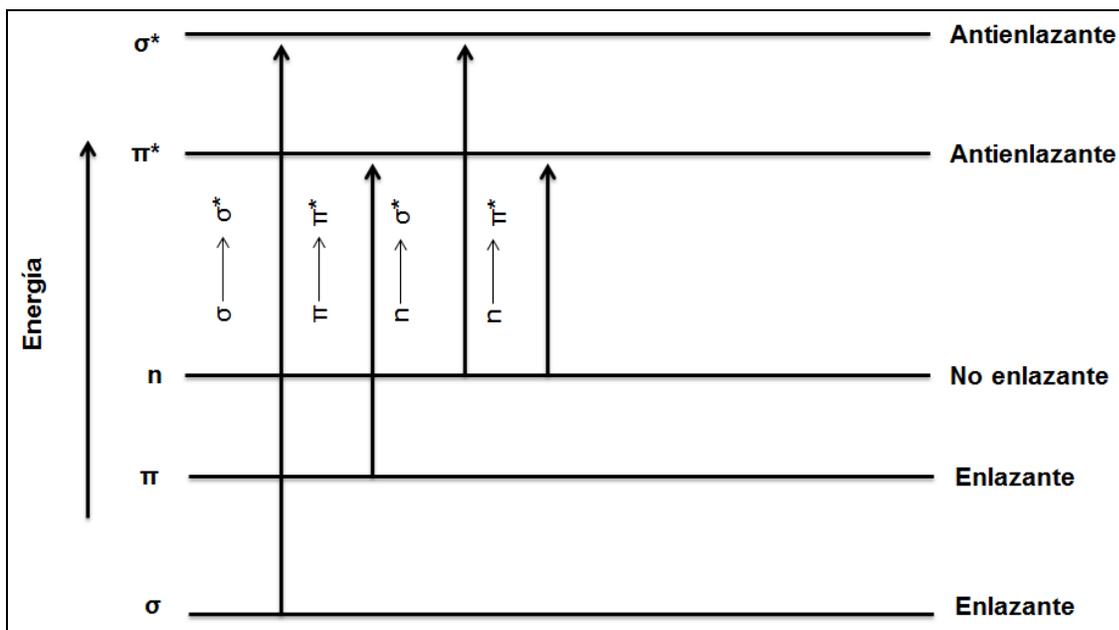


Figura 12. Niveles de energía molecular electrónica

La energía de estas transiciones electrónicas generalmente están en el orden:

$$n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$$

En la figura 13 se ilustran todas las posibles transiciones para formaldehído

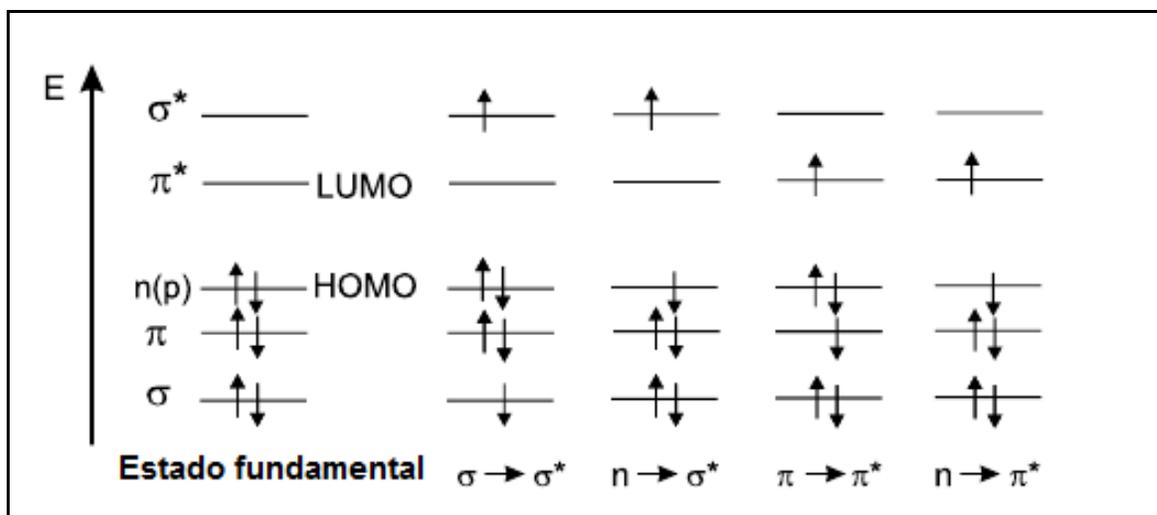


Figura 13. Transiciones electrónicas para formaldehído

En la espectroscopia de absorción y fluorescencia se consideran dos importantes tipos de orbitales: el orbital molecular ocupado más alto (HOMO) y el orbital molecular desocupado más bajo (LUMO). Ambos se encuentran en el estado fundamental. En la figura 13 se muestran las transiciones para formaldehído ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) donde el HOMO es el orbital  $n$  y el LUMO es el orbital  $\pi^*$ .

### Fluorescencia

La fluorescencia ha sido empleada como una herramienta muy versátil en campos como química analítica, bioquímica y biología celular. Se caracteriza por la emisión de un fotón en forma de transición radiante entre estados con el mismo número cuántico de espín. Normalmente todas las especies emiten radiación a longitudes de onda mayores que la empleada para la excitación. La variación en la intensidad de la fluorescencia tras el proceso de coordinación ha sido comúnmente utilizada como señal de respuesta en sensores moleculares. (Skoog, 2008; Valeur, 2001)

La fluorescencia y la fosforescencia son dos tipos de métodos ópticos relacionados entre sí. En todos ellos, las moléculas del analito son excitadas dando una especie cuyo espectro de emisión suministra información para el análisis cualitativo y cuantitativo.

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Cuando un par de electrones ocupan el estado basal electrónico y tienen espines apareados (diamagnético), se dice que están en un estado de *singlete fundamental* (Figura 14). La absorción de un fotón promueve uno de los electrones de un estado de singlete fundamental a uno de *singlete excitado*. La emisión de un fotón desde el estado singlete excitado al estado de singlete fundamental se le conoce como fluorescencia. Las transiciones electrónicas responsables de la fluorescencia no implican un cambio en el espín del electrón, como consecuencia, la fluorescencia tiene una vida corta cesando la luminiscencia casi inmediatamente ( $10^{-5} - 10^{-8}$  s). Sin embargo, en algunos casos el estado de singlete fundamental es convertido a un estado de *triplete* donde los espines de los electrones se han desapareado y están por lo tanto paralelos (paramagnéticos), la emisión de un estado de triplete a un estado de *singlete fundamental* se le conoce como fosforescencia. El tiempo de vida media de un estado excitado triplete puede oscilar desde  $10^{-4} - 10^4$  s.

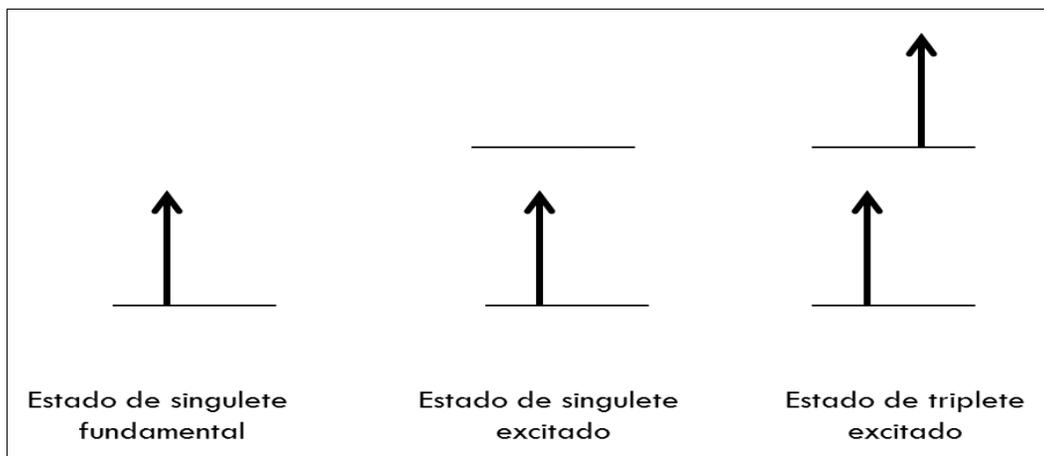


Figura 14. Diferentes estados de excitación

En la figura 15 se muestra un diagrama parcial de niveles de energía para las moléculas fotoluminiscientes conocido como diagrama de Jablonski. La línea horizontal gruesa más baja representa la energía del estado fundamental de la molécula, el cual es normalmente un estado singlete y se designa como  $S_0$ . Las líneas gruesas superiores son niveles de energía de los estados vibracionales fundamentales de los tres estados electrónicos excitados. Estados electrónicos singlete primero ( $S_1$ ) y segundo ( $S_2$ ) y primer estado electrónico triplete ( $T_1$ ).

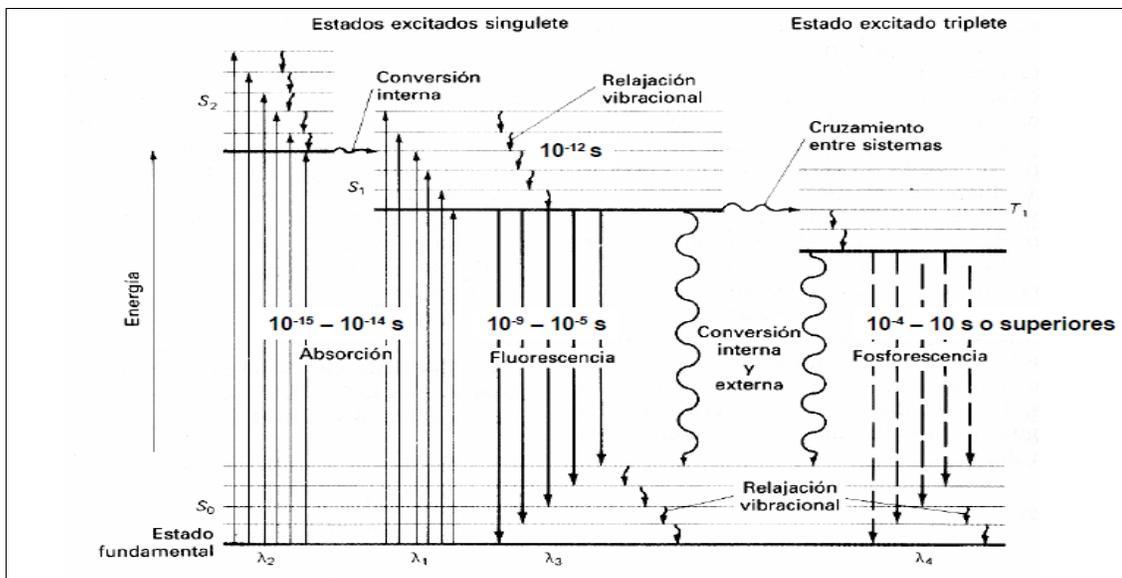


Figura 15. Diagrama de Jablonski.

Además de los procesos de desactivación radiativos (fluorescencia y fosforescencia), pueden ocurrir procesos de desactivación no-radiativos como son la relajación vibracional, conversión interna y externa y el cruzamiento entre sistemas. Mediante la relajación vibracional una molécula puede promocionar a cualquiera de los diversos niveles vibracionales durante un proceso de excitación electrónica. Sin embargo, el exceso de energía vibracional se pierde como consecuencia de colisiones entre moléculas de las especies excitadas y del disolvente. Este proceso es tan efectivo ya que el tiempo de vida media de una molécula excitada vibracionalmente es sólo  $10^{-12}$  s o menos. Una consecuencia de su eficacia es que la banda fluorescente para una transición dada se desplaza hacia frecuencias menores o longitudes de onda más largas respecto a la banda de absorción denominado desplazamiento de Stokes (Figura 16).

La conversión interna describe procesos intermoleculares por los que una molécula pasa a un estado electrónico de más baja energía sin emisión de la radiación. Es particularmente eficaz cuando los niveles de energía electrónicos están lo suficientemente próximos para que exista un solapamiento de los niveles de energía vibracional. En cambio, durante la conversión externa existe una desactivación de un estado electrónico excitado que puede implicar interacción y transferencia de energía entre la molécula excitada y el disolvente u otros solutos.

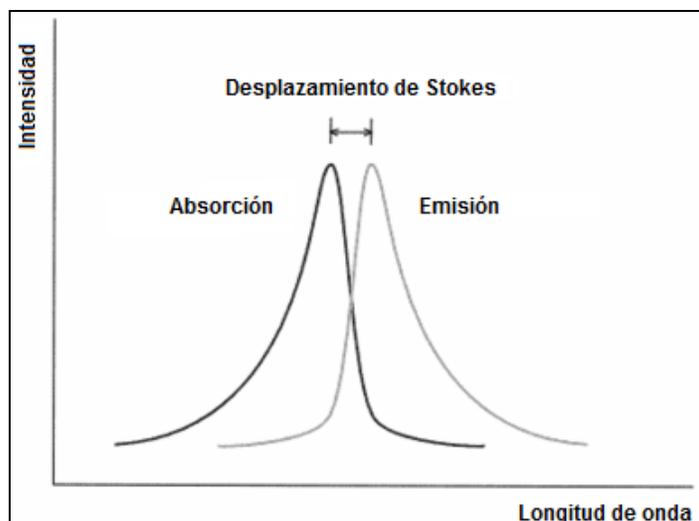


Figura 16. Desplazamiento de Stokes

El cruzamiento entre sistemas es un proceso en que el espín de un electrón excitado se invierte y da lugar a un cambio en la multiplicidad de la molécula, la probabilidad de esta transición aumenta si los niveles vibracionales de los dos estados se solapan. El cruzamiento es más usual entre las moléculas que contienen átomos pesados como el yodo o el bromo.

### Tipos de Transición en Fluorescencia

La fluorescencia rara vez es el resultado de la absorción de la radiación ultravioleta de longitudes de onda menores de 250 nm, ya que tal radiación es lo suficientemente energética como para producir desactivación de los estados excitados por predisociación y disociación. Como consecuencia la fluorescencia no se presenta por transiciones  $\sigma^* \rightarrow \sigma$ , este tipo de emisión se restringe a los procesos menos energéticos  $\pi^* \rightarrow \pi$  y  $\pi^* \rightarrow n$ .

Los espectros fotolumincentes son de dos tipos:

- 1) Espectros de excitación: Son la distribución de varias transiciones del nivel vibracional  $S_1$  a varios niveles  $S_0$ . Se obtienen midiendo la intensidad luminiscente a una longitud de onda de emisión fija mientras se varía la longitud de onda de excitación.
- 2) Espectros de emisión: implican la excitación a una longitud de onda fija mientras se registra la intensidad de emisión como función de la longitud de onda.

## Factores que Afectan la Fluorescencia

La posición del máximo de fluorescencia puede verse afectada por cambios en la estructura molecular, ya que estos implican cambios en las energías de los estados fundamental y excitados. Además el disolvente juega un papel importante en la posición espectral y la intensidad de las bandas de fluorescencia. La excitación viene acompañada de una transición electrónica que implica un cambio en el momento dipolar de la molécula. El efecto es más común cuando pasamos de un disolvente menos polar a uno más polar, observándose cambios en la  $\lambda$  de emisión con la variación de la polaridad del disolvente. Además los factores anteriormente mencionados se presentan los siguientes:

- Rendimiento cuántico. Definido como una relación entre el número de moléculas que emiten luminiscencia respecto al número total de moléculas excitadas. Para las moléculas altamente fluorescentes la eficacia cuántica se aproxima a una unidad. Las especies químicas que no son fluorescentes de manera apreciable tienen eficacias que se aproximan a cero.
- Fluorescencia y estructura. Los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar también fluorescencia; la mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en solución. La sustitución en el anillo bencénico provoca desplazamientos en la longitud de onda de los máximos de absorción. Además la sustitución afecta la eficacia de la fluorescencia.

La influencia de la sustitución de halógenos disminuye la fluorescencia por el efecto conocido como “efecto de átomo pesado”, el cual aumenta la probabilidad de cruzamiento intersistemas hacia el estado de triplete. Una sustitución de un ácido carboxílico o de un grupo carbonilo en un anillo aromático generalmente inhibe la fluorescencia.

- Efecto de la rigidez estructural. La fluorescencia es particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas. La influencia de la rigidez también tiene importancia en el aumento de la fluorescencia de ciertos quelantes orgánicos cuando están formando un complejo con un ion metálico. La falta de rigidez de una molécula produce probablemente

un aumento de la velocidad de conversión interna y consecuente aumento en la probabilidad de desactivación sin radiación.

- Temperatura y efecto del disolvente. La eficacia cuántica de la fluorescencia disminuye en muchas moléculas con el aumento de la temperatura, ya que provoca un aumento en la frecuencia de colisiones a temperatura elevada lo que a su vez aumenta la probabilidad de desactivación por conversión externa. Una disminución en la viscosidad del disolvente aumenta la probabilidad de conversión externa.
- La fluorescencia de una molécula también disminuye en presencia de disolventes que contienen átomos pesados o de solutos con tales átomos en su estructura. En estos casos, las interacciones orbital espín desembocan en un aumento de la velocidad de formación de triplete.
- Efecto del pH. La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión son probablemente diferentes para la forma ionizada y no ionizada del compuesto. Los cambios en la emisión provienen del número de especies resonantes diferentes que están asociadas con formas ácidas y básicas. La explicación de ésta discrepancia es que la constante de disociación ácida para la molécula excitada difiere de la misma especie en el estado fundamental.
- Efecto del oxígeno disuelto. La presencia de oxígeno disuelto a menudo reduce la intensidad de fluorescencia de una disolución. Este efecto suele ser resultado de una oxidación inducida fotoquímicamente de las especies fluorescentes; sin embargo, con más frecuencia tiene lugar una atenuación (*quenching*) como consecuencia de las propiedades paramagnéticas del oxígeno molecular el cual provoca cruzamientos entre sistemas y conversiones de las moléculas excitadas al estado de triplete.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño y la síntesis de sondas fluorescentes basadas en pireno han sido objeto de estudio en los últimos 20 años. El alto rendimiento cuántico en la emisión de fluorescencia, así como un largo tiempo de vida en estado de singulete excitado y su habilidad en la formación de excímeros moleculares son algunas de las características que hacen a pireno uno de los cromóforos más utilizados en la construcción de quimiosensores fluorescentes para una importante variedad de especies químicas. (Pérez-González y col., 2011)

En los últimos años, el grupo de QS-DIPM-USON ha reportado una serie de ligantes de cadena abierta derivados de los ácidos poliaminopolicarboxílicos edta, dtpa y ttha, funcionalizados con grupos pireno terminales (Figura 1). (Machi y col., 2009; Pérez-González y col., 2011) Dentro de este grupo de compuestos se encuentra el ligante (dtpa1py) $H_3$  (**2**, Esquema I). Las características que destacan a este ligante son su solubilidad en agua relativamente alta (aprox. 0.5 mmol Kg<sup>-1</sup> en solución básica) (Machi, et al., 2009), así como su intensa emisión de fluorescencia. Los espectros de emisión de (dtpa1py) $H_3$  en solución acuosa presentan las bandas típicas de excímeros de pireno a 484 nm además de picos agudos característicos de unidades monoméricas de pireno entre 379 y 395 nm (Figura 11). (Machi y col., 2009) A pH~8, el compuesto exhibe un máximo en la intensidad de excímero, lo cual se atribuye a la predominancia de la especie monoprotónada LH<sup>2-</sup> (donde L representa al ligante totalmente desprotonado), la cual contiene a los tres grupos carboximetil en su forma ionizada (-CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>) y al grupo amino central de la unidad dtpa en su forma protonada. La formación de puentes de hidrógeno intramoleculares mantiene a la especie LH<sup>2-</sup> en una conformación tipo pinza con los grupos pireno apilados y muy próximos entre sí (Figura A 1) (Pérez-González y col., 2011)

Se considera que la asociación de los grupos pireno en la especie LH<sup>2-</sup> de (dtpa1py) $H_3$  ocurre mediante interacciones hidrofóbicas y de tipo  $\pi$ - $\pi$ . Bajo estas condiciones (que son las que prevalecen al pH seleccionado para este trabajo de tesis, pH=7.2), el ligante puede actuar como un receptor tipo pinza de diferentes tipos de moléculas y formar complejos sustrato-receptor en solución acuosa, estabilizados por interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y/o de tipo  $\pi$ - $\pi$ .

Con base en lo anterior, el presente trabajo plantea llevar a cabo un estudio de complejación de histamina y compuestos análogos con el ligante  $(dtpa1py)H_3$  bajo condiciones de pH fisiológico (pH=7.2). Las moléculas huésped seleccionadas para este estudio son histamina, L-histidina, triptamina, L-triptófano, fenetilamina e imidazol (Figura 2). Bajo las condiciones de pH del estudio y de acuerdo con los  $pK_a$  de los huéspedes (Figura 2), éstos se encontrarán ya sea en su forma catiónica (histamina, triptamina y fenetilamina), zwitteriónica (L-histidina y L-triptófano) o neutra (imidazol), por lo que se espera que se establezcan diferentes interacciones que rijan la estabilidad de los complejos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

El ligante (dtpa1py) $H_3$  fue sintetizado previamente por el grupo de QS-DIMP-UNISON.(Machi y col., 2009; Pérez-González y col., 2011) El compuesto fue proporcionado para la realización de este trabajo por la Dra. Lorena Machi. El resto de las sustancias son comerciales y se enlistan a continuación:

- Histamina dihidrocloruro ( $C_5H_9N_3 \cdot 2HCl$ ), 99% 246557 marca Sigma.
- L-Histidina monohidrato monohidrocloruro ( $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$ ), 97% H15403 marca Aldrich
- Imidazol ( $C_3H_4N_2$ ), 99% 1202 marca Sigma-Aldrich.
- L-triptófano ( $C_{11}H_{12}N_2O_2$ ), T90204 marca Sigma-Aldrich.
- Triptamina ( $C_{10}H_{12}N_2$ ), 99% 246557 marca Aldrich.
- Feniletilamina hidrocloruro ( $C_8H_{11}N \cdot HCl$ ), 99% 77905 marca Sigma.
- Carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ), A258892 marca Merck.
- Hidróxido de sodio (NaOH), 98% 3722-01 marca J. T. Baker
- Buffer MOPS, 99% M1254 marca Sigma.

### Técnicas Espectroscópicas y Equipo de Laboratorio

#### Obtención de los Espectros de Absorción y Emisión de los Huéspedes

Para establecer si los huéspedes propuestos absorben a la longitud de onda de excitación que se utilizó en este estudio ( $\lambda_{exc}=342$  nm) se obtuvieron los espectros UV-Vis de las moléculas a pH=7.2 (buffer MOPS [0.01 M]) y diferentes concentraciones. Se prepararon soluciones madre con una concentración de 30 mM y se realizaron diluciones con las siguientes concentraciones:  $1 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M; los espectros se obtuvieron comenzando con la solución más diluida. De igual manera, una vez obtenidos los espectros de absorción, se verificó que las moléculas no emitan a la longitud de onda de emisión de

excímero del receptor (390 nm) al ser excitadas a 342 nm. Los espectros de emisión fueron obtenidos con soluciones de concentraciones en el intervalo  $1 \times 10^{-5}$  M -  $1 \times 10^{-4}$  M preparadas en buffer MOPS (pH=7.2).

### **Estudios de Complejación Molecular**

Para conocer el efecto de la formación de complejos moleculares en la fluorescencia del receptor, se llevaron a cabo titulaciones espectrofotométricas a temperatura y pH constantes (25 °C, pH=7.2, buffer MOPS). Se colocaron en la celda del espectrofluorímetro 3 mL de solución del ligante (L) a la concentración apropiada y se agregaron alícuotas de 20  $\mu$ L de solución del huésped (H) para variar la razón molar  $[H]/[L]$  en el rango de 0 -1000. A partir de este estudio se obtuvieron las constantes de formación. Todas las titulaciones se realizaron por duplicado.

### **Equipo de Laboratorio**

Espectroscopia de ultravioleta-visible (UV-Vis): Los espectros de absorción electrónica se obtuvieron en un espectrofotómetro de arreglo de diodos UV-Vis 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.

Mediciones de pH: Las mediciones de pH se realizaron con un potenciómetro marca Thermo Scientific Orion 3 Star.

### **Programas Computacionales**

El análisis de los datos espectroscópicos y la obtención de los gráficos se llevó a cabo utilizando el programa Origin 8.6.

Para el análisis de datos de las titulaciones y el cálculo de las constantes de asociación se utilizaron los programas K(AB)Ct y K(AB)CtI desarrollados en Excel por el Dr. Motomichi Inoue.(Inoue, 2009; Inoue, 2013)

La ecuación general que describe estos programas es la 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,  $D_j$ , 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  $[B]_t / [A]_t \approx 0$  . El programa K(AB)CtI está diseñado para esta situación y toma la  $I_A$  como parámetro de ajuste debido a que ésta no es idéntica a la  $I_A$  observada en ausencia de B, y debe ser estimada por extrapolación a  $[B]_t = 0$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el estudio de las propiedades de complejación del ligante (dtpa1py) $H_3$  hacia los diferentes huéspedes se realizaron titulaciones espectrofotométricas utilizando espectroscopia de fluorescencia, mediante las cuales se determinaron las constantes de formación de los complejos formados. Previo a los estudios, se verificó que los huéspedes seleccionados no absorben a la longitud de onda de excitación del ligante ( $\lambda_{exc} = 342$  nm) ni emiten significativamente a la longitud de onda de interés para este estudio ( $\lambda_{em} = 490$  nm), ver figuras A 2-A 13 en sección de anexos.

El espectro de emisión del ligante (dtpa1py) $H_3$  en buffer MOPS a pH=7.2 muestra las bandas de emisión típicas de pireno localizadas entre 379 y 395 nm y una banda ancha a 490 nm (

), la cual se atribuye a la formación de dímeros excitados de pireno (excímeros).

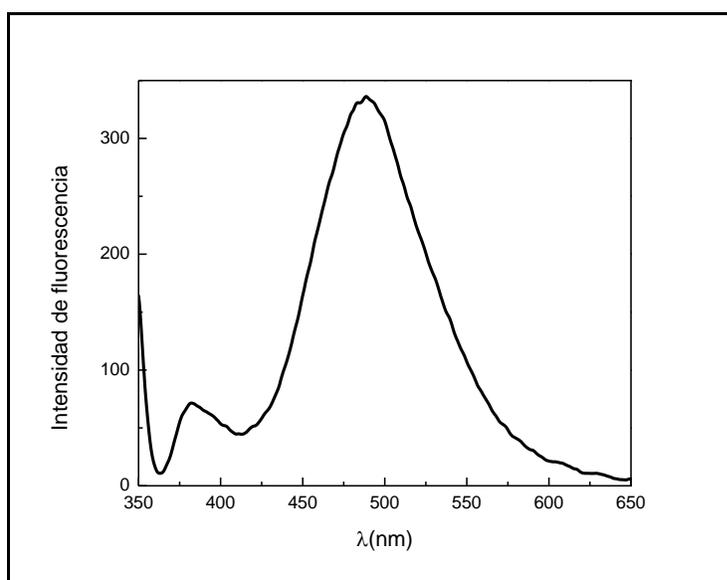


Figura 17. Espectro de emisión de (dtpa1py) $H_3$  en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS),  $\lambda_{exc}=342$  nm,  $T^\circ 25$ ,  $[L]= 2 \times 10^{-8}$  M.

La presencia de los dos tipos de emisión en el espectro de  $(dtpa1py)H_3$  es evidencia que existe un equilibrio en solución entre al menos dos especies con diferentes conformaciones: 1) conformación abierta o desplegada, que origina la emisión de monómero y 2) conformación cerrada o de pirenos apilados que da origen al excímero. La alta razón de intensidades excímero/monómero ( $I_E/I_M \sim 5$ ) indica que la segunda conformación es la que predomina, por lo que el ligante puede actuar como un receptor tipo pinza de diferentes tipos de moléculas y formar complejos sustrato-receptor en solución acuosa.

La histamina es una sustancia de gran importancia a nivel biológico, por lo que el objetivo principal de este trabajo fue determinar la afinidad del ligante  $(dtpa1py)H_3$  por esta molécula, en relación a la que presenta sobre sustratos análogos. La estructura de histamina se caracteriza por presentar un grupo imidazol y una cadena lateral 2-aminoetil, la cual a  $pH=7.2$  se encuentra protonada y con carga positiva ( $pK_a= 9.75$ ). Se incluyeron en este estudio triptamina y fenetilamina, ya que presentan una cadena lateral análoga a histamina (cuyos valores de  $pK_a$  son 10.2 y 9.83, respectivamente), sin embargo se diferencian en el grupo aromático que presentan (Figura 2).

En cada uno de los experimentos de titulación, la adición de las aminas histamina, triptamina o fenetilamina al ligante  $(dtpa1py)H_3$ , provocó un apagamiento de la intensidad de fluorescencia de excímero, lo que fue indicativo de la formación de los complejos (Figuras 18, 19 y 20). La variación en la intensidad de emisión a 490 nm en función de la razón molar  $[huésped]/[receptor]$  permitió calcular las constantes de formación de los complejos. Los datos se analizaron con los programas K(AB)Ct (sistemas  $dtpa1py$ -histamina y  $dtpa1py$ -triptamina) y K(AB)CtI (sistema  $dtpa1py$ -fenetilamina), desarrollados en Excel por el Dr. Motomichi Inoue (M. Inoue, 2009), los cuales asumen la formación de complejos huésped: receptor con estequiometría 1:1. Las constantes de formación ( $\log K_f$ ) para los complejos  $(dtpa1py)H_3$ -histamina,  $(dtpa1py)H_3$ -triptamina y  $(dtpa1py)H_3$ -fenetilamina fueron 5.72, 5.66 y 5.12, respectivamente (Tabla 1), por lo que la estabilidad disminuye en el orden siguiente: histamina > triptamina > fenetilamina.

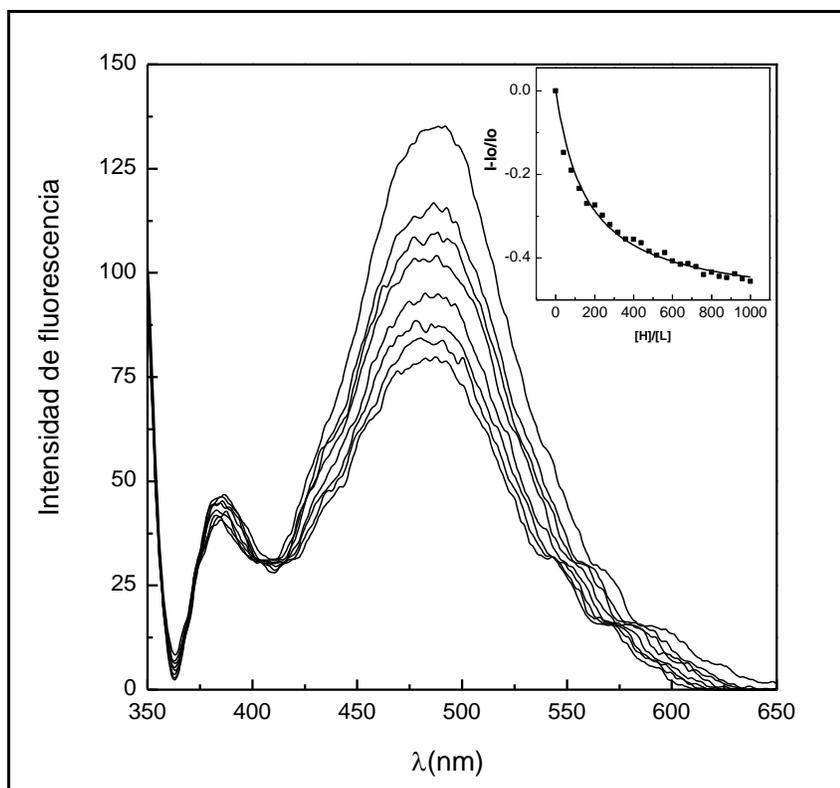


Figura 18. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de  $(dtpa1py)H_3$  con histamina en solución acuosa a  $pH=7.2$  (buffer MOPS),  $\lambda_{exc} = 342$  nm,  $T=25^\circ C$ .  $[L]= 2 \times 10^{-8}$  M. De arriba a abajo la concentración de histamina fue: 0 M,  $8 \times 10^{-7}$  M,  $1.6 \times 10^{-6}$  M,  $2.4 \times 10^{-6}$  M,  $4.8 \times 10^{-6}$  M,  $7.2 \times 10^{-6}$  M,  $9.6 \times 10^{-6}$  M,  $1.28 \times 10^{-5}$  M. Recuadro: Variación en la intensidad de emisión a  $\lambda=490$  nm (normalizada) en función de la razón molar huésped/ligante  $[H]/[L]$ .  $I_0$  representa la intensidad de emisión a  $[H]=0$  M. La línea sólida representa el mejor ajuste basado en la ecuación 1-17 con  $\log K_f = 5.72$ .

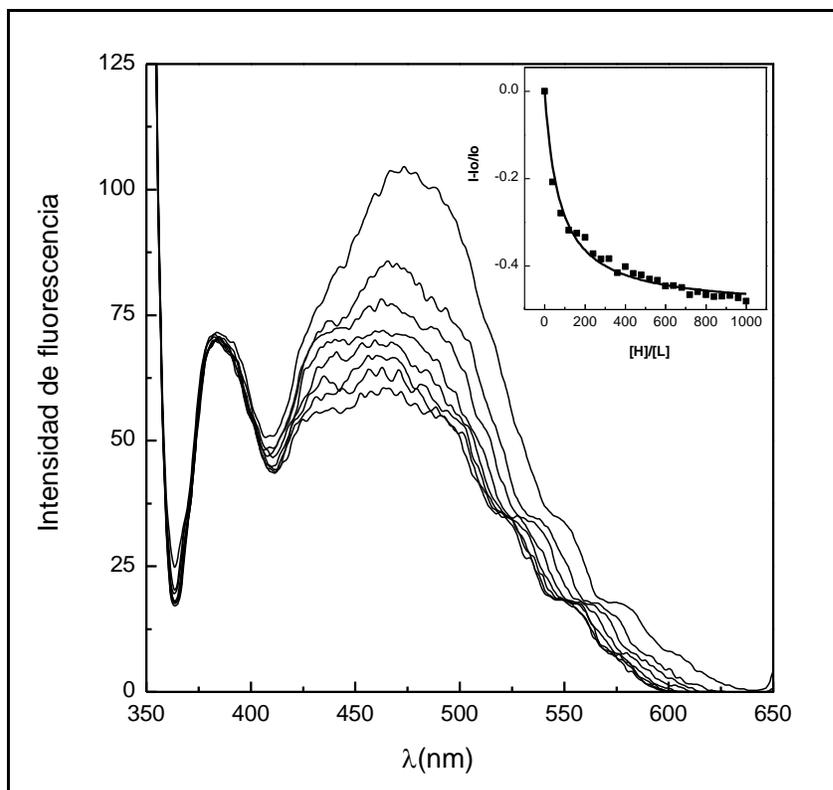


Figura 19. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de  $(dtpa1py)H_3$  con triptamina en solución acuosa a  $pH=7.2$  (buffer MOPS),  $\lambda_{exc}=342$  nm,  $T=25^\circ C$ .  $[L]=2 \times 10^{-8}$  M. De arriba a abajo la concentración de triptamina fue = 0 M,  $3.2 \times 10^{-6}$  M,  $6.4 \times 10^{-6}$  M,  $9.6 \times 10^{-6}$  M,  $1.92 \times 10^{-5}$  M,  $2.88 \times 10^{-5}$  M,  $3.84 \times 10^{-5}$  M,  $5.12 \times 10^{-5}$  M. Recuadro: Variación en la intensidad de emisión a  $\lambda=490$  nm (normalizada) en función de la razón molar huésped/ligante  $[H]/[L]$ .  $I_0$  representa la intensidad de emisión a  $[H]=0$  M. La línea sólida representa el mejor ajuste basado en la ecuación 1-17 con  $\log K_f = 5.66$ .

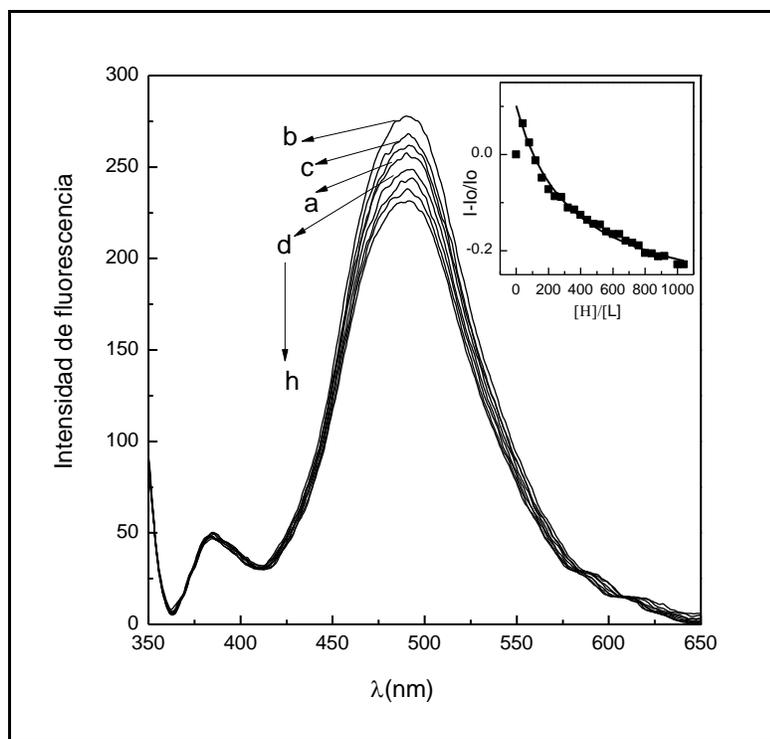


Figura 20. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de  $(dtpa1py)H_3$  con fenetilamina en solución acuosa a  $pH=7.2$  (buffer MOPS),  $\lambda_{exc} = 342$  nm,  $T=25^\circ C$ .  $[L]= 2 \times 10^{-8}$  M. Las concentraciones de fenetilamina fueron: 0 M (a),  $8 \times 10^{-7}$  M (b),  $1.6 \times 10^{-6}$  M (c),  $2.4 \times 10^{-6}$  M (d),  $3.2 \times 10^{-6}$  M (e),  $4 \times 10^{-6}$  M (f),  $5.6 \times 10^{-6}$  M (g),  $7.2 \times 10^{-6}$  M (h). Recuadro: Variación en la intensidad de emisión a  $\lambda=490$  nm (normalizada) en función de la razón molar huésped/ligante  $[H]/[L]$ .  $I_0$  representa la intensidad de emisión a  $[H]=0$  M. La línea sólida representa el mejor ajuste basado en la ecuación 1-17 con  $\log K_f = 5.12$

Tabla 1. Constantes de formación ( $\log K_f$ ) de los complejos de (dtpa1py) $H_3$  con los diferentes huéspedes

Huésped	Log $K_f^a$
Histamina	5.72 (0.23)
Triptamina	5.66 (0.17)
Fenetilamina	5.12 (0.03)
Imidazol	4.77 (0.15)
L-triptófano	5.54 (0.18)

<sup>a</sup> Los valores entre paréntesis representan las desviación del promedio de las dos mediciones.

El orden de afinidad del receptor por los huéspedes es opuesto al de hidrofobicidad de los grupos aromáticos presentes en las estructuras, el cual es: imidazol (histamina) < indol (triptamina) < benceno (fenetilamina). Esto indica que, además de la atracción electrostática entre los grupos  $-RCOO^-$  del receptor y el grupo  $-RNH_3^+$  de los huéspedes, y de las interacciones hidrofóbicas y/o de tipo  $\pi-\pi$  de los grupos aromáticos de las aminas con los pirenos, existe algún tipo de fuerza adicional que estabiliza al complejo (dtpa1py) $H_3$ -histamina. Si se considera que al pH del estudio el receptor se encuentra en su forma monoprotonada y presenta la conformación que se propone en la Figura A 1 (Pérez y col., 2011), una posibilidad es que la histamina establezca enlace de hidrógeno con el grupo amino central protonado de la unidad dtpa, a través del par electrónico libre del nitrógeno-3 del imidazol.

Con el propósito de verificar la importancia de las interacciones electrostáticas catión-anión en la estabilidad de los complejos, se incluyó en este estudio a imidazol, el cual carece de la cadena lateral presente en histamina. La adición de imidazol a la solución del receptor provocó un incremento inicial en la emisión de excímero, seguido de una disminución en la intensidad de dicha banda (Figura 21). Al igual que para el complejo dtpa1py-fenetilamina, el

análisis de la curva de titulación del sistema dtpa1py-imidazol se realizó con el programa K(AB)CtI. La constante de formación determinada para el complejo (dtpa1py)H<sub>3</sub>-imidazol fue  $\log K_f = 4.77$ , la cual es menor a la del complejo (dtpa1py)H<sub>3</sub>-histamina ( $\log K_f = 5.72$ ). Este resultado confirma la importancia de interacciones electrostáticas entre la cadena lateral del huésped y los grupos carboximetilo del receptor en la estabilidad de los complejos.

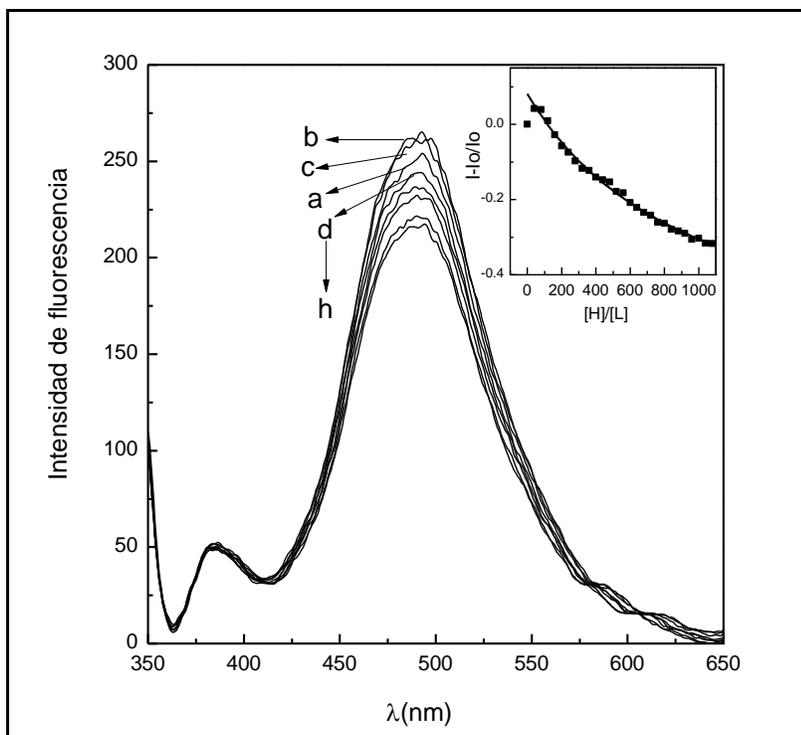


Figura 21. Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (dtpa1py)H<sub>3</sub> con imidazol en solución acuosa a pH=7.2 (buffer MOPS),  $\lambda_{exc} = 342$  nm, T=25°C. [L]=  $2 \times 10^{-8}$  M. Las concentraciones de imidazol fueron: 0 M (a),  $8 \times 10^{-7}$  M (b),  $1.6 \times 10^{-6}$  M (c),  $3.2 \times 10^{-6}$  M (d),  $4 \times 10^{-6}$  M (e),  $4.8 \times 10^{-6}$  M (f),  $6.4 \times 10^{-6}$  M (g),  $8 \times 10^{-6}$  M (h). Recuadro: Variación en la intensidad de emisión a  $\lambda = 490$  nm (normalizada) en función de la razón molar huésped/ligante [H]/[L]. I<sub>0</sub> representa la intensidad de emisión a [H]=0 M. La línea sólida representa el mejor ajuste basado en la ecuación 1-17 con  $\log K_f = 4.77$

Hasta este punto del trabajo, se había establecido que la estabilidad de los complejos de (dtpa1py)H<sub>3</sub> con las aminas en estudio está determinada principalmente por las interacciones electrostáticas entre los grupos  $-RCOO^-$  del receptor y la cadena  $-RNH_3^+$  de los huéspedes, además de interacciones hidrofóbicas y/o de tipo  $\pi-\pi$  entre los grupos aromáticos (imidazol,

indol o benceno) y los pirenos. En el caso del complejo (dtpa1py)<sub>3</sub>-histamina, el mayor valor de la constante de formación ( $\log K_f = 5.72$ ) reveló la posible contribución de puentes de hidrógeno imidazol-dtpa a la estabilidad (ver arriba).

La importancia de las interacciones electrostáticas catión-anión en la estabilización de complejos moleculares está muy documentada en la literatura. El propio grupo de QS-DIPM-USON reportó en 1997 (Inoue y col., 1997) la formación de un complejo de histamina (en agua a pH=8.2) con el quelato de Cu<sup>2+</sup> de un macrociclo de doce miembros con dos grupos carboximetil pendientes (CuL12). La asociación ocurre mediante dos tipos de fuerzas de enlace: (1) coordinación del nitrógeno-3 del grupo imidazol de histamina al centro metálico del complejo y (2) formación de un par iónico entre un grupo  $-\text{RCOO}^-$  del macrociclo y el grupo  $-\text{RNH}_3^+$  de histamina. Esta última fuerza de atracción es fundamental para la formación del complejo histamina-CuL12, ya que, bajo las mismas condiciones, la molécula de imidazol no forma complejo con CuL12.

Lo anterior nos motivó a realizar estudios de complejación adicionales con (dtpa1py)<sub>3</sub> y los aminoácidos L-triptófano y L-histidina, los cuales difieren de triptamina e histamina, respectivamente, en que las cadenas laterales son zwitteriónicas bajo las condiciones de pH del estudio (ver valores de  $pK_a$  en Figura 2). La ausencia de un grupo con carga positiva puntual reduce la posibilidad de que se establezcan puentes salinos catión-anión, lo cual podría reflejarse en las constantes de formación. Los experimentos de titulación de los sistemas dtpa1py-L-triptofano y dtpa1py-L-histidina se llevaron de acuerdo a la metodología que se ha descrito. Desafortunadamente, el comportamiento del sistema dtpa1py-L-histidina no fue reproducible aún después de tres mediciones independientes, por lo que a continuación se discuten únicamente los resultados del estudio del sistema dtpa1py-L-triptofano.

En la figura 22 se muestran espectros de emisión seleccionados y la curva de variación de intensidad de excímero de dtpa1py en función de la razón molar [L-triptofano]/[dtpa1py]. El análisis de la curva con el programa K(AB)Ct arrojó un valor de  $\log K_f$  de 5.54 para el complejo (dtpa1py)<sub>3</sub>-L-triptofano (ver Tabla 1). Dicho valor es menor al del complejo (dtpa1py)<sub>3</sub>-triptamina ( $\log K_f = 5.66$ ), lo que confirma de nuevo la importancia de las interacciones catión-anión en la estabilidad de los complejos.

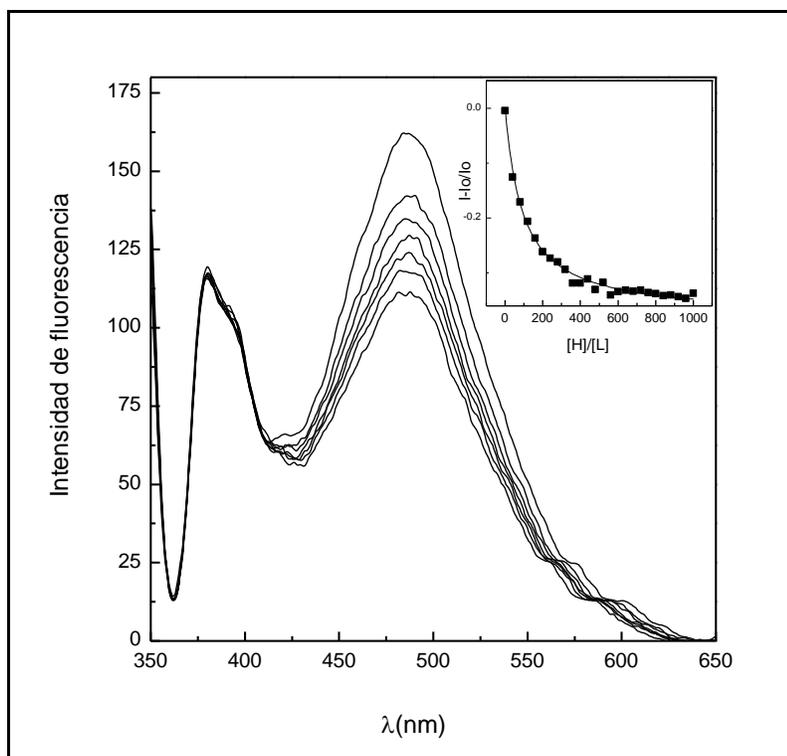


Figura 22 Espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de  $(dtpa1py)H_3$  con L-triptófano en solución acuosa a  $pH=7.2$  (buffer MOPS),  $\lambda_{exc} = 342$  nm,  $T=25^\circ C$ ,  $[L]= 2 \times 10^{-8}$  M. De arriba a abajo la concentración de triptófano = 0 M,  $3.2 \times 10^{-6}$  M,  $6.4 \times 10^{-6}$  M,  $9.6 \times 10^{-6}$  M,  $1.92 \times 10^{-5}$  M,  $2.88 \times 10^{-5}$  M,  $3.84 \times 10^{-5}$  M,  $5.12 \times 10^{-5}$  M. Recuadro: Variación en la intensidad de emisión a  $\lambda=490$  nm (normalizada) en función de la razón molar huésped/ligante  $[H]/[L]$ .  $I_0$  representa la intensidad de emisión a  $[H]=0$  M. La línea sólida representa el mejor ajuste basado en la ecuación 1-17 con  $\log K_f = 5.54$ .

Con base en los resultados presentados, se puede concluir que, bajo las condiciones de este estudio, el ligante  $(dtpa1py)H_3$  actúa como receptor tipo pinza y forma complejos moleculares de inclusión con los huéspedes seleccionados. El complejo con mayor estabilidad fue  $(dtpa1py)H_3$ -histamina ( $\log K_f = 5.72$ ), en el que se establecen diferentes tipos de fuerzas de atracción como son (1) interacciones catión-anión, (2) interacciones hidrofóbicas y/o de tipo  $\pi-\pi$  y (3) puentes de hidrógeno. Esto indica el potencial de aplicación del ligante  $(dtpa1py)H_3$  como sensor fluorescente de histamina en condiciones fisiológicas.

## CONCLUSIONES

1. Los estudios de complejación llevados a cabo con el ligante (dtpa1py) $H_3$ , revelan que este puede actuar como receptor tipo pinza y formar complejos moleculares con los huéspedes seleccionados.
2. Las interacciones entre huésped-receptor pueden ser de tipo electrostáticas, hidrofóbicas y de tipo  $\pi$ - $\pi$  aromáticas.
3. La formación de los complejos provoca disminución de la intensidad de emisión de excímero de (dtpa1py) $H_3$ , lo que indica que la porción aromática de los huéspedes se intercala entre los pirenos del receptor.
4. El orden de estabilidad de los complejos (de acuerdo a los valores de  $\log K_f$ ) fue dtpa1py-histamina > dtpa1py-triptamina > dtpa1py-triptófano > dtpa1py-fenetilamina > dtpa1py-imidazol.
5. La mayor afinidad del receptor por histamina se atribuyó a que en el complejo se establecen tres tipos de fuerzas de atracción: (1) interacciones catión-anión entre los grupos  $-RCOO^-$  del receptor y el grupo  $-RNH_3^+$  de la amina, (2) interacciones hidrofóbicas y/o de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre el grupo imidazol y los pirenos y (3) puentes de hidrógeno entre el grupo amino central protonado de la unidad dtpa y el par electrónico libre del nitrógeno-3 del imidazol.
6. Los resultados de este estudio revelan el potencial de aplicación de (dtpa1py) $H_3$  como sensor fluorescente de histamina en medio acuoso bajo condiciones de pH fisiológico.

## RECOMENDACIONES

1. Llevar a cabo estudios de complejación adicionales con el ligante (dtpa1py) $H_3$  y los huéspedes indol y benceno con el propósito de corroborar el efecto que tiene la cadena lateral en la estabilidad de los complejos.
2. Evaluar la estabilidad de los complejos mediante otra técnica analítica, como resonancia magnética de protón ( $^1H$  RMN).

## BIBLIOGRAFÍA

- Ávila M. J. E. (2010). Síntesis de un nuevo quimiosensor fluorescente tipo *bis*-cromofórico, derivado del ácido trietilentetraaminohexaacético(ttha) funcionalizado con grupos pireno y estudios de coordinación hacia los iones  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  en solución acuosa. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora.
- Bahena T. R. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev biomed.* 11:39-60.
- Cariño, L. I. M. (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, Hermosillo, Sonora.
- Chen Z., Liu J., Han Y., Zhu L. (2006). A novel histidine assay using tetraphenylporphyrin manganese(III) chloride as a molecular recognition probe by resonance light scattering technique. *Analytica Chimica Acta*, 570(1), 109-115.
- Fan L. J., Zhang Y., Murphy C. B., Angell S. E., Parker M. F. L., Flynn B. R., y col. (2009). Fluorescent conjugated polymer molecular wire chemosensors for transition metal ion recognition and signaling. *Coordination Chemistry Reviews.* 253(3–4), 410-422.
- Feng K., Kleinermanns K. (2009). Low frequency backbone vibrations in microhydrated tryptamine. *Chemical Physics Letters.* 473(4–6), 220-222.
- Hortalá M. A., Fabbrizzi L., Marcotte N., Stomeo F., Taglietti, A. (2003). Designing the selectivity of the fluorescent detection of amino acids: A chemosensing ensemble for histidine. *Journal of the American Chemical Society.* 125(1), 20-21.
- Inoue, M. (2009). Excel® Worksheets for Spectrometry: Universidad de Sonora.
- Inoue, M. (2013). Spectrometric titration : a guide to experimental. Hermosillo, Sonora: Universidad de Sonora.
- Inoue M. B., Machi L., Inoue M., Fernando, Q. (1997). Coordination of histamine and imidazole with macrocyclic  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  chelates of dioxotetraazacycloalkanediacetates. *Inorganica chimica acta.* 261(1), 59-65.
- Lodeiro C., Lima J. C., Parola A. J., Seixas de Melo J. S., Capelo J. L., Covelo B., et al. (2006). Intramolecular excimer formation and sensing behavior of new fluorimetric probes and their interactions with metal cations and barbituric acids. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 115(1), 276-286.

- Machi L., Muñoz I. C., Pérez G. 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. (2006). Bichromophoric Naphthalene Derivatives of Ethylenediaminetetraacetate: Fluorescence from Intramolecular Excimer, Protonation and Complexation with  $Zn^{2+}$  and  $Cd^{2+}$ . *Supramolecular Chemistry*. 18(7), 561-569.
- Martínez, J. S. (2005). Síntesis y evaluación de la capacidad complejante de ligandos nitrogenados de bifenilos sustituidos. Universidad de Valencia, España.
- McMurry J. (2001). *Química Orgánica*. 5ta ed. México. Internacional Thomson Editores S.A de C. V.
- Panpae K., Krikrutthee C., Porntaweethum P., Weerachiwcharnchai P., Chenwittayayos, A. (2008). Metallation of Protoporphyrins Used as Fluorescent Chemosensor for Imidazole Recognition. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 12(3), 505-512.
- Prodi, L. Bolletta F., Zaccheroni N. (1999). Luminescent chemosensors for transition metal ions.. Elsevier. 205, 59-83
- 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.
- Qian-Ni G., Zao-Ying L., Wing-Hong C., Kai Chung, L., Crossley, M. J. (2010). Appending zinc tetraphenylporphyrin with an amine receptor at  $\beta$ -pyrrolic carbon for designing a selective histamine chemosensor. [Article]. *Supramolecular Chemistry* 22(2), 122-129.
- Ramos J. J., Garduño T. B., Arias M. J. A. (2009). Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. *Rev Biomed*. 20, 100-126.
- Sainio E. L., Pulkki K., Young, S. N. (1996). L-tryptophan: biochemical, nutritional and pharmacological aspects. *Amino Acids*. 10(1), 21-47.
- Shiraishi Y., Tokitoh Y., Nishimura G., Hirai, T. (2007). Solvent-driven multiply configurable on/off fluorescent indicator of the pH window: A diethylenetriamine bearing two end pyrene fragments. *The Journal of Physical Chemistry B*. 111(19), 5090-5100.
- Skoog, D. A, Leary J. J. (2008). *Análisis instrumental*. 6ta ed. México, DF. McGRAW-HILL
- Steed W. J, Turner. R. D., Wallace J. K. (2007). *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*. 1st ed. England. WILEY.
- Steed. W. J, Atwood L. J (2009). *Supramolecular Chemistry*. 2 nd ed. England. WILEY

- Valeur, B . (2001). *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Germany. WILEY-VCH
- Virues C., Velázquez E. F., Navarro R. E., Inoue, M. (2009). Complexation of an anionic meta-cyclophane with histamine and analogous bioactive amines in aqueous media. *Supramolecular Chemistry*. 21(5), 344-350.
- Wade A. M., Tucker, H. N. (1998). Antioxidant characteristics of L-histidine. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 9(6), 308-315.
- Yao J., Im H. S., Foltin M., Bernstein, E. R. (2000). Spectroscopy of Neurotransmitters and Their Clusters: Phenethylamine and Amphetamine Solvation by Nonpolar, Polar, and Hydrogen-Bonding Solvents. *The Journal of Physical Chemistry A*. 104(26), 6197-6211.

## ANEXOS

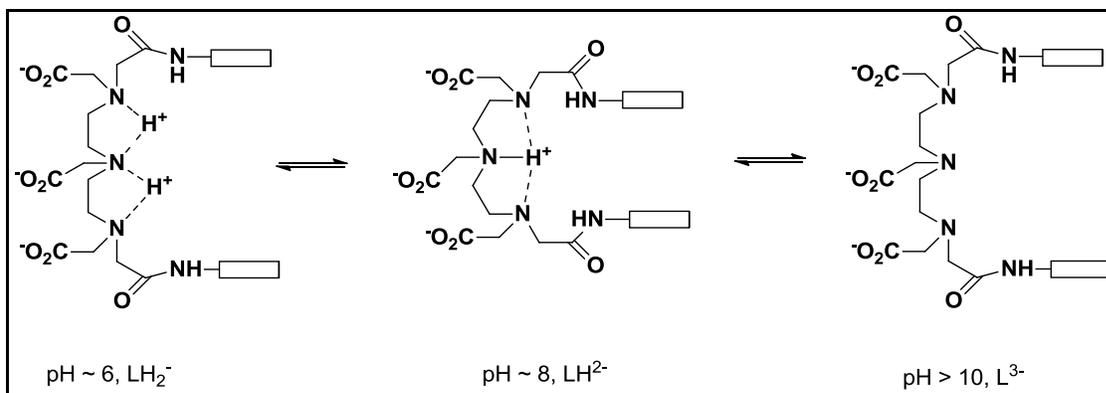


Figura A 1. Esquema de protonación y cambios conformacionales propuestos para (dtpa1py)  $\text{H}_3$ . Los rectángulos pertenecen a los grupos pireno terminales. Tomado de referencia Machi, et al., 2009, con modificaciones

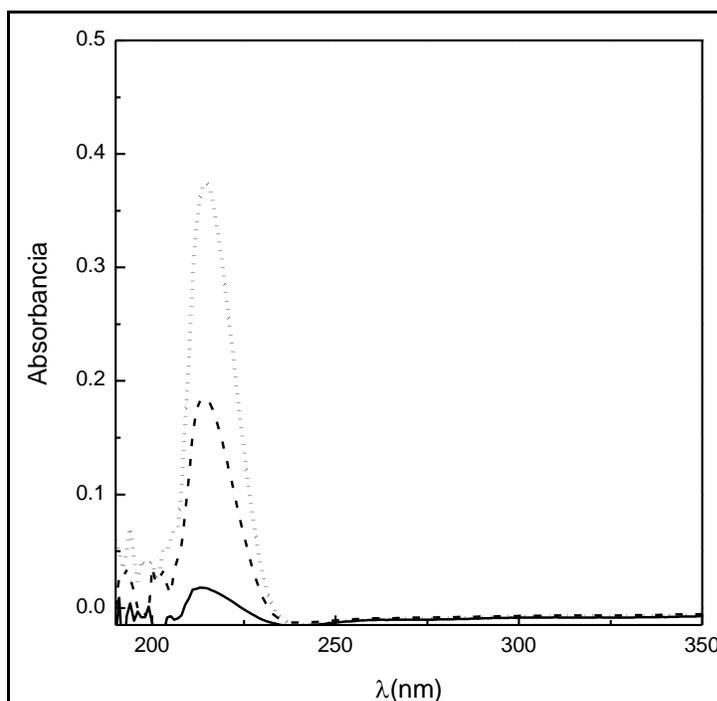


Figura A 2. Espectros de absorción UV-Vis de histamina a concentraciones  $[1 \times 10^{-5} \text{ M}]$  (—),  $[5 \times 10^{-5} \text{ M}]$  (---),  $[1 \times 10^{-4} \text{ M}]$  (···),  $T=25^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=7.2$  (buffer MOPS).

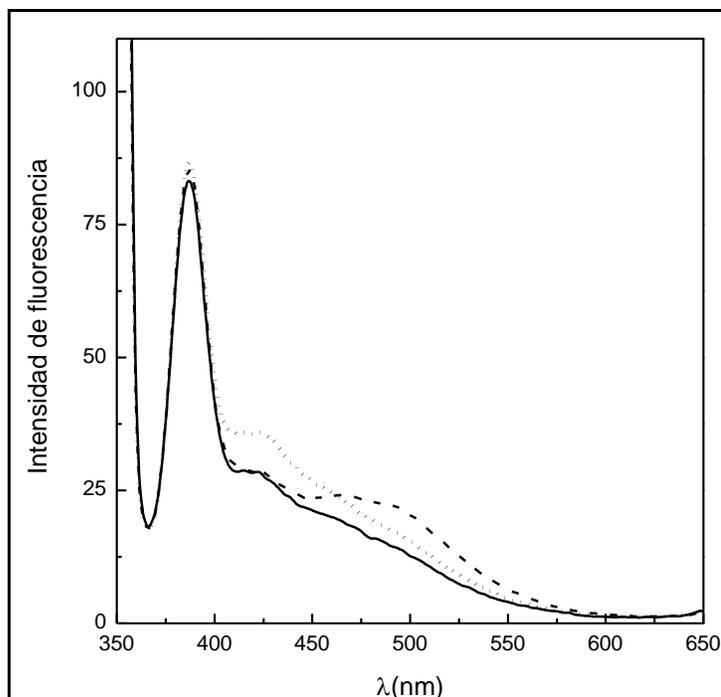


Figura A 3. Espectros de emisión de fluorescencia de histamina a concentraciones  $[1 \times 10^{-5} \text{ M}]$  (—),  $[5 \times 10^{-5} \text{ M}]$  (---),  $[1 \times 10^{-4} \text{ M}]$  (···),  $\lambda_{\text{exc}} = 342 \text{ nm}$ ,  $T=25^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=7.2$  (buffer MOPS).

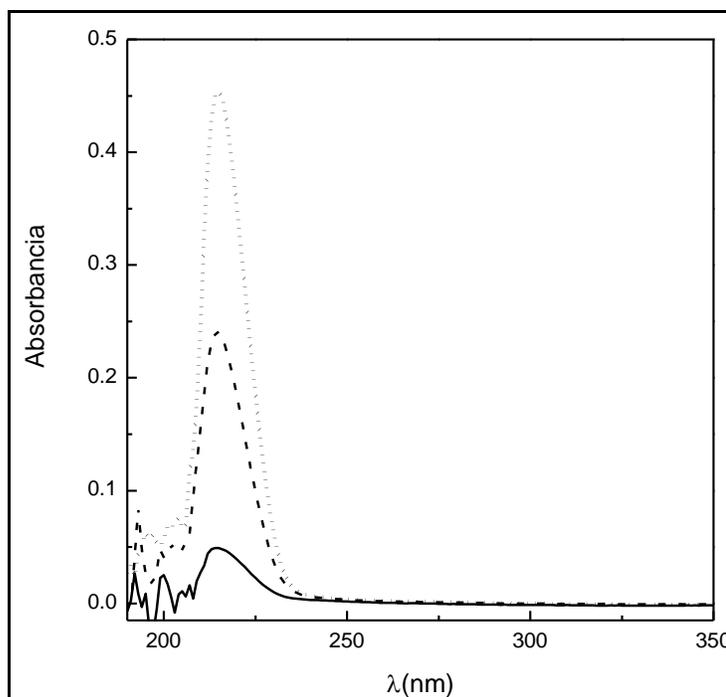


Figura A 4. Espectros de absorción UV-Vis L-histidina a concentraciones  $[1 \times 10^{-5} \text{ M}]$  (—),  $[5 \times 10^{-5} \text{ M}]$  (---),  $[1 \times 10^{-4} \text{ M}]$  (···),  $T=25^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=7.2$  (buffer MOPS).

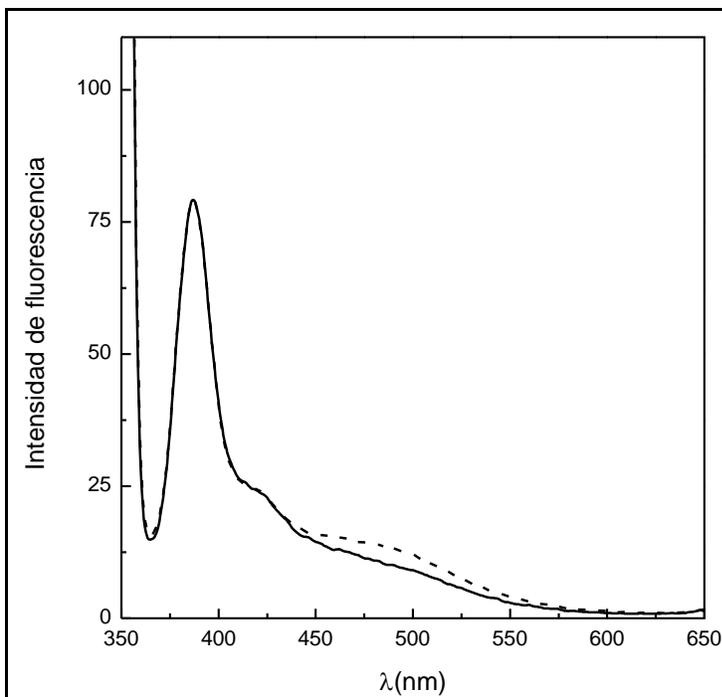


Figura A 5. Espectros de emisión de fluorescencia de L-histidina a concentraciones [1x10<sup>-5</sup> M] (—), [5x10<sup>-5</sup> M] (---), λ<sub>exc</sub> = 342 nm, T=25°C, pH=7.2 (buffer MOPS).

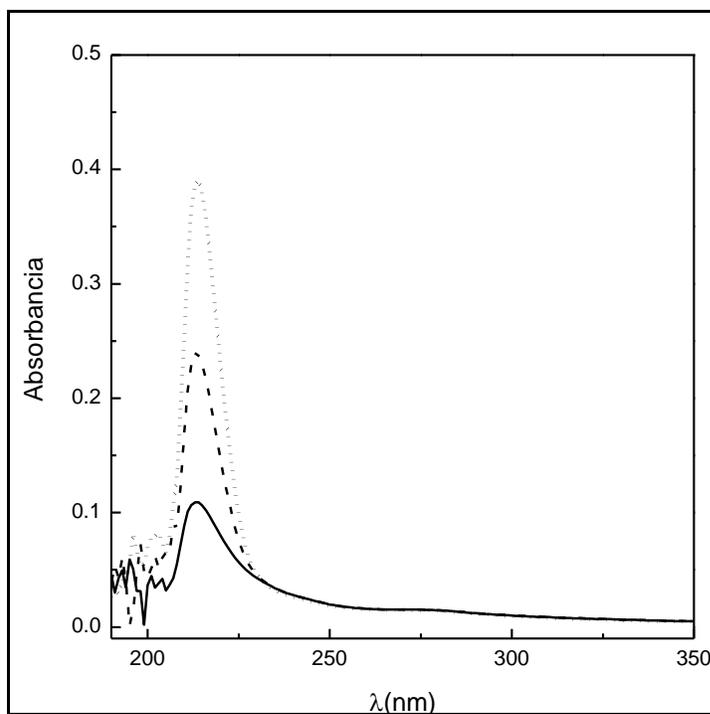


Figura A 6. Espectros absorción UV-Vis imidazol a concentraciones [1x10<sup>-5</sup> M] (—), [5x10<sup>-5</sup> M] (---), [1x10<sup>-4</sup> M] (···), T=25°C, pH=7.2 (buffer MOPS).

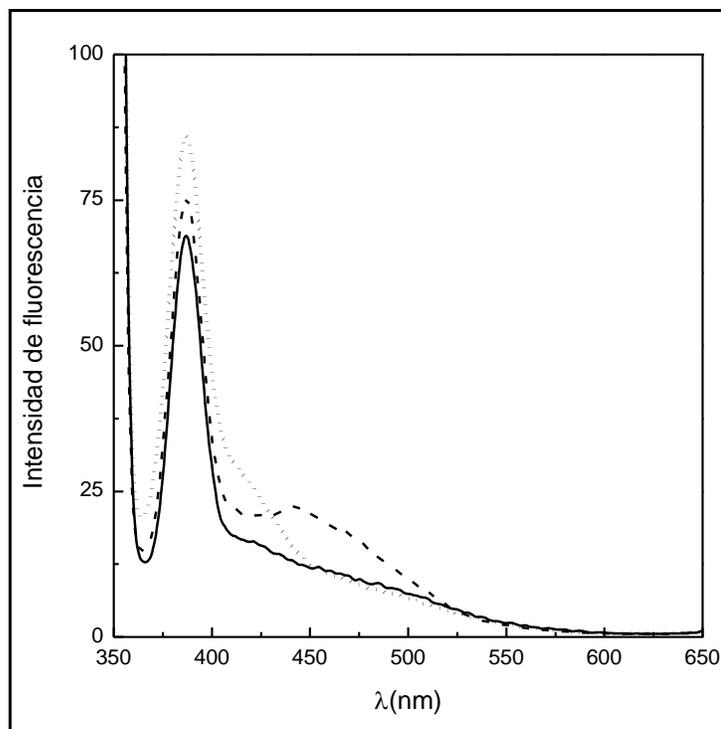


Figura A 7. Espectro de emisión de fluorescencia de imidazol a concentraciones [1x10<sup>-5</sup> M] (—), [5x10<sup>-5</sup> M] (---), [1x10<sup>-4</sup> M] (···),  $\lambda_{exc}$  =342 nm, T=25°C, pH = 7.2 (buffer MOPS)

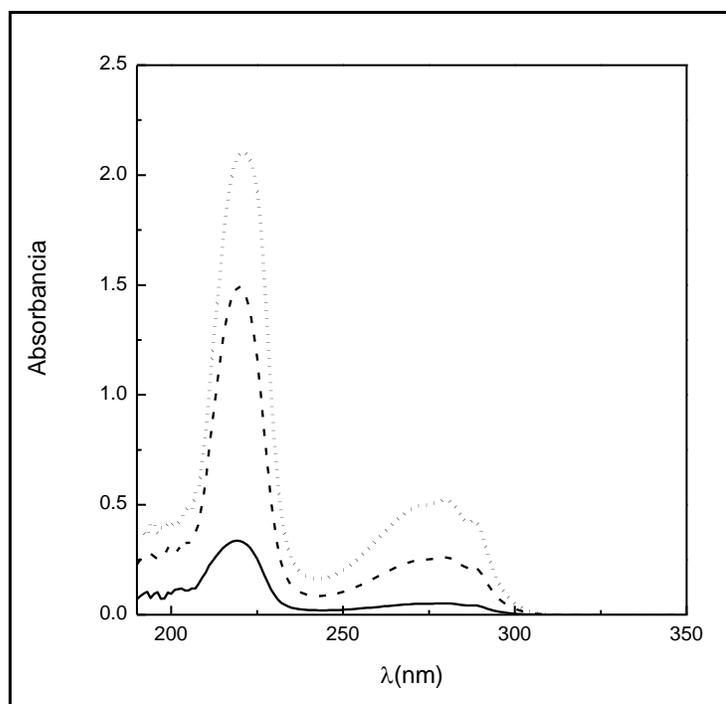


Figura A 8. Espectros absorción UV-Vis triptófano a concentraciones [1x10<sup>-5</sup> M] (—), [5x10<sup>-5</sup> M] (---), [1x10<sup>-4</sup> M] (···), T=25°C, pH=7.2 (buffer MOPS).

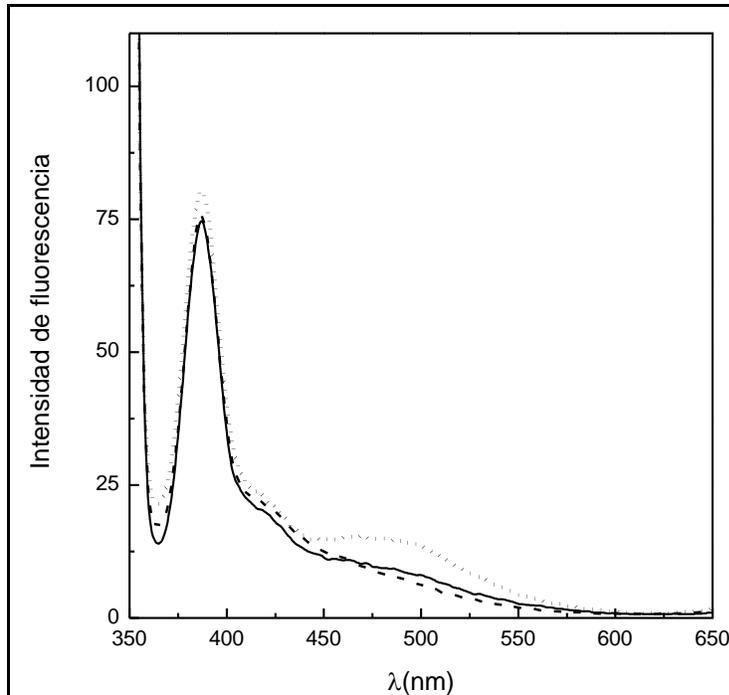


Figura A 9. Espectro de emisión de fluorescencia de triptófano a concentraciones [1x10<sup>-5</sup> M] (—), [5x10<sup>-5</sup> M] (---), [1x10<sup>-4</sup> M] (···), λ<sub>exc</sub> =342 nm, T=25°C.pH=7.2 (buffer MOPS).

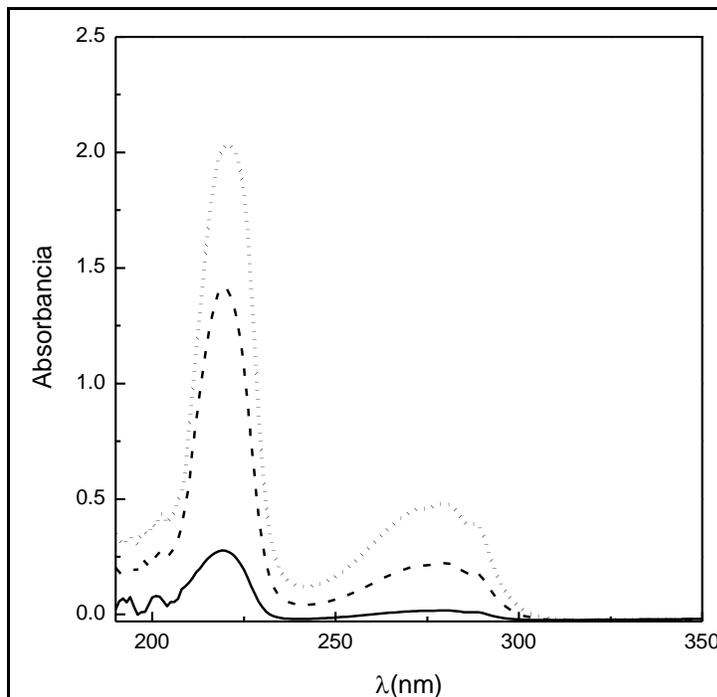


Figura A 10. Espectros de absorción UV-Vis de triptamina a concentraciones [1x10<sup>-5</sup> M] (—), [5x10<sup>-5</sup> M] (---), [1x10<sup>-4</sup> M] (···), T=25°C, pH=7.2 (buffer MOPS)

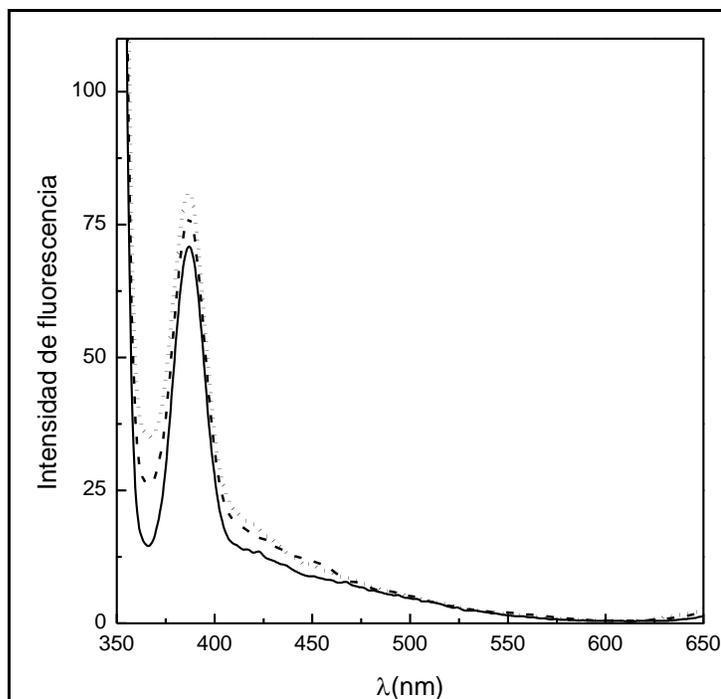


Figura A 11. Espectro de emisión de fluorescencia de triptamina a concentraciones [ $1 \times 10^{-5}$  M] (—), [ $5 \times 10^{-5}$  M] (---), [ $1 \times 10^{-4}$  M] (···),  $\lambda_{exc} = 342$  nm,  $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7.2$  (buffer MOPS).

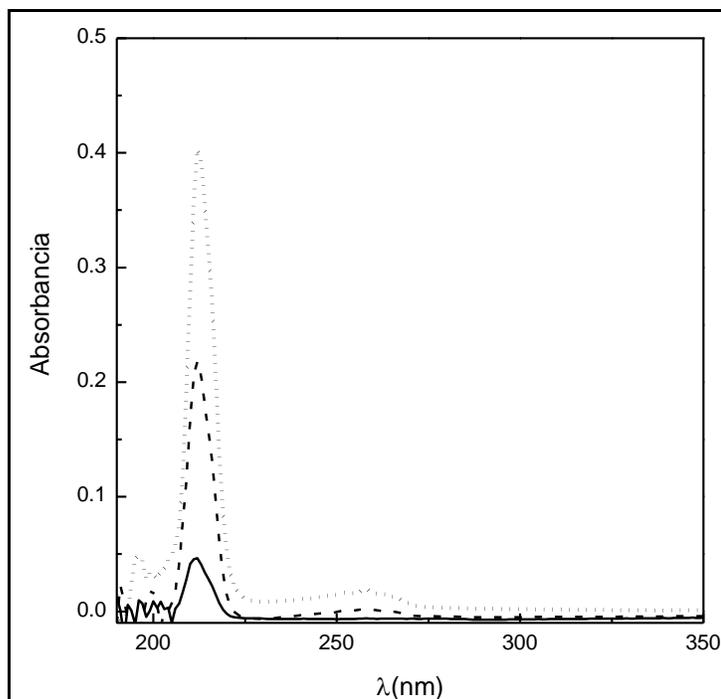


Figura A 12. Espectros de absorción UV-Vis de Fenetilamina a concentraciones [ $1 \times 10^{-5}$  M] (—), [ $5 \times 10^{-5}$  M] (---), [ $1 \times 10^{-4}$  M] (···),  $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7.2$  (buffer MOPS).

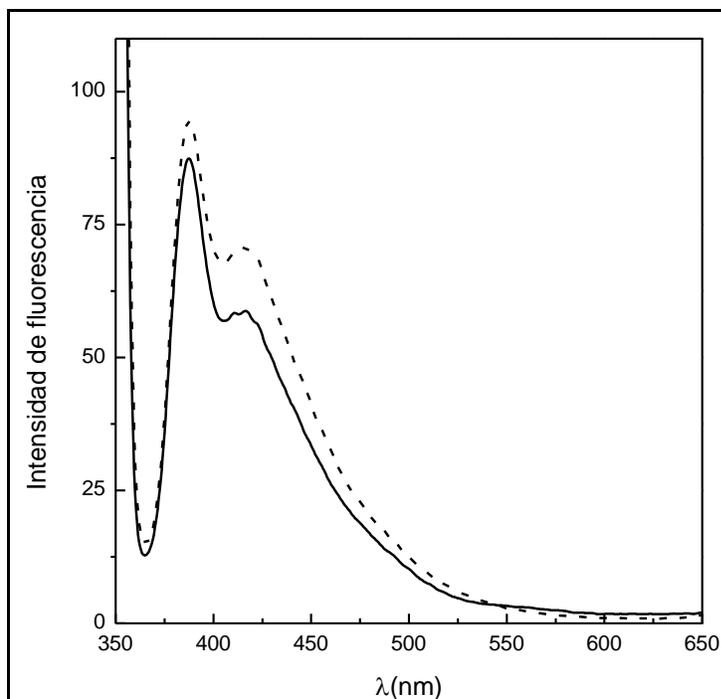


Figura A 13. Espectro de emisión de fluorescencia de triptamina a concentraciones [ $1 \times 10^{-5}$  M] (—), [ $5 \times 10^{-5}$  M] (---),  $\lambda_{exc} = 342$  nm, T=25°C. pH=7.2 (buffer MOPS).