



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS

“DESARROLLO DE UN SENSOR FLUORESCENTE PARA SOLUCIONES DE DOPAMINA A PARTIR DE LA INCORPORACIÓN DE UNA MOLÉCULA SENSOR EN CRISTALES DE BIOMOF-1”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

JAVIER NERI HIPÓLITO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA FERNANDA BALLESTEROS RIVAS.

ASESOR EXTERNO: DR. VICTOR VARELA GUERRERO

Toluca, México; Mayo de 2018

CAMPUS UNIVERSITARIO “EL CERRILLO”, EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS, MUNICIPIO DE TOLUCA, MÉX.

## **Agradecimientos**

No me imagino las palabras exactas que plasmen en esta hoja el profundo agradecimiento que tengo a Dios, a mi familia y a cada una de las personas que he encontrado en mi camino y que han dejado una huella honda en mi vida, en mi forma de ser.

Gracias a mi familia que profundamente amo; a mi padre por brindarme las enseñanzas que toda persona recta necesita y que sin duda me han guiado y me guiarán a lo largo de mi vida, a mi madre agradezco esa alegría y luz en mi vida que a toda persona le hace falta para sentir plenitud en su día a día, a mi hermana que sé que siempre estará ahí para sacarme una sonrisa cuando lo necesite. Gracias a todos ustedes, son una familia que no toda persona tiene la fortuna de tener, espero con el corazón pagarles algún día, algún momento todo el bien que me han hecho.

Agradezco sinceramente a la doctora María Fernanda por creer en mí, por su paciencia y su valiosa guía, no solo es una brillante investigadora, también una incansable y admirable persona.

Al doctor Victor Varela le doy las gracias por la oportunidad de desarrollarme académicamente en un buen ambiente y con las herramientas necesarias que todo investigador de primer nivel necesita (espero llegar a serlo).

A mis compañeros de laboratorio (los mejores que uno puede tener) les debo mi gratitud profunda, aprender de cada uno de ustedes me hace crecer como persona e investigador.

A Moni, gracias sinceramente, tu compañía a lo largo de esta travesía ha sido más llevadera contigo acompañándome.

Doy gracias a esas personas tan valiosas para mí, tan contundentes que han dejado una parte de ellos en mi persona, gracias maestra Thelma sus charlas y consejos me ayudaron a crecer más de lo que cree, gracias ingeniero Octavio, gracias “compatriota” por ayudarme a ver de otra manera (mucho más fascinante) lo que nos rodea, gracias doctora Perla, una gran investigadora.

Mis más sinceros agradecimientos al doctor Alejandro Dorazco y la maestra Alejandra Núñez sin su apoyo este trabajo difícilmente se hubiera realizado.

Y sobre todo, gracias Dios por brindarme tantas bendiciones, sin tu guía nada, absolutamente nada de esto sería posible. Porque ni la hoja más minúscula de un árbol se mueve si no es por la voluntad de Dios.

Gracias profundamente.

Javier Neri H.

# Contenido

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	4
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	5
3.1 General.....	5
3.2 Específicos.....	5
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	6
<b>V. REVISIÓN LITERARIA</b> .....	6
5.1 Neurotransmisores .....	6
5.2 Dopamina .....	9
5.2.1 Síntesis de dopamina .....	9
5.2.2 Distribución de dopamina.....	10
5.2.3 Mecanismos de liberación de dopamina.....	12
5.2.4 Mecanismos de acción .....	14
5.3 Enfermedades derivadas de la disfunción de dopamina.....	16
5.4 Sensores para dopamina .....	18
5.5 Polímeros electroconductores .....	20
5.5.1 Luminiscencia de polímeros electroconductores.....	23
5.6 Derivados de O-fenilendiamina .....	24
5.7 Fenazinas.....	25
5.8 2,3 diaminofenazina .....	28
5.9 Materiales porosos .....	29
5.10 Polímeros de coordinación porosos (redes metal-orgánicas) .....	30
5.11 Redes metal-orgánicas con moléculas orgánicas (BioMOF's) .....	32
5.12 BioMOF-1.....	33
5.13 Usos y aplicaciones de BioMOF's .....	35
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	37
6.1 Síntesis de BioMOF-1 .....	37
6.2 Síntesis de 2,3 diaminofenazina.....	39
6.3 Incorporación de DAP en cristales de BioMOF-1 .....	39
6.4 Elaboración de películas con cristales, DAP-BioMOF-1 .....	40
6.5 Elaboración de soluciones nanomolares de dopamina .....	40
6.6 Exposición de películas a soluciones de dopamina .....	41

6.7 Caracterización .....	41
6.7.1 Microscopía óptica.....	41
6.7.2 Microscopía electrónica de barrido.....	42
6.7.3 Patrones de difracción de rayos X.....	43
6.7.4 Difracción de rayos X de monocristal.....	43
6.7.5 Espectroscopia infrarroja.....	44
6.7.6 Análisis termogravimétrico (TGA).....	45
6.7.7 Análisis de fisisorción.....	46
6.7.8 Espectrofotometría UV-visible .....	46
6.7.9 Espectrometría fluorescente .....	47
<b>VII. DISCUSIÓN Y RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
7.1 Microscopía óptica.....	48
7.2 Microscopía electrónica de barrido .....	48
7.3 Patrones de difracción de rayos X .....	51
7.4 Difracción de rayos X de monocristal .....	52
7.5 Espectroscopia infrarroja .....	52
7.6 Análisis termogravimétrico (TGA) .....	54
7.7 Análisis de fisisorción.....	55
7.8 Espectrofotometría UV-visible .....	56
7.9 Espectrometría fluorescente .....	60
<b>VIII. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>62</b>
<b>IX. REFERENCIAS .....</b>	<b>64</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Sinapsis esquematizada	7
Figura 2. Estructura de dopamina	9
Figura 3. Síntesis de dopamina	10
Figura 4. Circuitos cerebrales de acción dopaminérgica	12
Figura 5. Cascada de señalización de receptores de dopamina	15
Figura 6. Clasificación de polímeros conductores	20
Figura 7. Formación de enlace $\pi$	21
Figura 8. Diagrama de Jablonski	23
Figura 9. Estructura de O-Fenilendiamina	24
Figura 10. Estructura de la fenazina	26
Figura 11. Sitios de adición de grupos funcionales de la fenazina	26
Figura 12. Fenazinas terpenoides	27
Figura 13. Fenazinas derivadas de ácido safenico	27
Figura 14. Estructura de la molécula fenazoviridina	28
Figura 15. Estructura de la molécula 2, 3 diaminofenazina	29
Figura 16. Clasificación de materiales porosos	29
Figura 17. Constitución básica de un MOF	31
Figura 18. Estructura de coordinación de BioMOF-1	34
Figura 19. Imágenes de la síntesis solvotermal de BioMOF-1	38
Figura 20. Imagen de cristales de BioMOF-1	38
Figura 21. Viales con mezcla OPD-cloruro de hierro	39
Figura 22. Películas de PVC con cristales	40
Figura 23. Imagen de microscopio óptico utilizado	42
Figura 24. Imagen de SEM utilizado	42
Figura 25. Difractómetro de rayos X utilizado	43
Figura 26. Equipo de difracción de rayos X para monocristal	44
Figura 27. Equipo de infrarrojo	45
Figura 28. Analizador térmico Netzsch	45
Figura 29. Equipo de adsorción de gases	46
Figura 30. Espectrofotómetro UV-vis	47
Figura 31. Espectrofotómetro de fluorescencia	47
Figura 32. Comparación de cristales sintetizados vs modificados	48
Figura 33. Microfotografías de BioMOF-1	49
Figura 34. Microfotografías de DAP	50
Figura 35. Microfotografías DAP-BioMOF-1	50
Figura 36. Patrones de difracción de rayos X	52
Figura 37. Espectro comparativo de IR de BioMOF-1, DAP, DAP-BioMOF-1	53
Figura 38. Análisis TGA	54
Figura 39. Isotermas de adsorción	56
Figura 40. Espectros UV-vis de DAP	57
Figura 41. Espectros UV-vis de dopamina	58
Figura 42. Espectros UV-vis de DAP-dopamina	58
Figura 43. Línea de tendencia de concentración de DAP-absorbancia UV	59
Figura 44. Gráfico de liberación de DAP con respecto al tiempo	60
Figura 45. Espectros de emisión de fluorescencia	61
Figura 46. Línea de tendencia concentración de DA vs intensidad de emisión	62

# I. INTRODUCCIÓN

Sin tener consciencia del funcionamiento de nuestro cuerpo realizamos tareas diversas tanto motoras como cognitivas; es impresionante saber que todas y cada una de estas actividades se encuentran moduladas por un órgano, el cerebro, que es el encargado de transmitir señales por medio de células nerviosas (neuronas) a través de nuestro cuerpo para regular toda clase de respuesta biológica, es por ello que este valioso órgano ha sido objeto de un intensivo estudio.

Desde antes del año 1921 se creía que las funciones neuronales eran reguladas solo mediante impulsos eléctricos, sin embargo, Otto Loewi ganador del premio nobel cambio el panorama acerca de la fisiología de la comunicación neuronal demostrando que las neuronas se comunican entre sí por medio de la liberación de sustancias químicas, estas biomoléculas son llamadas neurotransmisores. Desde 1921 hasta ahora se han descubierto más de 60 tipos diferentes de neurotransmisores.<sup>1, 2</sup>

Los neurotransmisores, son moléculas sintetizadas por el cuerpo (específicamente por células nerviosas), que tienen como función la transmisión de señales capaces de alterar funciones biológicas de manera aguda o crónica (moduladas mediante estimulaciones o inhibiciones de manera rápida o lenta), son tan específicos que las células diana necesitan receptores apropiados para cada neurotransmisor

El neurotransmisor conocido como dopamina, es una de las sustancias químicas más conocidas e importantes, se encuentra asociado con procesos cerebrales vitales actúa como mensajero químico crucial.<sup>3</sup> Su participación en procesos biológicos es tan amplia que abarca desde la regulación de algunas funciones como movimiento, memoria, respuesta emocional, etc.<sup>4, 5</sup> Su ausencia, subexpresión, hiperexpresión o mal función de receptores da como resultado desordenes neuronales tales como Parkinson, esquizofrenia, hipertensión, depresión, disfunción muscular, feocromositoma, etc.<sup>3, 6-8</sup> Por esta razón el análisis de la concentración de dopamina en fluidos biológicos tales como orina o sangre, es un importante indicador biológico para diagnóstico médico.<sup>7, 9, 10</sup>

El continuo mejoramiento de nuevas técnicas de reconocimiento molecular envuelve métodos como interacciones electrostáticas, transferencia de carga, transferencia electrónica foto-inducida (PET, por sus siglas en inglés), técnicas basadas en enzimas, balizas moleculares u oligobalizas, entre otras. Sin embargo muchas técnicas actualmente, son muy costosas e incapaces de sustituir técnicas convencionales de análisis.<sup>11-14</sup> Además, los sistemas de detección de dopamina actuales tienen una gran deficiencia al detectar concentraciones in vivo de dopamina.<sup>3</sup> Cabe destacar que algunos métodos hacen uso de químicos tóxicos que promueven la atenuación de funciones celulares, o incluso la muerte celular.<sup>15</sup>

Recientemente, oligómeros redox tales como poli-O fenilendiamina (PoPDA) han recibido atención considerable debido al incremento de sus aplicaciones en una variedad de dispositivos como sensores, baterías orgánicas, diodos, electrocatalizadores, etc.<sup>16-18</sup> Se ha demostrado que los compuestos basados en O-Fenilendiamina (o-PD) son cromógenos y pueden ser frecuentemente utilizados como sustratos reporteros para la cuantificación de catálisis enzimática debido a que los derivados de estas moléculas exhiben sensibilidad fluorescente con una gran diversidad de compuestos debido a interacciones biológicas.<sup>19, 20</sup>

La potencial aplicación de un sistema basado en o-PD tal como la molécula homodimérica 2, 3 diaminofenazina (DAP) en ensayos de sensibilidad fluorescente para la detección de dopamina es una técnica alternativa prometedora entre las metodologías actualmente utilizadas tales como cromatografía de alta resolución (HPLC), electroforesis capilar o ensayos ELISA, que representan técnicas en muchas ocasiones imprácticas para la determinación in vivo de dopamina debido a bajas concentraciones encontradas en tejidos biológicamente relevantes, que de acuerdo con estudios reportados, la concentración de dopamina in vivo (fluidos cerebrospinales) se encuentra en el rango de 0.5 – 25nM.<sup>3, 21-24</sup> La molécula DAP, es por tanto de particular interés, empleada satisfactoriamente para la determinación de analitos en espectro análisis y electroquímica debido a sus propiedades de luminiscencia haciéndolo ideal como sensor para la determinación de muestras.<sup>13, 23, 25</sup>

Sin embargo, el uso de DAP como sensor en sustancias acuosas tiene como desventaja la pérdida por exceso de la molécula sin interactuar con el analito a reconocer, por ello es necesario un sistema hospedero de liberación prolongada que maximice el uso eficiente de la molécula sensor, cabe destacar que podemos encontrar este tipo de estructuras en compuestos cristalinos denominados BioMOF's.

Los compuestos denominados como redes metal orgánicas (MOF's por sus siglas en inglés) son estructuras cristalinas porosas constituidas por centros metálicos y ligantes orgánicos coordinados, que han ganado atención considerable debido a sus múltiples aplicaciones como separación de dióxido de carbono, almacenamiento molecular, catálisis y liberación de medicamentos entre otras.<sup>26</sup> Una subclase de estos materiales porosos son los denominados BioMOF's como los basados en zinc y adenina con carboxilatos como puentes entre ligantes dando como resultado una alta área superficial, elevada porosidad y una estructura estable.<sup>27</sup>

En consecuencia, su alta porosidad confiere a la estructura cristalina sitios con una alta capacidad de almacenamiento y de absorción, además su tamaño de poro permite la posibilidad de incluir pequeñas moléculas huésped.<sup>28, 29</sup>



## II. JUSTIFICACIÓN

La molécula conocida como dopamina es un importante neurotransmisor producido por las neuronas dopaminérgicas establecidas en la conocida sustancia negra y del área tegmental ventral del mesencéfalo, así como en algunos núcleos hipotalámicos.

Su función es compleja pues se encuentra relacionada con distintos mecanismos biológicos, tales como, vasodilatación renal, diuresis, natriuresis; control de la náusea etc. Cabe mencionar que la dopamina también juega un rol fundamental en procesos cognitivos como el placer, el dolor, el sueño, el humor, la atención y el aprendizaje.

Debido a que regula gran cantidad de procesos, tanto biológicos como cognitivos, una mal función o ausencia de dopamina desemboca inevitablemente en patologías como la esquizofrenia, desordenes de humor, desordenes obsesivos-compulsivos, déficit de atención, síndrome de tourette, Parkinson, entre otros.<sup>30</sup>

Actualmente, el estudio del comportamiento y presencia de la molécula en diferentes partes del cuerpo es de gran interés médico-científico, de esta manera se han desarrollado gran cantidad de dispositivos que detecten y cuantifiquen la presencia de dopamina en tejidos biológicos, a pesar de los innumerables ensayos y protocolos publicados, los sensores de dopamina tienen grandes problemas en el rubro económico, así como también de la aplicación poco práctica de algunos sensores y su limitada sensibilidad ante concentraciones de dopamina in vivo.

Ante esta problemática, el objeto de este estudio es presentar una alternativa, elaborando un sensor, práctico, de bajo costo y de una sensibilidad considerable, basándonos en el comportamiento fluorescente de las moléculas poliméricas conductoras reaccionando ante moléculas como dopamina.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 General

Elaborar un sensor para dopamina a partir de la incorporación de una molécula cromogénica en una red metal orgánica con la finalidad de crear un dispositivo económico, reusable, práctico y capaz de detectar soluciones nano molares de la molécula a partir de la variación de emisión fluorescente con respecto a diferentes gradientes de dopamina, todo este sistema con potencial aplicación de detección in vivo.

#### 3.2 Específicos

- Sintetizar red metal orgánica denominada BioMOF-1 con buenas características (Tamaño, forma)
- Lograr la síntesis de la molécula cromogénica (2,3 diaminofenazina)
- Realizar la incorporación exitosa de la molécula sensor en el cristal de BioMOF-1 (red metal orgánica)
- Relacionar la intensidad de fluorescencia emitida por el sensor con las diferentes concentraciones de dopamina presente en las soluciones.
- Determinar el rango de sensibilidad del sensor mediante la intensidad fluorescente emitida por el sensor.

## IV. HIPÓTESIS

La molécula sensor se encuentra almacenada al interior (dentro de las cavidades porosas) de la estructura del cristal de BioMOF-1.

La intensidad de emisión fluorescente está directamente relacionada a la concentración de dopamina en solución con el complejo (DAP-BioMOF-1).

## V. REVISIÓN LITERARIA

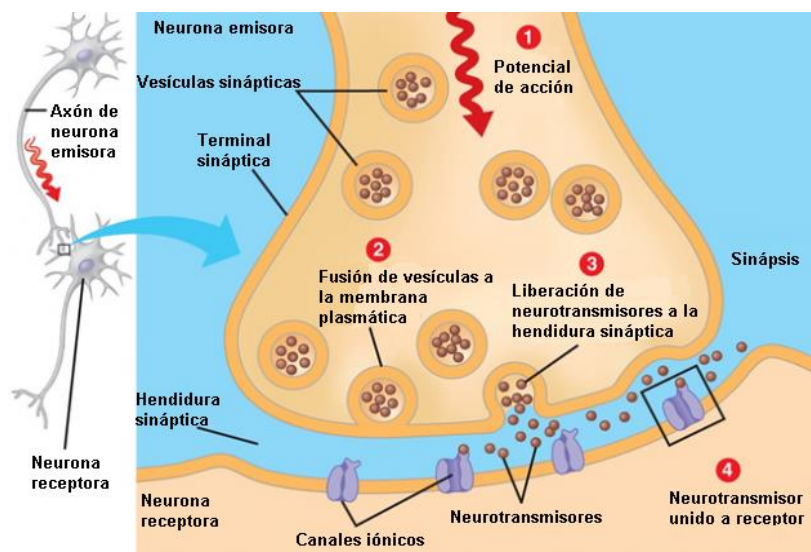
### 5.1 Neurotransmisores

El cerebro es uno de los órganos más complejos e importantes para nosotros, por esta razón, es obligado estudiarlo y entenderlo, a pesar de su constitución altamente compleja, podemos destacar que la estructura básica del sistema nervioso son las neuronas, estas células nerviosas se encargan de la comunicación interneuronal a través de un proceso llamado sinapsis, que consiste en la liberación de moléculas llamadas neurotransmisores en las hendiduras sinápticas y en los alrededores de los fluidos extracelulares mediante mecanismos de despolarización de la membrana celular a través del cuerpo axónico de la célula nerviosa.<sup>30, 31</sup>

Dentro de una neurona diferentes moléculas mensajeras son las causantes de emitir diferentes reacciones a través de la membrana celular mediante grupos de mensajeros químicos liberados mediante vesículas, estas son liberadas al espacio extracelular.

La alta especificidad de esta mecánica permite a las moléculas mensajeras estimular diferentes neuronas objetivo, de esta manera se desencadena mecanismos electroquímicos a través de las células postsinápticas.

De acuerdo a la respuesta de la célula postsináptica esta puede ser entendida como una respuesta inhibitoria o excitatoria, es decir, una neurona postsináptica puede generar un potencial de acción por modulación de canales iónicos ante una señal excitatoria o suprimir el mecanismo de despolarización en caso de recibir una respuesta inhibitoria.<sup>32, 33</sup> (Figura 1)



**Figura 1.** Sinapsis esquematizada en la hendidura sináptica, en la célula presináptica se aprecia la formación de vesículas con neurotransmisor liberadas mediante exocitosis, en la célula postsináptica se muestra una membrana citoplasmática conformada con canales iónicos regulados por ligando (neurotransmisor) y por receptores asociados a proteínas G. Imagen Pearson education (2009)

De esta forma, los mecanismos de excitación e inhibición neuronal difícilmente serían llevados a cabo sin los importantes mensajeros químicos, pieza clave de la comunicación célula-célula, que tuvieron como inicio los estudios de la química cerebral hipotalámica llevados a cabo cerca de 1960 por Roger Guillemin, desde entonces hasta ahora se han descubierto más de 60 tipos diferentes de neurotransmisores.<sup>2, 30, 34</sup>

Los neurotransmisores son agentes transmisores de información, causantes de realizar funciones que se traducen en diversas funciones antes descritas. En general, cada neurotransmisor en conjunto con su receptor activan respuestas específicas, de esta manera la vasta cantidad de neurotransmisores tienen diferentes formas de clasificación.<sup>32</sup>

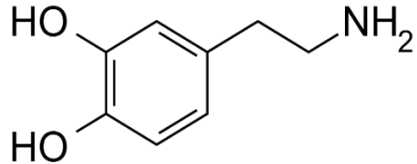
Una manera de clasificarlos es la siguiente, por su naturaleza química, en aminoácidos, péptidos, aminas biogénicas y gases.<sup>32, 34</sup> (Tabla 1)

**Tabla 1.** Tabla de neurotransmisores más comunes, clasificados de acuerdo a su naturaleza química.

	NEUROTRANSMISOR	FUNCIÓN
AMINAS	Acetilcolina	Excitatoria
	Norepinefrina	Contracción muscular, agregación plaquetaria, etc.
BIOGÉNICAS	Dopamina	Placer, estímulos de recompensa, memoria, etc.
	Serotonina	Humor
AMINOÁCIDOS	Histamina	Regula la respuesta alérgica
	Glutamato/Aspartato	Mayormente excitatorios, plasticidad sináptica.
	GABA/ Glicina	Mayormente inhibitorios.
	Oxitocina/ vasopresina	Contracción uterina, reabsorción del agua en el hígado
PÉPTIDOS	Sustancia P	Regula el dolor (mayormente en intestino)
	Péptido vaso-activo intestinal (VIP) Colecistoquinina	Regula principalmente funciones gastro-intestinales
	Péptidos opioides	Analgésicos
GASES	NO	Relajación de músculo liso
	CO	
	H <sub>2</sub> S	Efecto cardio-protector durante la episodios de isquemia

## 5.2 Dopamina

El neurotransmisor conocido desde la década de los 50's como dopamina (DA) es una catecolamina producida en las neuronas dopaminérgicas siendo detectada en el sistema nervioso central por primera vez en 1958, y aunque esta población represente menos del 1% de la población neuronal del cerebro, el neurotransmisor cumple con una variedad de funciones bastante amplia, y su deficiencia, degeneración o mal función resulta en una cantidad enorme de desórdenes neurológicos.<sup>35</sup> (Figura 2)

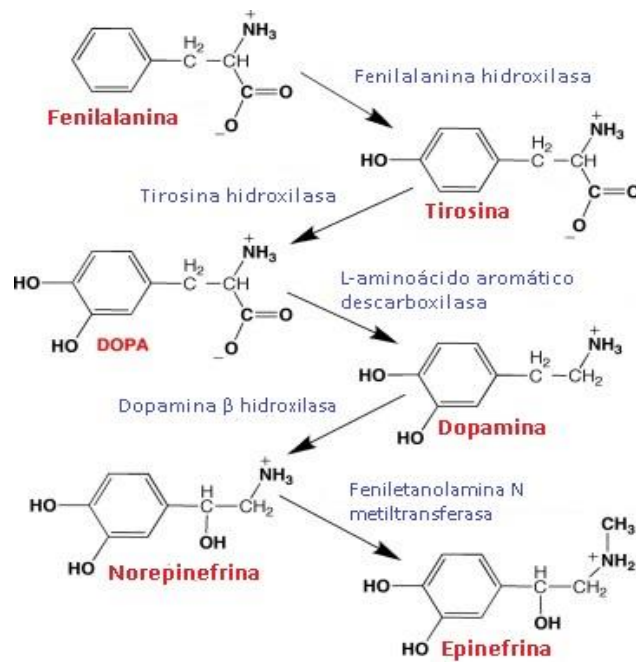


**Figura 2.** Estructura del neurotransmisor denominado dopamina

### 5.2.1 Síntesis de dopamina

La dopamina es producto de la síntesis en neuronas dopaminérgicas distribuidas en el área tegmental ventral, la sustancia negra y el núcleo arcuato del hipotálamo; la DA es un neurotransmisor derivado de la conversión de aminoácidos empezando con la fenilalanina convertida a tirosina (producida en el hígado) mediante la acción enzimática de la fenilalanina hidroxilasa, una vez sintetizada la tirosina, esta se convierte en L-DOPA por la enzima tirosina hidroxilasa (TyrH), el cofactor tetrahidrobiopterina (BH4) y oxígeno molecular, este punto de conversión se considera crucial debido a que gracias a los trabajos de Nagatsu y cols.<sup>36</sup> y de Levitt y cols.<sup>37</sup> es considerado este punto como uno de regulación ya que la enzima tirosina hidroxilasa actúa como una enzima limitante en la síntesis de la

catecolamina, finalmente, la molécula L-DOPA es entonces convertida en dopamina por la acción de la enzima Dopa descarboxilasa.<sup>30, 38</sup> (Figura 3)



**Figura 3.** Proceso enzimático de síntesis de dopamina y precursores. Imagen Daubner, S. C., Le, T., & Wang, S. (2011).

### 5.2.2 Distribución de dopamina

Las neuronas dopaminérgicas son localizadas principalmente en tres zonas del tronco encefálico. Estas zonas son conocidas como A8, A9 y A10, las cuales corresponden a regiones del cerebro llamadas (A8) campo retrorubral (RRF); (A9) sustancia negra pars compacta, y (A10) el área tegmental ventral (VTA).<sup>32</sup> Estas regiones forman cuatro sistemas neurales (Figura 4) gracias al desplazamiento axónico de cada una de las neuronas de cada núcleo llamadas como:

- Vía dopaminérgica nigro-estriatal

Esta vía encargada del aprendizaje y del movimiento corporal complejo se encuentra compuesta de neuronas que dan inicio en la zona A9 con dirección a la región del cuerpo estriado. Esta vía incluye regiones como el núcleo caudado y el putamen, la mal función de la vía causa mal función motora (enfermedad de Parkinson).<sup>39</sup>

- Vía dopaminérgica mesolímbica

Este circuito es fundamental para el aprendizaje bajo ciertas condiciones de incentivación, conocido como el condicionamiento clásico o condicionamiento Pavloviano, esta vía es originada en la zona A10 y parte del núcleo A9 proyectando sus axones hacia el cuerpo estriado incluyendo también el núcleo accumbens (NAc), el tubérculo olfatorio, el septum la amígdala central y el núcleo del lecho de la estría terminal.<sup>40</sup>

- Vía dopaminérgica mesocortical

Este es el tercer grupo neuronal que se encuentra originado en las zonas A9 y A10 y termina su prolongación axónica en diversas regiones de la corteza cerebral, las zonas que abarca la vía repercuten en la atención y la memoria de corto plazo.

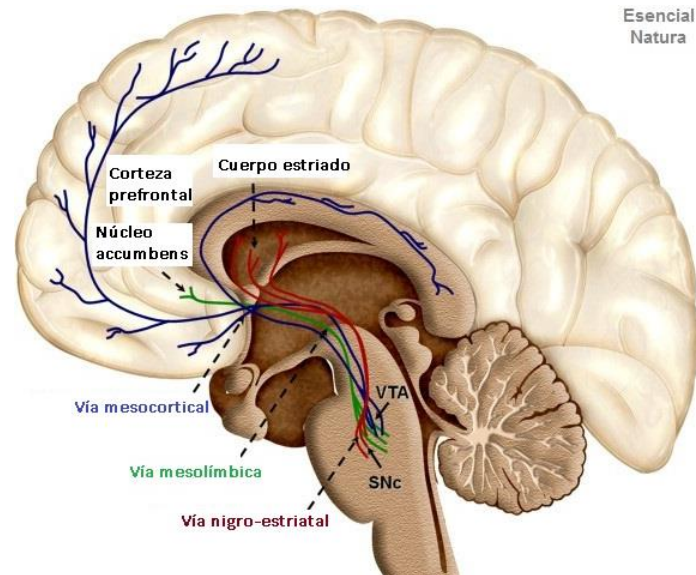
- Vía dopaminérgica tuberoinfundibular

Las proyecciones axónicas de células dopaminérgicas en la vía tuberoinfundibular realizan la función de inhibir tónicamente la liberación de prolactina. Esta vía se encuentra compuesta de proyecciones dopaminérgicas desde el hipotálamo a la zona infundibular. La consecuencia más importante de esta vía es el bloqueo de receptores D<sub>2</sub> por fármacos como los antipsicóticos que aumentan los niveles de prolactina.<sup>41</sup>

En este conjunto de vías dopaminérgicas el núcleo accumbens juega un rol importante, de manera general, NAc se divide en dos regiones, la primera es conocida como "Shell" y la siguiente es conocida como "core". La primera región es parte de un complejo llamado como la amígdala extendida propuesta por Heimer, esta estructura envuelve la integración emocional relacionado al buen



funcionamiento motor autónomo (movimientos viscerales) y también las regula las respuestas hormonales.<sup>30, 32, 34, 40, 42</sup> Por otro lado el “core” del NAc pertenece a un grupo de áreas cerebrales llamado sistema estriato-palidal, estas estructuras son fundamentales para integración de respuestas motoras.<sup>30, 41</sup> Lo anterior no quiere decir que las neuronas dopaminérgicas no solo reaccionan ante el NAc, también lo hacen áreas de la amígdala y también partes del sistema septo-hipocampal.



**Figura 4.** Circuitos cerebrales de acción dopaminérgica

### 5.2.3 Mecanismos de liberación de dopamina

Debido a que la dopamina es sintetizada en el citoplasma de las terminales dopaminérgicas, los mecanismos que necesita el neurotransmisor para ser liberado al espacio sináptico van desde ser liberado de manera directa al espacio extracelular hasta ser transportado mediante vesículas sinápticas para luego ser liberadas mediante exocitosis.

El proceso de exocitosis consiste en la acumulación de neurotransmisor en una vesícula distribuida dentro de la membrana celular presináptica para finalmente ser liberada mediante la fusión de membranas (tanto de la vesícula como de la

membrana presináptica), dicho así resulta simple este proceso, sin embargo este mecanismo se encuentra constituido de diferentes etapas.

La primera etapa consiste en el almacenaje de dopamina al interior de las vesículas que la transportan, todo ello se realiza mediante una proteína transportadora con 12 dominios transmembrana que permite desplazar la dopamina al interior de la vesícula mediante un gradiente electroquímico generado por una ATPasa (Bomba de protones).

Según la literatura consultada, cerca de un 90% de las vesículas sinápticas se encuentran unidas al citoesqueleto de la terminal presináptica mediante proteínas llamadas sinapsinas, estas proteínas se encuentran constituidas por dos tipos, las sinapsinas de tipo I (Ia y Ib) y de tipo II (IIa y IIb), las sinapsinas de tipo I (las más estudiadas) se unen por un extremo a la membrana de la vesícula y por el otro a la proteína actina que es constituyente del citoesqueleto de la célula. Es de esta forma que la vesícula que contiene al neurotransmisor se encuentra fijada en el citoesqueleto de la terminal presináptica de la célula nerviosa.

La siguiente etapa del proceso de exocitosis consiste en la fosforilación de las proteínas sinapsinas I y II para la liberación de la vesícula del citoesqueleto mediante la desunión de las proteínas a la vesícula y a la actina, la vesícula transportadora es entonces liberada, este proceso es llevado a cabo mediante proteínas enzimáticas reguladas por calcio, la proteína es conocida como quinasa (las quinasas también se dividen en tipo I y II) dependiente de  $Ca^{+2}$  calmodulina (CaMK I y CaMK II) que con gradientes de calcio es activada promoviendo la fosforilación de la sinapsina I, la entrada de calcio al espacio intracelular de la célula presináptica se debe a despolarizaciones de la membrana celular para la apertura transitoria de canales de calcio mediante variaciones de voltaje, es importante mencionar que la concentración de  $Ca^{+2}$  en el espacio extracelular es 1000 veces mayor que en el interior de la célula, por lo que la célula es altamente sensible gracias a la proteína llamada sinaptotagmina que se hipotetiza sea un sensor sensible al aumento de calcio a nivel intracelular.<sup>31, 35, 43</sup>

Una vez libres las vesículas, estas son fijadas (docking) a la membrana interna de la célula presináptica mediante el acoplamiento de un complejo proteico llamado SNARE, este complejo proteico consta de cuatro proteínas, RIM1, Munc13, Rab3 y la proteína Munc18 que sirven de estimulación y reclutamiento vesicular para la liberación del neurotransmisor mediante exocitosis (priming).<sup>35, 44</sup>

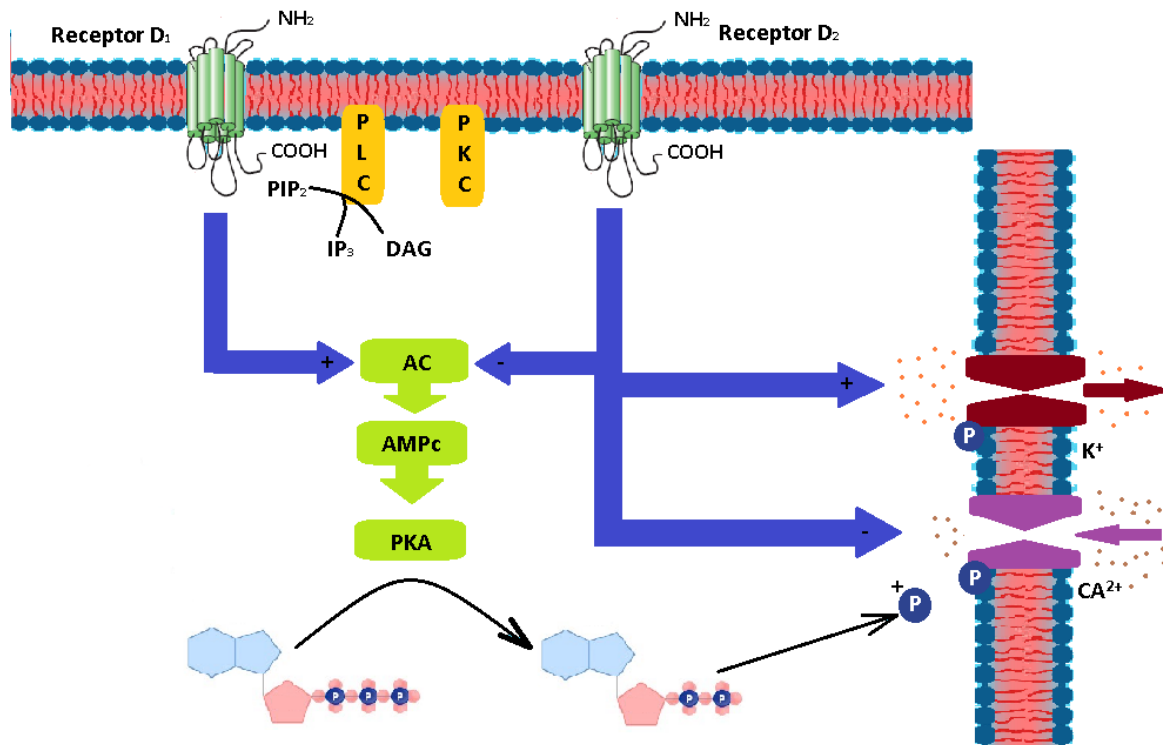
Una vez liberado el neurotransmisor al espacio extracelular su regulación depende de auto-receptores integrados en la terminal presináptica, su activación reduce por sí mismo la liberación de dopamina, el mecanismo de supresión se debe fundamentalmente a la inhibición de formación de AMPc que disminuye la actividad de las proteínas quinasas reduciendo así la fosforilación de las sinapsinas, esto se traduce en una fijación vesicular al citoesqueleto impidiendo su liberación y de la apertura de canales de  $Ca^{+2}$  reduciéndose la fusión de vesículas.<sup>35</sup>

#### **5.2.4 Mecanismos de acción**

Los mecanismos de acción que ejerce la dopamina en las células tienen una relación directa con el tipo de receptor al que la molécula se une, de este modo, el mecanismo de acción de la dopamina bajo células diana no solo depende de la vía del que provenga la DA sino también del tipo de receptor presente en la células postsinápticas.<sup>30, 41</sup> (Figura 5)

Los receptores acoplados a proteínas G de dopamina se encuentran constituidos en dos familias (familia  $D_1$  y familia  $D_2$ ) con sus respectivos subtipos, sus diferencias se encuentran básicamente en la habilidad de modular la producción de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), de ciertas propiedades farmacológicas diferenciales, además a nivel genético la familia  $D_1$  y  $D_2$  tiene diferencias en la cantidad de intrones en sus respectivas secuencias codificantes, los receptores de la familia  $D_1$  carecen de intrones en su secuencia codificante. La primera familia ( $D_1$ ) se encuentra constituida de dos subtipos de receptores, el receptor  $D_1$  y el receptor  $D_5$ , los genes que codifican este subtipo de receptor carecen de intrones en su

secuencia codificante, la distribución de los receptores de la familia D<sub>1</sub> es amplia, se encuentran formando parte en el tubérculo olfatorio, el neocóstriado, el núcleo accumbens, las islas de calleja, la amígdala, el núcleo subtalámico, la sustancia negra y el cerebelo; la familia de receptores D<sub>2</sub> incluye los receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> que al contrario de la primera familia las regiones codificantes para los receptores de dopamina contienen bastantes intrones lo cual permite a esta familia de receptores expresar variantes mediante splicing, lo cual genera una cantidad enorme de isoformas de la familia de receptores D<sub>2</sub>, la familia de estos receptores son encontrados en la región del neocóstriado, el tubérculo olfatorio, la capa molecular de la formación hipocámpal, el núcleo accumbens, las islas de calleja y el área tegmental ventral.<sup>30, 41</sup>



**Figura 5.** Cascadas de señalización derivadas de las familias de receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>

Como se mencionó anteriormente, la activación de proteínas G estimula el funcionamiento de la enzima adenilil ciclasa (AC) (EC 4.6.1.1) y por tanto la alta producción de AMPc, esta transducción de señales es una característica propia de

la activación de receptores D<sub>1</sub>, así también en la corteza cerebral frontal la estimulación de la familia D<sub>1</sub> produce la activación de la fosfolipasa C que inicia la síntesis de segundos mensajeros tales como 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG); mientras que la inhibición de la síntesis de AMPc es observada con la activación de la familia de receptores D<sub>2</sub> mediante la activación de una variante de proteínas G (G<sub>ai</sub>), a diferencia de la primer familia, los receptores D<sub>2</sub> también pueden modular corrientes iónicas activadas por voltaje, inhibiendo canales de CA<sup>2+</sup> y abriendo canales de K<sup>+</sup> mediante proteínas G<sub>1</sub>; la región i de la proteína se encuentra constituida por aproximadamente 414 aminoácidos, la función de esta región es hipotetizada como fundamental para la inhibición de la formación de la enzima AC.<sup>35</sup>

### **5.3 Enfermedades derivadas de la disfunción de dopamina**

Muchas son las funciones cerebrales en las que el neurotransmisor dopamina tiene un rol fundamental, por tanto, una falla en cualquiera de las vías dopaminérgicas antes descritas representa para el cuerpo graves disfunciones corporales.

Entre las disfunciones más comunes encontramos la enfermedad del Parkinson, que desde los estudios de Ehringer y Hornykiewicz en 1960, se sabe que los portadores de esta enfermedad tienen una disminución notable de dopamina en el sistema nervioso central (SNC).<sup>45</sup> Si bien se sabe que la disminución de DA en el SNC podría ser uno de los factores de esta enfermedad aún se encuentran en estudio diferentes zonas del encéfalo implicadas también en la enfermedad, recientemente se sugiere la implicación de los efectos de transmisión dopaminérgica sobre los comandos motores en áreas como el neostriado, la sustancia negra reticulada y el núcleo subtalámico.<sup>30, 35, 39</sup>

El uso del precursor dopaminérgico, L-DOPA en conjunto con inhibidores enzimáticos son uno de los principales tratamientos farmacológicos existentes en la actualidad, debido a que L-DOPA puede atravesar la barrera hematoencefálica y

ser capturada por neuronas remanentes dopaminérgicas o también por neuronas aminérgicas que convierten el precursor a dopamina.<sup>35, 39</sup>

Otra disfunción dopaminérgica en la esquizofrenia, al igual que con el trastorno anterior, actualmente no existe una causa bien definida, sin embargo existe la hipótesis de que el trastorno se debe en parte a un aumento de actividad de transmisión dopaminérgica.<sup>46</sup> Actualmente esta hipótesis se encuentra fuertemente sustentada debido a que los psicoestimulantes, que hiperactivan la transmisión dopaminérgica, inducen a estados de alteración psicótica, además de síntomas esquizofrénicos como euforia y alucinaciones auditivas.<sup>35, 46, 47</sup>

Su tratamiento hoy en día tiene severas dificultades debido al uso de neurolépticos que tienen por consecuencia alteraciones motoras como rigidez muscular y acinesia (falta de movimiento, en etapas iniciales de su administración) y posteriormente discinesia tardía, todo ello debido al bloqueo de los receptos presentes en los ganglios basales, principalmente en el neostriado.<sup>35, 41</sup>

Los desórdenes de humor también son relacionados con la actividad dopaminérgica, podemos encontrar un ejemplo en la depresión que se relaciona con la insuficiencia en la función neurológica de la dopamina, ensayos que soportan estas teorías son basados en el estudio de comportamientos conductuales ante el suministro de drogas tales como tirosina, anfetamina o bupropión que son drogas que incrementan la concentración de dopamina en el sistema meso límbico en el organismo y reducen los síntomas de depresión.<sup>30</sup>

Por último, una de las enfermedades más frecuentes por la deficiencia en dopamina es la Epilepsia, al igual que las enfermedades descritas anteriormente sus causas aún no se encuentran determinadas plenamente, se cree que un detonante podría ser su poca actividad en la vía mesolímbica.<sup>30, 35</sup>

## 5.4 Sensores para dopamina

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) la definición de un sensor es el de un dispositivo que de una manera selectiva responde a la concentración de una especie química (analito) proveyendo datos analíticos cuantitativos o semi-cuantitativos. De manera general, los sensores biológicos

**Tabla 2.** Clasificación de sensores de acuerdo al tipo de transductor (biosensores) se encuentran constituidos por tres elementos básicos, un receptor, un transductor (aquel que transforma la concentración del analito en una señal eléctrica medible) y un separador (un agente o dispositivo que separa el receptor del transductor).<sup>48</sup> (Tabla 2)

TIPOS DE SENSORES	
SENSORES ELECTROQUÍMICOS	Interacción electroquímica entre el analito y el electrodo (pH).
SENSORES ÓPTICOS	Fenómenos ópticos resultantes de la interacción del analito y el receptor (sensores de moléculas gaseosas).
SENSORES MÁSICOS	Registro del cambio de masa sobre una superficie modificada (inmunosensores).
SENSORES TÉRMICOS	Efecto calórico resultante de la interacción entre el analito y el receptor (sensores enzimáticos).

Debido a la gran importancia de la dopamina como neurotransmisor en el sistema nervioso central se han desarrollado una gran variedad de dispositivos que permitan monitorear su presencia, concentración, interacción y funcionamiento pues aún se tienen muchas incógnitas acerca de su profunda función y participación en diferentes mecanismos de transducción de señales en sistemas dopaminérgicos, de esta manera, la comprensión de la actividad del neurotransmisor permitirá desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el uso de nuevos fármacos.

Cada año se registran una gran cantidad de publicaciones acerca del desarrollo de sensores precisos y selectivos para dopamina, las técnicas analíticas más usadas y publicadas van desde ensayos enzimáticos, cromatografías líquidas, espectrometrías de masa hasta electroforesis capilar, todas ellas con detección óptica o electroquímica.<sup>49</sup>

A pesar de la variedad de dispositivos creados para el mismo fin existen pocas metodologías realmente promisorias, tal es el caso de las técnicas electroquímicas que representan una forma rápida y un equilibrado costo-beneficio en la detección de dopamina, sin embargo aún existen parámetros a mejorar tales como la sensibilidad, selectividad, estabilidad y biocompatibilidad de los dispositivos usados como sensores.<sup>7, 13, 49</sup>

Los sensores electroquímicos pueden ser divididos en dos clases, los biosensores (constituidos por enzimas, anticuerpos, bacterias, ácidos nucleicos, moléculas biológicas, etc.) y los sensores químicos (que usualmente se encuentran compuestos de óxidos metálicos, polímeros orgánicos, etc.) diferenciándose principalmente en la capacidad de los primeros sensores de integrar al sensor un agente de reconocimiento de origen biológico, a diferencia de los sensores químicos que contienen elementos no biológicos.<sup>49</sup>

El desarrollo de biosensores para la identificación de dopamina es un área productiva gracias al continuo mejoramiento de sus propias deficiencias incorporando materiales modificados en conjunto con moléculas biológicas para un incremento de las capacidades del sensor. La creación de electrodos con biomoléculas ha ido en incremento actualmente, gracias a la estabilidad y sobre todo la biocompatibilidad que posee este tipo de electrodos sobre otros. La interacción general de estos “Bio-electrodos” con el neurotransmisor es gracias a interacciones redox con grupos funcionales de la biomoléculas, por ejemplo, los grupos carboxílicos.<sup>49</sup>

Los sensores químicos presentan algunas ventajas frente a los biosensores debido a la alta estabilidad, reproducibilidad y remarcable vida media. El uso de materiales



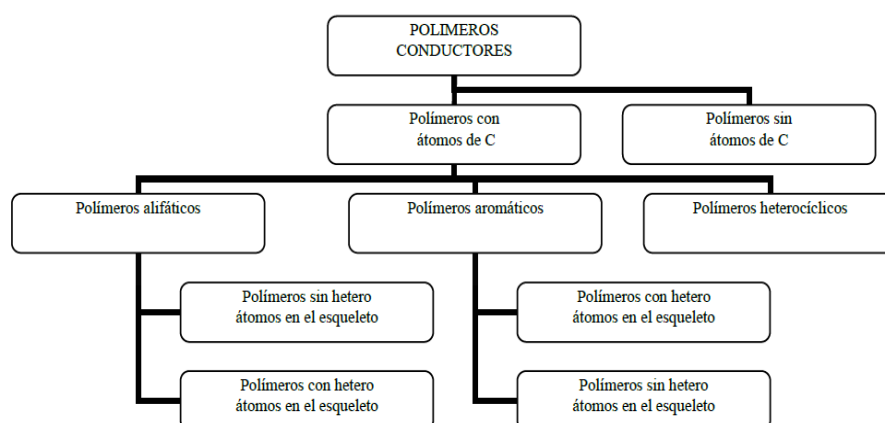
para mejorar la afinidad y evitar las interferencias del analito a medir, es más extenso y ampliamente estudiado. Sin duda, una alta cantidad de estudios son enfocados en el uso de métodos de detección amperométricos.

## 5.5 Polímeros electroconductores

Los polímeros conductores son macromoléculas que tienen la característica de conducir corriente eléctrica, su conductividad se encuentra de forma intrínseca derivada de la conjugación de electrones  $\pi$  a lo largo de toda la cadena polimérica, su conductividad también puede variar de acuerdo con el carácter modificable de los enlaces y átomos enlazados.

No obstante, existen también macromoléculas poliméricas electroconductoras que deben su propiedad conductora a la inserción de materiales conductores tales como metales, grafito, etc., y reciben el nombre de polímeros extrínsecamente conductores.

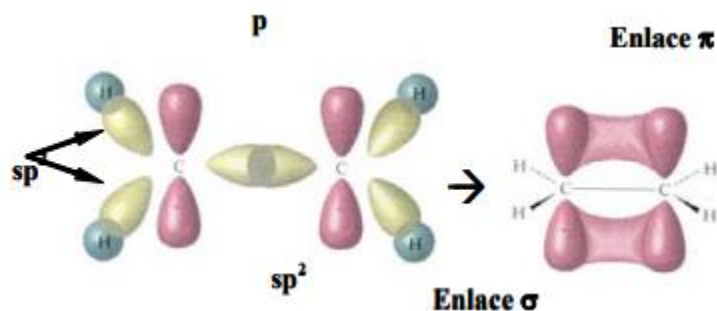
De manera general tenemos entonces dos tipos de polímeros electroconductores, los polímeros intrínsecamente conductores (PCI) y los polímeros extrínsecamente conductores. (Figura 6)



**Figura 6.** Clasificación general de polímeros conductores. Imagen de Arias Pardilla, J.

Los polímeros conductores (CPs) conjugados fueron investigados profundamente en 1975 por Hideki Shirikawa formando películas de poliacetileno al sintetizar cadenas poliméricas con enlaces en posición trans, esta conformación da lugar a electrones  $\pi$  conjugados (electrones deslocalizados) que al ser halogenados con cloro logró sintetizar uno de los primeros polímeros conductores dopados de la historia.

Los polímeros intrínsecamente conductores como el poliacetileno, polianilina, entre otros; contienen átomos de carbono con hibridación  $sp^2$  a lo largo de la cadena principal, creando de este modo enlaces  $\sigma$  covalentes, este tipo de enlace no coordina un orbital p (generalmente  $p_z$ ) por lo cual, estos orbitales no coordinantes se terminan solapando formando un enlace  $\pi$ . Esto también da como resultado una presencia de dobles enlaces C=C alternados a lo largo de todo el polímero, cabe destacar que los polímeros conjugados no solo se presentan entre átomos de carbono, sino también con heteroátomos como el azufre, el nitrógeno u oxígeno. (Figura 7)



**Figura 7.** Esquematización de formación de enlace  $\pi$  de orbitales no enlazados ( $p_z$ ) de la molécula de eteno. Imagen de Cabriales R. Carlos; Luminiscencia en polímeros

A partir del descubrimiento de los polímeros conductores en 1975, se han desarrollado una gran cantidad de investigaciones en este campo de investigación, desde comprender los fundamentos fisicoquímicos de las macromoléculas interactuantes mediante enlaces  $\pi$ , hasta la creación de nuevos materiales con notables propiedades mecánicas, así como buenas propiedades eléctricas y ópticas

como los que se presentan en materiales como metales o semiconductores. Muchos de estos polímeros conductores son llamados polímeros redox tienen por característica principal tienen grupos funcionales amino o carboxílico que interactúan con la molécula de interés, además, de contar con estabilidad química, elevadas eficiencias en separación de gases y alta conductividad eléctrica.<sup>50, 51</sup>

El uso extendido de CPs ha provocado un intensivo estudio en la síntesis de las macromoléculas, actualmente existe una infinidad de publicaciones acerca de la síntesis de los polímeros, de manera general podemos englobar su síntesis en tres principales.

La síntesis directa ha sido un método utilizado principalmente por Shirikawa, y consiste en el uso de un catalizador para obtener la polimerización de los monómeros gracias al contacto directo entre ambas especies químicas, por ejemplo la metodología desarrollada por Shirikawa consistente en el recubrimiento de un recipiente de cristal con una aleación de aluminios alquílicos con haluros de titanio (catalizador Ziegler Natta) en contacto con acetileno obteniendo como resultado películas de poliacetileno.

La polimerización química es otro tipo de síntesis que involucra un agente oxidante para iniciar la polimerización de los monómeros presentes generalmente en disolución. Como ejemplo tenemos la síntesis de polipirrol derivado de la oxidación de pirrol en presencia de  $Fe^{3+}$ .

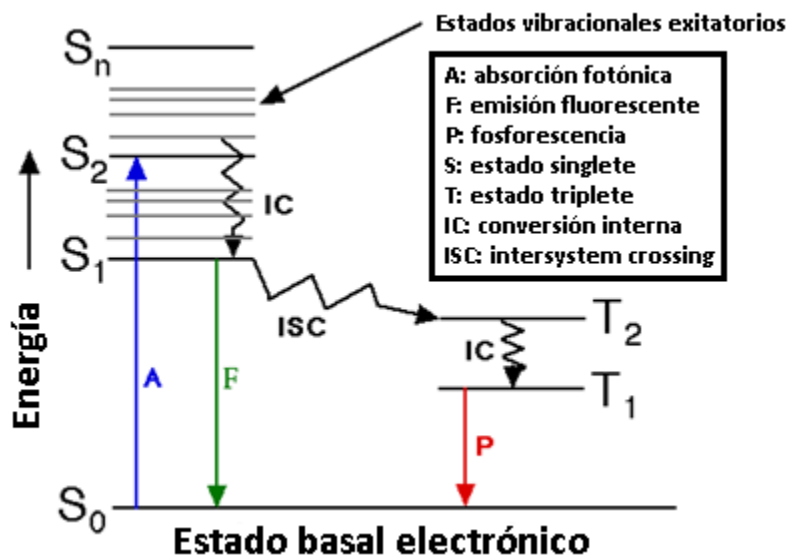
La síntesis electroquímica, en comparación con la síntesis anterior, el agente oxidante no es una especie química sino la superficie de un electrodo, actualmente la polimerización electroquímica es una de las metodologías más populares debido a su fácil aplicación, tiempo reducido de síntesis, entre otros.

Debido a la facilidad de síntesis, polímeros como politiofeno, polipirrol, polianilina y finalmente poli o-fenilendiamina (PoPDA) han generado gran atención debido al alto rendimiento que muestran al ser usadas en aplicaciones como sensores, baterías orgánicas, diodos, electrocatalizadores, así como también la capacidad de ser

dopados con diferentes elementos como yodo, bromo, entre otros para mejorar su conductividad.<sup>16, 23</sup>

### 5.5.1 Luminiscencia de polímeros electroconductores

La luminiscencia es un proceso de emisión de luz proveniente de una molécula denominada fósforo. Este proceso ocurre como un resultado de transiciones electrónicas radiantes, es decir, cuando un electrón pasa de un nivel energético mayor (previamente excitado) a uno de menor energía, es en esta transición que la diferencia de energía del estado excitado al estado basal es emitida en forma de fotones. Cabe destacar que la longitud de onda de luz emitida es característica de cada material emisor.<sup>52, 53</sup> (Figura 8)



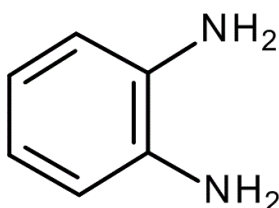
**Figura 8.** Diagrama de Jablonski explicando del proceso de emisión de un material

Según el tipo de proceso lumínico que se presente puede ser de varios tipos, fotoluminiscencia, termoluminiscencia, quimioluminiscencia, triboluminiscencia (energía mecánica), electroluminiscencia, bioluminiscencia.<sup>53</sup>

Otra manera de clasificar el fenómeno luminiscente es de acuerdo a la duración de la emisión, pues una vez terminada la excitación, el proceso de emisión fotónica comienza a decaer de forma exponencial hasta dejar de emitir radiación, si el proceso de emisión fotónica es del orden de  $10^{-3}$  segundos o menor denomina fluorescencia, en cambio, cuando el tiempo de emisión es prolongado (de segundos hasta horas) el fenómeno luminiscente es llamado fosforescencia.

## 5.6 Derivados de O-fenilendiamina

La molécula de O-fenilendiamina (OPD) es un compuesto orgánico cromogénico, constituido de una diamina aromática empleado para la determinación de algunos analitos. (Figura 9)



**Figura 9.** Estructura de la molécula de O-Fenilendiamina

El monómero de OPD tiene un interés especial dentro de las moléculas clasificadas como polímeros conductores (CPs), debido a que los polímeros con diaminas aromáticas presentan distintas características, por ejemplo, muestran alta reactividad sensitiva (quelante) a algunos iones metálicos como Ag(I), Cu(II), Hg(II), Pb(II) y Cr(III), o también reacciones redox con los grupos amino en las cadenas poliméricas en comparación con las moléculas de la misma clasificación.<sup>20, 54</sup>

Debido a que es una molécula electroconductora, polímeros de o-fenilendiamina (POPD) han sido usados como catalizadores, sensores y películas electrocromogénicas.<sup>16, 20</sup>

La síntesis del polímero poli-o fenilendiamina (PoPDA) es ampliamente estudiada, partiendo de la creación de polímeros de OPD básicamente de dos maneras, por electro-síntesis y por síntesis química. La aplicación de métodos electroquímicos en la obtención de PoPDA es la más empleada, sin embargo el mecanismo de electro-polimerización aún no se encuentra totalmente elucidado, debido a la variación del tamaño de oligómeros formados.<sup>16</sup>

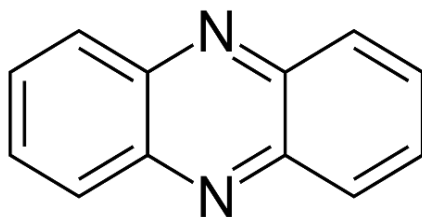
## 5.7 Fenazinas

Las fenazinas son moléculas aromáticas biológicamente activas de origen natural (constituidos como metabolitos principalmente), según la literatura, son compuestos sintetizados mayormente por especies de *Pseudomonas* y *Streptomyces* como pigmentos (por ejemplo el pigmento azul conocido como piocianina) o con actividad biológica como molécula antibiótica, por ejemplo la molécula conocida como tubercicina B o clororafina antagonistas de *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus*, sin embargo, recientemente se han encontrado diversas funciones promisorias como potenciales moléculas antitumorales, antimaláricas y antiparasitarias.<sup>55, 56</sup>

Una importante función que realizan estas moléculas en mecanismos fisiológicos bacterianos es la de reducir Fe (III) en Fe (II) que se encuentra en diversos minerales adyacentes a las colonias bacterianas. Especies como *Pseudomonas*, *Shewanella* and *Geothrix* reducen los átomos de Fe (III) mediante fenazinas sintetizadas por ellas mismas que hacen la función de moléculas redox.<sup>55</sup>

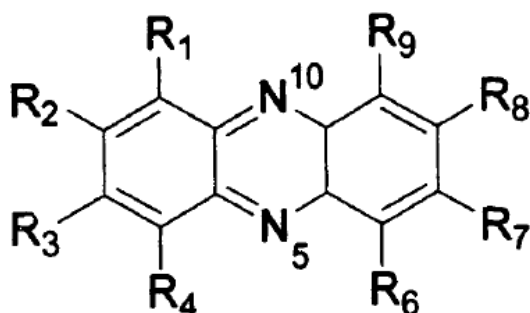
Las fenazinas son entonces un extenso grupo de heterociclos nitrogenados, se componen de más de 100 diferentes compuestos de origen natural y cerca de 6000 compuestos sintéticos. Además de sus funciones biológico-bacterianas, estos compuestos han ganado atención considerable en el ámbito biotecnológico gracias a sus propiedades físico-químicas, como las de óxido-reducción (redox), su alta pigmentación, su habilidad de cambiar de color (por ejemplo: piocianina) según pH

y estado redox, y a su potencial función como agente anti-cancerígeno.<sup>57</sup> (Figura 10)



**Figura 10.** Estructura del heterociclo nitrogenado conocido como fenazina básica

La gran variedad de compuestos basados en fenazinas tanto sintetizadas como de origen natural son producto de la gran diversidad de grupos funcionales (hidroxilo, carboxilo, etc.) que puede contener la molécula.<sup>56</sup> (Figura 11)



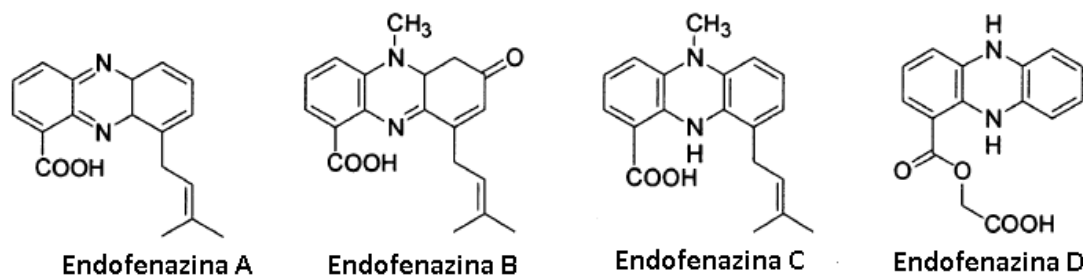
**Figura 11.** Molécula de fenazina con potenciales sitios de adición de grupos funcionales (molécula deca-sustituida).

El gran conjunto de moléculas derivadas de la estructura principal de una fenazina se encuentran divididas en tres tipos principalmente

- Fenazinas terpenoides
- Fenazinas derivadas de ácido safenico
- Fenazinas que contienen carbohidratos

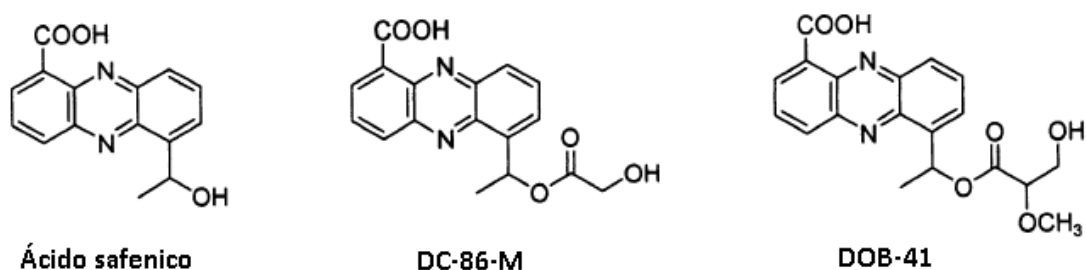
Las fenazinas terpenoides son encontradas mayormente en distintas cepas de *streptomyces* por la prenilación de los grupos tanto carboxilo como amino; un ejemplo claro de fenazinas terpenoides son las moléculas conocidas como

endofenazinas que constituyen una familia compuesta por cuatro derivados de fenazina (A, B, C, D) que cumplen con funciones antibióticas contra bacterias Gram positivas y algunos hongos.<sup>56</sup> (Figura 12)



**Figura 12.** Familia de fenazinas terpenoides que cumplen la función biológica de ser antimicrobianos y antifúngicos. Imagen de Laursen y Jane Buus.

El grupo de fenazinas derivadas de ácido safénico (1-ácido caboxílico fenazina) está compuesta de diversas moléculas catalogadas como metabolitos secundarios que cumplen con funciones antibióticas fundamentalmente, aunque también existen reportes de ser moléculas antagonistas de células tumorales como las de la leucemia.<sup>58</sup> Los principales microorganismos productores de este tipo de fenazinas son las bacterias Gram positivas *Streptomyces antibioticus*.<sup>56</sup> (Figura 13)

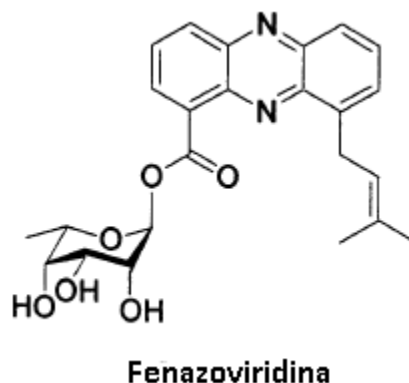


**Figura 13.** Fenazinas derivadas de ácido safénico. Imagen de Laursen y Jane Buus.

Las fenazinas que contienen carbohidratos son compuestos no comunes, según datos reportados, esta clase de moléculas son derivadas del compuesto llamado 6-desoxi-L-glicopiranosido, como las moléculas anteriores, esta familia de moléculas también tiene actividad antibacteriana tanto para bacterias Gram positivas como Gram



negativas, aunque cabe destacar que la molécula llamada fenazoviridina producida por *streptomices sp.* tiene un efecto antioxidante.<sup>56, 59</sup> (Figura 14)



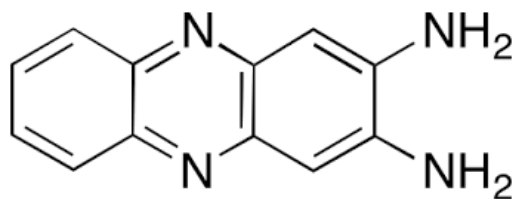
**Figura 14.** Fenazoviridina, molécula antioxidante extraída de *streptomices sp.* cepa HR04

Los compuestos derivados de fenazinas biosintetizadas (incluyendo los mencionados anteriormente) son producto de excreción como metabolitos secundarios, aunque no se conoce a profundidad el rol biológico que puedan tener estas moléculas la investigación sugiere que son compuestos derivados de metabolitos primarios que son sintetizados y excretados para evitar la bioacumulación de los primeros compuestos.<sup>56, 57, 59</sup>

### 5.8 2,3 diaminofenazina

La molécula también conocida como 1,2 diaminobenzeno es utilizada en diversas aplicaciones biológicas, clínicas y analíticas.<sup>60</sup> Su estructura plana con anillos heterocíclicos le confiere propiedades como regiones de alta densidad electrónica, alta luminiscencia, etc. Sus propiedades tienen un uso extenso en química analítica como un analito catalimétrico.<sup>25</sup>

Debido a que la molécula es una diamina aromática, su electro-polimerización se debe a la a dimerización oxidativa de OPD.<sup>61</sup> (Figura 15)

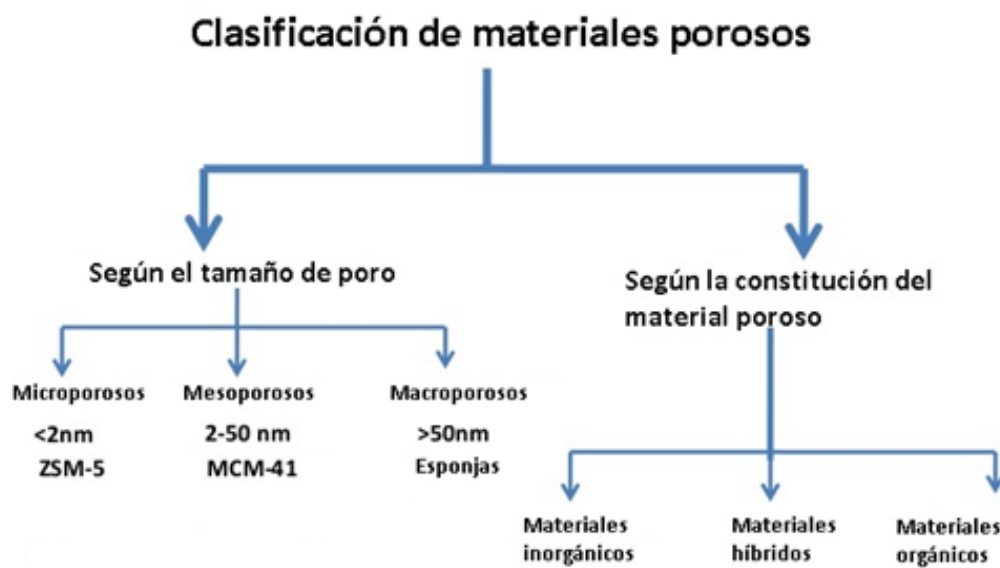


**Figura 15.** Estructura de la molécula 2, 3 diaminofenazina

## 5.9 Materiales porosos

Los materiales porosos son de gran interés científico e industrial debido a la gran versatilidad que presenta este tipo de materiales al utilizarlos en aplicaciones como catálisis, adsorción, detección, separación, encapsulación etc.

Sus diferentes funciones son producto de sus características como elevadas áreas superficiales (hasta varios miles de metros cuadrados por gramo) y tamaños de poro (que van desde tamaños nanométricos hasta milimétricos) dependiendo del tipo de material. (Figura 16)



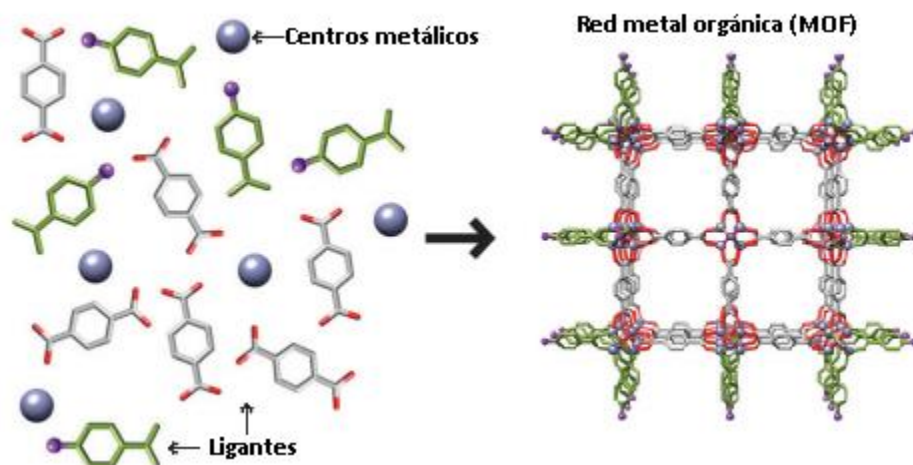
**Figura 16.** Clasificación de materiales porosos según el tamaño de poro y de la naturaleza del material poroso.

Estos materiales consisten en matrices de carbono o matrices de compuestos inorgánicos tales como sílice, zeolitas, óxidos metálicos, etc., la composición química de cada uno de los materiales porosos determina su funcionalidad y aplicabilidad.

### **5.10 Polímeros de coordinación porosos (redes metal-orgánicas)**

Hipotetizados inicialmente en los años 80 solo como un concepto de materiales híbridos, no fue hasta en los años 90, grupos de investigación abanderados por Robson, Kitagawa, Yagui y Férey crearon los primeros polímeros de coordinación, estos materiales crearon gran expectación gracias a su capacidad de introducir moléculas en su estructura, modificando completamente sus propiedades químicas, físicas y mecánicas.<sup>62</sup> Es entonces que en el año 1995 el grupo de investigadores compuesto por Yagui y colaboradores, designaron a estos materiales el término Open Metal-Organic Framework (MOF), abriendo de esta forma un nuevo campo de investigación multidisciplinaria en el desarrollo de estos materiales porosos.<sup>62</sup>

Conocidos como MOFs son materiales altamente innovadores desarrollados en nanotecnología, descritos como sólidos híbridos cristalinos construidos a partir de enlaces iónico-covalentes de moléculas inorgánicas u orgánicas como ligantes (carboxilatos, imidazoles etc.) y centros metálicos permitiendo, de esta manera, la capacidad de crear nuevos materiales altamente porosos con tamaños de poro variables que van desde 0.4 nm a 6 nm en promedio y altas áreas superficiales que van desde 100 m<sup>2</sup>/g hasta más de 7000 m<sup>2</sup>/g.<sup>63, 64</sup> (Figura 17)



**Figura 17.** Constitución básica de un MOF, creado a partir de ligantes y centros metálicos unidos y ordenados de forma tridimensional. Imagen de McGuire, C. V., & Forgan, R. S. (2015).

La creación, cada vez mayor, de nuevos materiales porosos es consecuencia de la gran variedad de moléculas constituyentes de los MOFs que pueden ser reemplazadas o modificables para dar como resultado un cristal con diferentes formas, tamaños variables de poro, diversas propiedades mecánicas etc., permitiendo una fácil modulación de sus características, es por ello que la versatilidad de este tipo de materiales representa grandes ventajas sobre otros tipos de materiales.<sup>65, 66</sup>

Desde la creación de los primeros MOFs, tal como el MOF-5 (diseñado en el año 1999) o el MOF denominado HKUST-1 (Hong Kong University of Science and Technology-1), el desarrollo continuo de nuevos MOFs ha permitido crear una gran cantidad de familias y subfamilias de materiales metal-orgánicos porosos.<sup>67, 68</sup> Por otro lado, debido a la alta versatilidad de los ligantes orgánicos al coordinarse con otras moléculas en el año 2006 un grupo dirigido por Yaghi agregó una nueva subfamilia de MOFs denominada ZIFs (“zeolitic imidazolate frameworks” por sus siglas en inglés), la cual presenta topologías zeolíticas mediante el uso de imidazolatos como ligantes.

En general debido a la alta cantidad de MOFs desarrollados hasta ahora, podemos clasificar a este tipo de estructuras en dos grandes categorías; MOFs de estructuras flexibles, que son materiales capaces de cambiar su conformación o tamaño de poro bajo estímulos externos (temperatura, presión, inclusión molecular), considerándose a este tipo de MOFs como redes dinámicas; la segunda categoría se encuentra conformada por MOFs de estructuras rígidas, su nombre se debe a que la conformación estructural de la red metal-orgánica no cambia a pesar de estímulos físico-químicos, es decir su estructura no es modificada ante diferentes condiciones externas, siendo de esta forma estructuras altamente estables.

Por su gran diversidad, los MOFs tienen potenciales aplicaciones en una gran variedad de campos, algunas de ellas son, separación o almacenamiento de fluidos, catálisis, purificación de agua, dispositivos de detección y obtención molecular, entre otros. Existen actualmente innovadoras investigaciones haciendo uso de estos materiales en aplicaciones biológicas, principalmente para aplicaciones médicas, desarrollando MOFs para uso terapéutico y de diagnóstico.<sup>63, 65</sup>

### **5.11 Redes metal-orgánicas con moléculas orgánicas (BioMOFs)**

Debido a sus grandes ventajas y múltiples usos la creación de nuevos MOFs recientemente está enfocada en la biocompatibilidad e inocuidad de sus componentes, particularmente en el uso de moléculas biológicas como ligandos constituyentes de las estructuras cristalinas así como del uso de metales biocompatibles.<sup>65</sup> Moléculas como aminoácidos, péptidos, carbohidratos y bases nitrogenadas tienen grandes ventajas al presentar numerosos sitios de coordinación (bases de Lewis) haciendo de estas biomoléculas ligantes potenciales para la construcción de estructuras denominadas como BioMOFs (Bio-inspired metal-organic frameworks por sus siglas en inglés).<sup>63, 65</sup>

El diseño de BioMOFs tiene como parámetros a tomar en cuenta la correcta elección de sus componentes estructurales, es decir, de ligantes y centros metálicos que

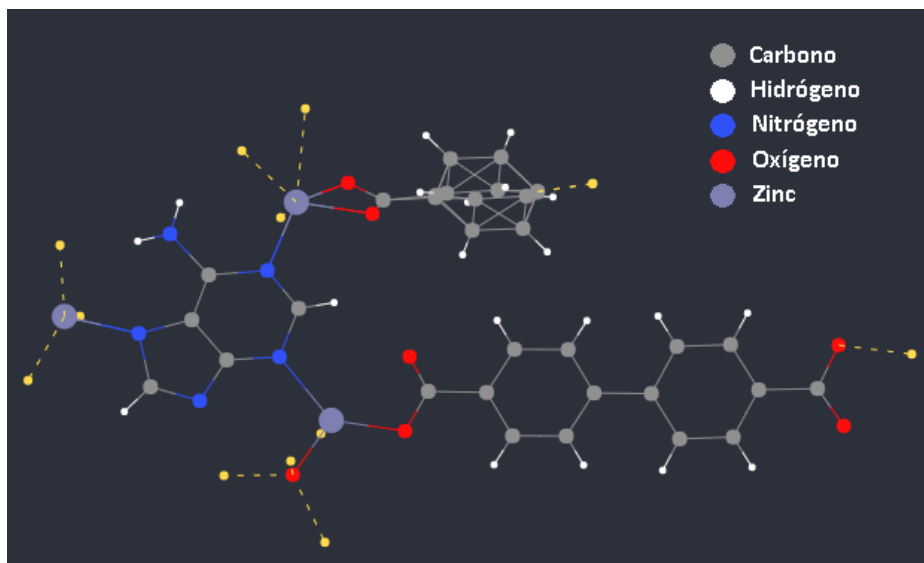
sean capaces de ser inocuos para el organismo, de tener una alta cinética degradativa y una fácil excreción.<sup>69</sup> La combinación correcta de estos parámetros debe dar como resultado una baja toxicidad de sus moléculas constituyentes, una estructura y funcionalidad eficiente así como una alta estabilidad bajo condiciones fisiológicas *in vivo*.<sup>63</sup>

Actualmente existe una gran cantidad de BioMOFs desarrollados principalmente para la aplicación *in vivo* como los MOFs denominados MIL-88A, MIL-88B-4CH<sub>3</sub> y MIL-100 que se encuentran constituidos con carboxilatos y centros metálicos de hierro, su inocuidad ha sido comprobada con ensayos toxicológicos, además experimentaciones *in vivo* revelan que este tipo de MOFs son biodegradables.<sup>63</sup> Otro tipo de BioMOF que ha sido estudiado es la estructura conocida como M-CPO-27 por la estabilidad que presenta bajo condiciones biológicas simuladas.<sup>70</sup>

## 5.12 BioMOF-1

El cristal conocido como BioMOF-1 es una estructura derivada de un sub-modo de coordinación metal-adenina, fue reportado por primera vez en el año 2009 por Jihyun An y colaboradores, se encuentra constituido de la nucleobase púrica adenina, 4, 4 bifenil ácido dicarboxílico y zinc como nodo metálico.<sup>71</sup>

Su estructura cristalina consiste en columnas infinitas de adenina-zinc que conforman unidades secundarias de construcción o SBUs (secondary building units) compuestas de un octaedro de vértices compartidos de adenina-zinc, cada uno de las estructuras octaédricas se encuentra formada de cuatro adeninas alternadas que son parte de las caras y ocho Zn<sup>2+</sup> tetraédricas, cuatro en los vértices del plano ecuatorial de cada SBUs y dos en cada posición apical del octaedro.<sup>71</sup> (Figura 18)



**Figura 18.** Estructura de la coordinación fundamental del cristal BioMOF-1. Imagen de Jihyun An; Steven J. Geib y Nathaniel L. Rosi

La conformación molecular resulta en un BioMOF estable térmicamente (su descomposición comienza a una temperatura de 250°C – 300°C) con una estructura rígida y una naturaleza permanentemente porosa de carga aniónica capaz de almacenar moléculas catiónicas, mediante el desplazamiento molecular de di-metil amonio contenida en los poros como subproducto de la síntesis, además de tener una alta área superficial (cerca de 1700 m<sup>2</sup>/g) y mantener su integridad cristalina por semanas.<sup>64, 71</sup>

Los datos de la estructura cristalina de BioMOF-1 que corresponden a su fórmula química empírica, celda unidad, volumen de celda, y sistema cristalino se muestran en la siguiente tabla. (Tabla 3)

**Tabla 3.** Datos relevantes en la elucidación de la estructura cristalina de BioMOF-1

	DATOS OBTENIDOS
FÓRMULA EMPÍRICA	C <sub>104</sub> H <sub>64</sub> N <sub>20</sub> O <sub>25</sub> Zn <sub>8</sub>
PESO MOLECULAR	2516.87 grs/mol
SISTEMA CRISTALINO	Tetragonal
DIMENSIONES DE CELDA UNIDAD	a= 38.237 Å    α= 90° b= 38.237 Å    β= 90° c= 11.175 Å    γ= 90°
VOLUMEN DE CELDA	16339 Å <sup>3</sup>

### 5.13 Usos y aplicaciones de BioMOFs

El uso de biomoléculas en la construcción de BioMOFs exhiben propiedades interesantes tal como el caso de MOFs constituidos de aminoácidos que presentan enantioselectividad o diastereoselectividad para la separación de moléculas así como catálisis asimétrica.<sup>63</sup> Además de las propiedades que exhiben las biomoléculas su baja toxicidad y estabilidad hacen posible desarrollar aplicaciones médicas como la incorporación de medicamentos en sus poros para la posterior liberación de fármacos, supliendo de esta manera el uso de zeolitas mejorando la capacidad de almacenaje y la dosificación de medicamentos (evitando el efecto “burst”).<sup>63, 65, 69</sup>

El uso de compuestos terapéuticos para ser almacenados dentro de los poros de BioMOFs abarca desde ibuprofeno hasta fármacos antirretrovirales como busulfan, cidofovir, azidotimidina trifosfato y agentes cosméticos; la capacidad de almacenamiento y liberación de estas estructuras cristalinas han sido probadas mostrando un alto almacenaje (más de 1.4 gramos de fármaco por gramo de BioMOF) y un prolongado tiempo de liberación que va desde los 3 días hasta las tres semanas.<sup>65</sup>

De esta manera, la creación de estructuras biológicamente inocuas tiene gran potencial de almacenamiento de moléculas bioactivas terapéuticas aumentando año con año los ensayos de almacenaje de fármacos evidenciando las claras ventajas frente a otros materiales porosos como la alta capacidad de depósito de busulfan que mostró el material mesoporoso MIL-100 al almacenar entre 5 y 60 veces más que las mejores zeolitas o nano-sistemas liposomáticos.<sup>69</sup>

Por otra parte la construcción de BioMOFs con moléculas bioactivas como unidades constitutivas se ha vuelto una alternativa promisoría para la aplicación de estos materiales porosos en áreas de la salud, como ejemplo tenemos al MOF bio-activo constituido de hierro como centro metálico y ácido nicotínico (también conocida como niacina o vitamina B3) como molécula ligante que le confiere propiedades



antilipémicas y vasodilatadoras eficaces en la disminución de colesterol.<sup>72</sup> Otro par de MOFs con actividad biológica intrínseca en su estructura son los reportados como  $[Ag_2(O-IPA)(H_2O).(H_3O)]$  y  $[Ag_5(PYDC)_2(OH)]$  que incorporan átomos metálicos de plata que ejercen actividad antibacterial que fue evaluada exitosamente contra cultivos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.<sup>73</sup>

Concluyendo, las estructuras denominadas como BioMOFs tienen varias aplicaciones médicas, la creación cada vez mayor de nuevas estructuras hace posible encontrar diversas utilidades terapéuticas, la gran cantidad de estrategias utilizadas para la incorporación de moléculas biológicamente activas permiten distinguir entre dos formas de aprovechamiento de estas moléculas, la primera manera incorporando moléculas en sus poros, y la segunda forma es la de incorporar las moléculas bioactivas a su estructura.<sup>64, 72, 73</sup> (Tabla 4)

**Tabla 4.** MOF's con moléculas biológicamente activas constituyentes y MOF's con capacidad de almacenar moléculas bioactivas.

	MOFS CON MOLÉCULAS BIOACTIVAS ALMACENADOS EN SUS POROS.	MOFS CON MOLÉCULAS BIOACTIVAS FORMANDO PARTE DE SU ESTRUCTURA.
MOFS CON ESTAS CARACTERÍSTICAS	MIL-100 BioMOF-1	BioMOF niacina-Fe BioMOF Ag
MOLÉCULAS BIOACTIVAS	Busulfan Procainamida	Vitamina B3 Nano partículas de plata
APLICACIÓN	Contra trastornos cardíacos Fármaco anticancer	Disminución de colesterol Agente antibacterial

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos a utilizados fueron adenina ( $C_5H_5N_5$ ); acetato de Zinc dihidratado ( $C_4H_{10}O_6Zn$ ); bifenil - ácido 4,4'-dicarboxílico ( $C_{14}H_{10}O_4$ ); O-fenilendiamina ( $C_6H_8N_2$ ), cloruro de hierro ( $FeCl_3$ ), dimetilformamida (DMF), metanol y ácido nítrico.

### 6.1 Síntesis de BioMOF-1

Los cristales de BioMOF-1 fueron sintetizados de acuerdo a la metodología realizada por An, Jihyun, and Nathaniel L. Rosi con una ligera modificación.<sup>27</sup> Los reactivos, en sus respectivas proporciones (Tabla 5) fueron mezclados a temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos.

**Tabla 5.** Reactivos y proporciones utilizadas en la síntesis de BioMOF-1

REACTIVO	PROPORCIÓN
ADENINA	0.1 mmol
BPDC	0.178 mmol
ACETATO DE ZINC	0.375 mmol
ÁCIDO NÍTRICO	2.5 mmol
DMF	16 mL

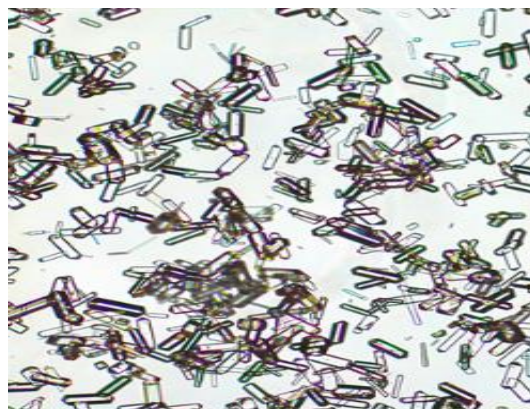
Posteriormente, la mezcla resultante fue depositada en una línea de teflón y sucesivamente en un autoclave de acero inoxidable para iniciar las síntesis solvotermal a 120 °C por un periodo de 24 horas. (Figura 19)



**Figura 19.** De izquierda a derecha respectivamente, vaso de precipitado conteniendo todos los reactivos mezclándose. Imagen izquierda, autoclave de acero inoxidable junto con su respectiva línea de teflón.

Una vez terminado el tiempo de calentamiento, el autoclave es sometida a una rampa de enfriamiento a temperatura ambiente, posteriormente, el autoclave totalmente frío es entonces abierto, sacando de esta manera la línea de teflón para su posterior apertura. Los cristales sintetizados (BioMOF-1), son colectados mediante pipetas Pasteur de cristal y depositados en un vaso de precipitado de 50 mL.

Tras lavar los cristales con DMF repetidas ocasiones (2-3 veces) estos son depositados en un vial de 5 mL con 4 mL de metanol por 24 horas, pasado este tiempo, los cristales son colectados de nuevo, filtrados y secados para su posterior uso. (Figura 20)



**Figura 20.** Cristales de BioMOF-1 colectados y observados bajo microscopio óptico

## 6.2 Síntesis de 2,3 diaminofenazina

Por otro lado la molécula 2,3 diaminofenazina fue sintetizada siguiendo el método realizado por Griess.<sup>74</sup> Los reactivos con sus respectivas proporciones fueron las siguientes; O-fenilendiamina (0.1 mmol) y cloruro de hierro (0.1 mmol), cada uno de los reactivos se disolvieron por separado en un volumen de 5 mL de metanol, una vez disueltos, se mezclaron y se agitaron por 5 minutos, una vez homogeneizado, la mezcla se depositó en un vial a evaporación a temperatura ambiente por 60 horas. (Figura 21)



**Figura 21.** Viales con mezcla de OPD y cloruro de hierro en metanol a evaporación a temperatura ambiente.

Los cristales de 2,3 diaminofenazina fueron colectados y limpiados por sonicación en cloroformo y evaporación a temperatura ambiente en la campana de extracción.

## 6.3 Incorporación de DAP en cristales de BioMOF-1

Obtenidos los cristales de BioMOF-1 y de DAP, la molécula sensor (DAP) fue introducida por intercambio molecular vía soaking, mediante una preparación de solución saturada de DAP en metanol, preparada la solución de DAP, los cristales

de BioMOF-1 fueron depositados en la solución por 15 minutos, una vez cumplido este tiempo se secaron a temperatura ambiente los cristales de BioMOF-1 con la molécula DAP incorporada en los poros del BioMOF-1.

#### **6.4 Elaboración de películas con cristales, DAP-BioMOF-1**

Los cristales de DAP-BioMOF-1 obtenidos fueron colocados en una película plástica auto adherible, el procedimiento constó en colocar los cristales (0.015 grs) en una superficie plana, posteriormente los cristales fueron cubiertos por la película ejerciendo presión para adherirlas y se trató de distribuir a lo largo de toda la película, con el fin de realizar un sensor manipulable, flexible y reusable. (Figura 22)



**Figura 22.** Películas de PVC constituidos con 0.0158 grs. de cristales cada una.

#### **6.5 Elaboración de soluciones nanomolares de dopamina**

Las soluciones de dopamina se elaboraron con concentraciones basadas a las publicadas por PRADHAN, Tuhin, et al, simulando las concentraciones reales de dopamina en tejidos biológicos.<sup>3</sup> Las soluciones fueron realizadas con dopamina hidrociorada disuelta en metanol, con las siguientes concentraciones: 5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 80 nM, 120 nM, 160 nM, 200 nM, 240 nM, 320 nM, 400 nM,

480 nM, 520 nM y 600 nM. Una vez realizadas las soluciones, las películas con los cristales de DAP-BioMOF-1 fueron puestas en contacto con las diferentes soluciones de dopamina.

## **6.6 Exposición de películas a soluciones de dopamina**

La película fue embebida en su totalidad en un volumen de 3 mL de metanol por 3 minutos a temperatura ambiente, la liberación gradual del sensor es controlada por el tiempo de exposición de la película en metanol, una vez terminado el tiempo establecido la película es extraída del recipiente y la concentración de la molécula de DAP es constante. El tiempo breve de exposición de la película, en conjunto con la liberación gradual del sensor hace que la concentración sea mínima, por tanto el uso de la molécula sensor es eficiente.

Una vez establecida la concentración de DAP las diferentes soluciones de dopamina fueron agregadas directamente a la solución con el sensor, después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente las soluciones fueron analizadas con el espectrofotómetro de fluorescencia.

## **6.7 Caracterización**

### **6.7.1 Microscopía óptica**

Para la observación de los materiales cristalinos sintetizados se utilizó un microscopio óptico marca Leica® modelo DM500 con una cámara digital como módulo integrado modelo ICC50E. Las observaciones se realizaron con un objetivo 10x de óptica Leica®. (Figura 23)



**Figura 23.** Microscopio óptico marca Leica® con cámara de 2 mega pixeles y transmisión de imagen a pc.

### 6.7.2 Microscopía electrónica de barrido

La obtención y estudio de microfotografías fue realizada mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés). El equipo utilizado fue un SEM de mesa con cámara de bajo y alto vacío con voltaje variable (5 KV, 10 KV y 15 KV) marca JEOL modelo JCM 6000. (Figura 24)



**Figura 24.** Microscopio electrónico de barrido de sobremesa marca JEOL

### 6.7.3 Patrones de difracción de rayos X

El análisis de la fase de los sólidos cristalinos fue realizado mediante un difractómetro de rayos X de polvos (PXRD), el equipo de marca Rigaku® y modelo Ultima IV fue configurado con los siguientes parámetros  $2\theta$  desde el ángulo de  $3^\circ$  hasta  $30^\circ$ ; tamaño de paso de  $0.02^\circ$  y slit de 5mm. (Figura 25)



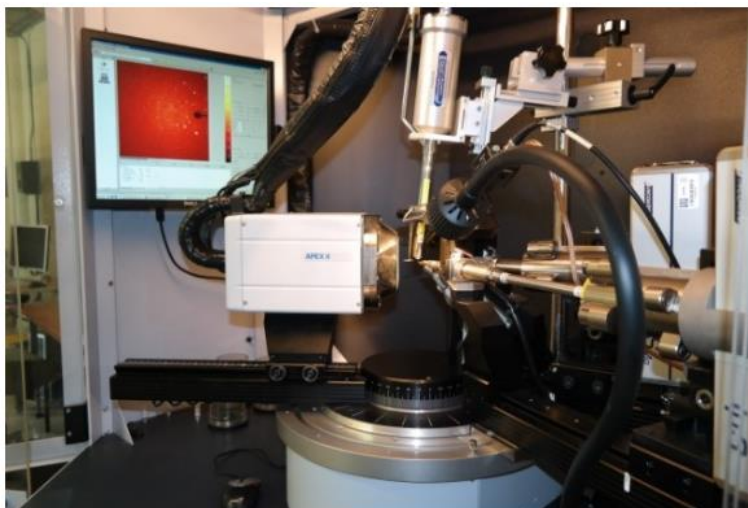
**Figura 25.** Cámara del difractómetro de rayos X de polvos marca Rigaku®

### 6.7.4 Difracción de rayos X de monocristal

La difracción de rayos X de monocristal fue realizada mediante un difractómetro para monocristal Bruker® modelo Apex-Duo con las siguientes especificaciones: goniómetro de tres círculos D8, detector APEX II, microfuentes Incoatec ImS de molibdeno y cobre, dispositivo Oxford Cryojet para mediciones a baja temperatura ( $-173^\circ\text{C}$ ). Con estas especificaciones el equipo puede determinar estructuras cristalinas de compuestos orgánicos, organometálicos e inorgánicos. De esta



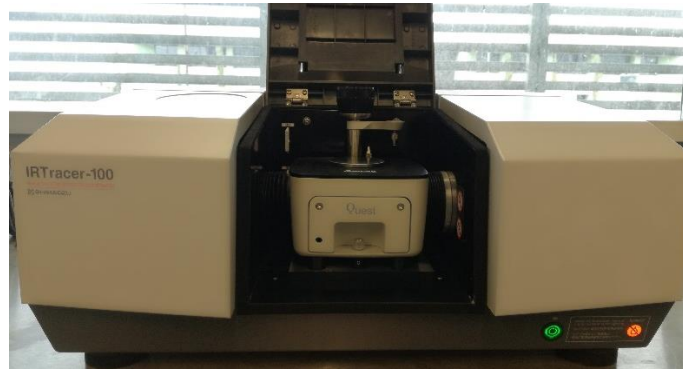
manera los compuestos organometálicos sintetizados y modificados pueden ser analizados para obtener la celda unidad del cristal y de esta manera la conformación tridimensional de la disposición atómica en el espacio. (Figura 26)



**Figura 26.** Difractómetro para monocristal marca Bruker® modelo Apex-Duo

### 6.7.5 Espectroscopia infrarroja

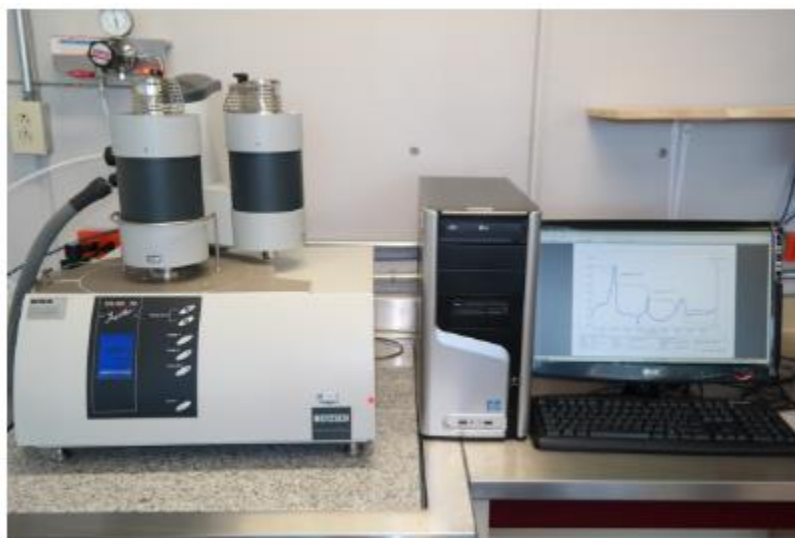
Los datos de espectroscopia de infrarrojo (IR) fueron colectados mediante un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier marca Shimadzu® modelo IRTracer-100 con un accesorio ATR (Attenuated Total Reflection) de ventana de diamante con mediciones en la región del infrarrojo medio (MIR) comprendida entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  y  $600\text{ cm}^{-1}$  gracias al beamsplitter de KBr incluido. (Figura 27)



**Figura 27.** Espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier marca Shimadzu® con accesorio ATR vista en el centro

### 6.7.6 Análisis termogravimétrico (TGA)

Los análisis termogravimétricos de las muestras fueron realizados por el equipo Netzsch® STA 449 F3 Jupiter con un rango de trabajo de  $-80^{\circ}\text{C}$  a  $800^{\circ}\text{C}$  a atmosfera de nitrógeno y helio. El análisis de las muestras se realizó de  $25^{\circ}\text{C}$  a  $450^{\circ}\text{C}$  a atmosfera de nitrógeno. (Figura 28)



**Figura 28.** Analizador térmico Netzsch modelo STA 449 F3 Jupiter

### 6.7.7 Análisis de fisisorción

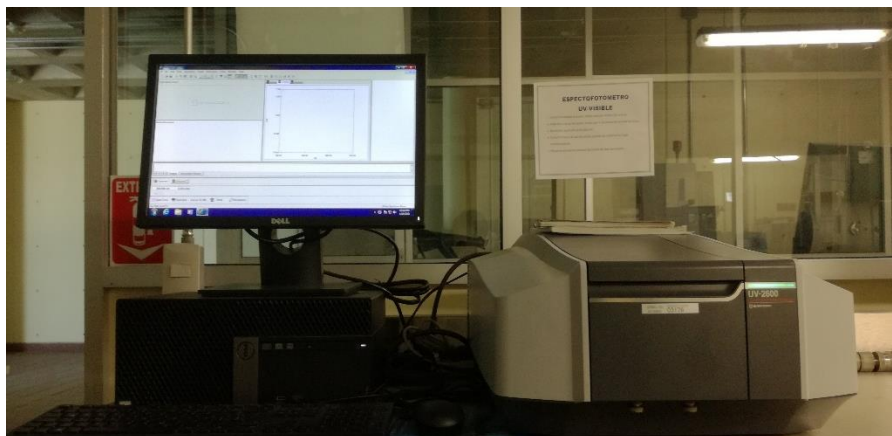
Los análisis de fisisorción para el estudio de los materiales porosos (BioMOF-1 y DAP-BioMOF-1) fueron realizados por el equipo Quantachrome® autosorb iQ. El proceso de desgasificado de los materiales porosos fue llevado a cabo a una temperatura de 90°C por un periodo de tiempo de 400 minutos a una rampa de calentamiento de 10°C por minuto. El análisis de fisisorción se realizó una temperatura de 77 K con celdas de 6 mm obteniendo 20 puntos de adsorción y 20 puntos de desorción para la obtención de la isoterma. (Figura 29)



**Figure 29.** Equipo de adsorción de gases Quantachrome® autosorb iQ

### 6.7.8 Espectrofotometría UV-visible

El estudio de espectroscopia UV visible fue colectado con un espectrofotómetro UV – Vis marca SHIMADZU® modelo UV-2600 de doble haz incorporada con una lámpara de deuterio y celdas de cuarzo, las muestras fueron analizadas en un rango de 700 a 190 nm. (Figura 30)



**Figura 30.** Espectrofotómetro UV – Vis marca SHIMADZU® modelo UV-2600

### 6.7.9 Espectrometría fluorescente

Finalmente, los espectros de fluorescencia, fundamentales en este estudio, se realizaron mediante un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse Agilent®. La longitud de excitación a 436 nm, en un rango de medición de 460 a 900 nm, con un voltaje PTM de 5nm y 550 V fueron los parámetros utilizados para la realización de las mediciones. (Figura 31)

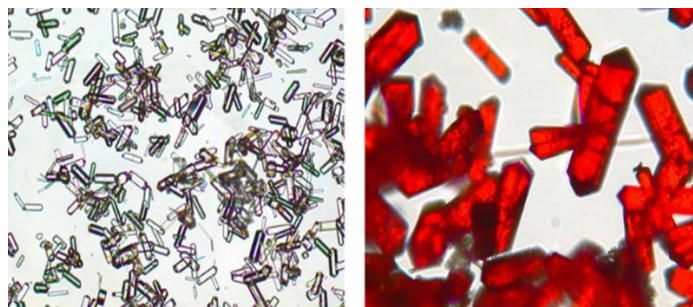


**Figura 31.** Espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse Agilent®.

## VII. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

### 7.1 Microscopía óptica

Con el uso de la microscopía óptica, el material obtenido (BioMOF-1) fue observado bajo un objetivo de 10x con el objeto de corroborar el estado cristalino del MOF sintetizado, así como la viabilidad del cristal (sin daños estructurales como rupturas, agrietamientos mal formaciones, etc.) para la incorporación de la molécula sensor. Posteriormente el cristal con modificación post-sintética (incorporación de la molécula DAP dentro del cristal) fue observado bajo un objetivo 20x para observar el cambio evidente de coloración después de la incorporación. Cabe destacar que la forma y el estado cristalino del BioMOF-1 se mantiene constante a pesar de la incorporación del sensor y la coloración de los cristales. (Figura 32)



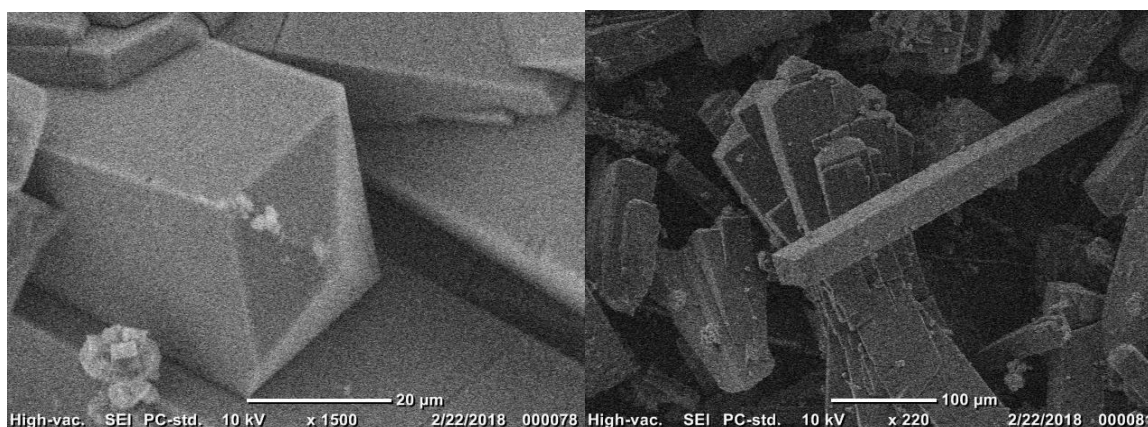
**Figura 32.** De izquierda a derecha, cristales sin incorporación de DAP, posteriormente, una vez terminado el soaking los cristales adquieren coloración (rojo/naranja).

### 7.2 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido fue utilizada para la observación detallada del estado morfológico-estructural de la superficie de los cristales, tanto los sintetizados

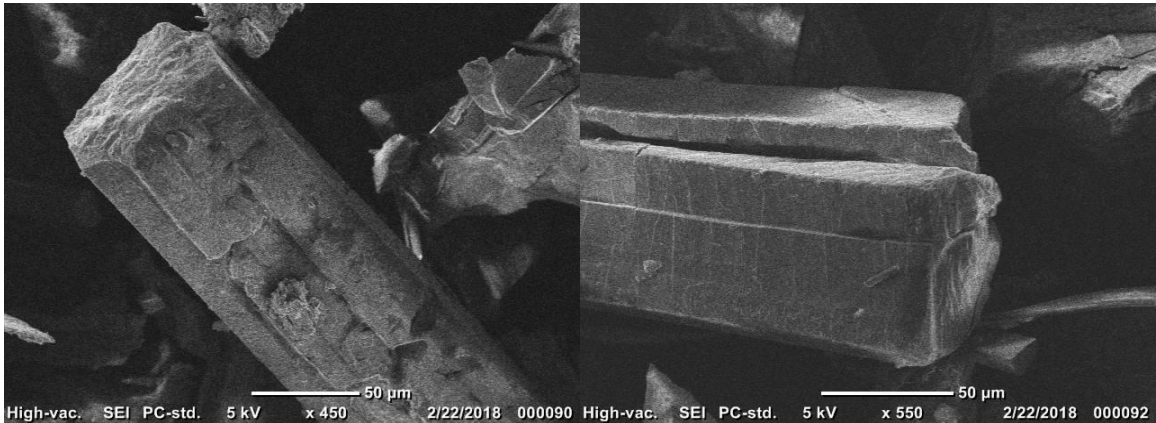
como los modificados, además de corroborar que la morfología del cristal se mantiene después de la inclusión de la molécula.

El cristal BioMOF-1 fue observado en SEM a alto vacío con un voltaje de 10 KV y un aumento de x1500 para ser evaluada la estructura del cristal, se observó una estructura típica formada por este tipo de material (prisma rectangular) y una superficie regular. Sin embargo, se encontró con presencia de cristales maclados, estos son cristales compuestos de dos o más unidades cristalinas, orientadas de maneras diferentes pero formadas, cada una de ellas por cristales regulares. (Figura 33)



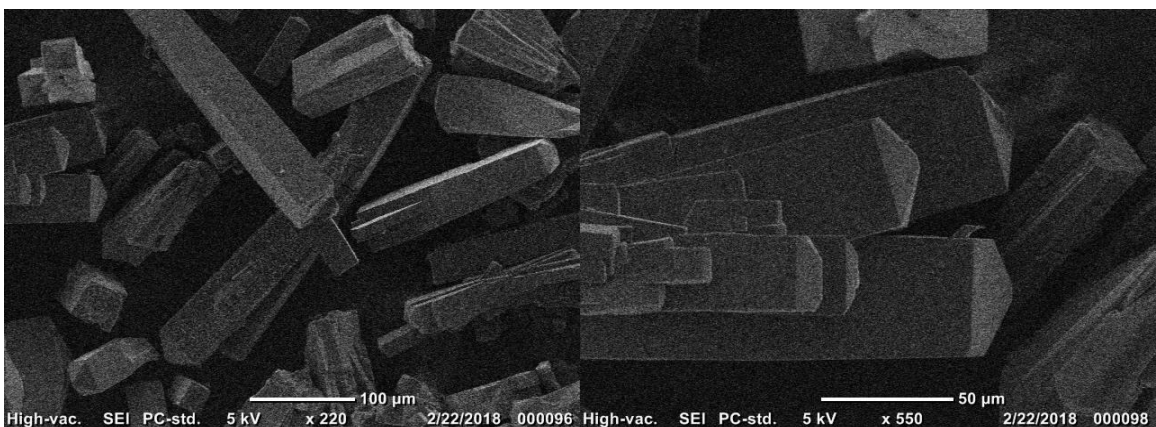
**Figura 33.** De izquierda a derecha respectivamente. Microfotografía de la sección transversal del cristal de BioMOF-1 que muestra aristas regulares y bien definidas del cristal. Microfotografía mostrando una vista longitudinal del mismo cristal con aristas y vértices regulares y definidos, detrás se encuentra un cristal maclado por interpenetración con estructuras bien definidas en los extremos pero no en la zona media longitudinal del cristal.

El compuesto 2, 3 diaminofenazina sintetizado fue cristalizado y observado bajo microscopia SEM para examinar su topología y compararla con la de los cristales de BioMOF-1. Las imágenes nos muestran cristales con una superficie irregular sin aristas ni vértices definidos con grietas a lo largo de su superficie. El crecimiento del cristal DAP es observado como una estructura en forma de microfibras formando cristales de notable longitud pero de bajo volumen, lo que lo hace un cristal sensible a la manipulación mecánica por su fragilidad.<sup>75</sup> (Figura 34)



**Figura 34.** Microfotografía de cristales de 2, 3 diaminofenazina que revela una superficie accidentada y poco homogénea (izquierda), además, debido a su alta fragilidad los cristales muestran agrietamientos muy evidentes en comparación con la superficie lisa de los cristales de BioMOF-1 (derecha).

Finalmente los cristales de BioMOF-1 modificados con la inclusión de la molécula sensor DAP también fueron vistos bajo SEM para observar fundamentalmente los posibles cambios estructurales del cristal resultante, sin embargo las imágenes obtenidas nos dieron una clara idea de que el cristal no sufre modificaciones estructurales con el contacto de la molécula DAP, lo cual indica una incorporación del sensor dentro de la estructura del BioMOF, exactamente en los poros del material confirmando de esta forma la exitosa inclusión del sensor en la estructura cristalina del BioMOF-1. (Figura 35)



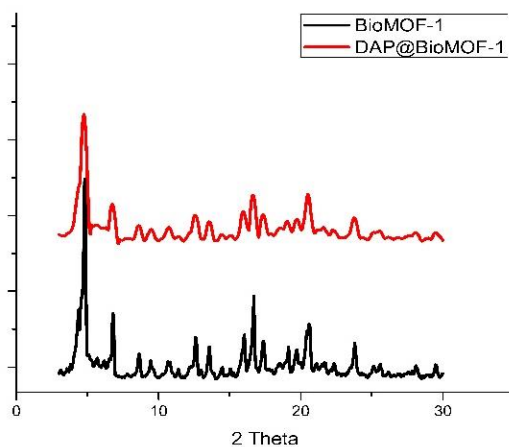
**Figura 35.** Las imágenes SEM de los cristales de DAP-BioMOF-1 muestran la misma topología que la presentada por los cristales sin modificación (BioMOF-1) tanto por la misma forma regular de su superficie como por su notable forma bien definida contrario a los cristales de DAP mostrados anteriormente.

### 7.3 Patrones de difracción de rayos X

La pureza de la fase fue confirmada usando un equipo de difracción de rayos X equipado con radiación  $\text{CuK}\alpha$  marca Rigaku® modelo Ultima IV.

Las mediciones fueron tomadas usando un tamaño de paso de  $0.02^\circ$  y una tasa de escaneo de  $1^\circ$  por minuto en el intervalo  $2\theta$   $3.0^\circ$ - $30.0^\circ$ . Los patrones de difracción de rayos X de los cristales de BioMOF-1 sintetizados fueron consistentes con el patrón de difracción de rayos X del BioMOF-1 calculado, confirmando de esta forma su estado cristalino.

Posteriormente, se realizó otra difracción de rayos X a la muestra de BioMOF-1 con 2,3 diaminofenazina para conocer su estado cristalino, es decir, se utilizó de difracción de rayos X para confirmar si la presencia de la molécula sensor se encontraba en los poros o en la superficie del cristal, al obtener un difractograma de rayos X similar al del material sin modificación se puede concluir que a pesar de contener el sensor la superficie cristalina no cambia, dado el caso de la molécula sensor en la superficie el difractograma resultante sería distinto al del primer material. (Figura 36)



**Figura 36.** Patrones de difracción de rayos X para BioMOF-1 (negro), y para BioMOF-1 con la inclusión de DAP (rojo) en el rango  $2\theta$   $3.0^\circ$ - $30.0^\circ$ .



## 7.4 Difracción de rayos X de monocristal

Los cristales de BioMOF-1 crecen de acuerdo con un grupo espacial cúbico con parámetros de celda de  $a= 38.237 \text{ \AA}$ ,  $b= 38.237 \text{ \AA}$ ,  $c= 11.175 \text{ \AA}$  y  $\alpha= 90^\circ$ ;  $\beta= 90^\circ$  y  $\gamma= 90^\circ$ ; y un volumen de celda de  $16339 \text{ \AA}^3$ .

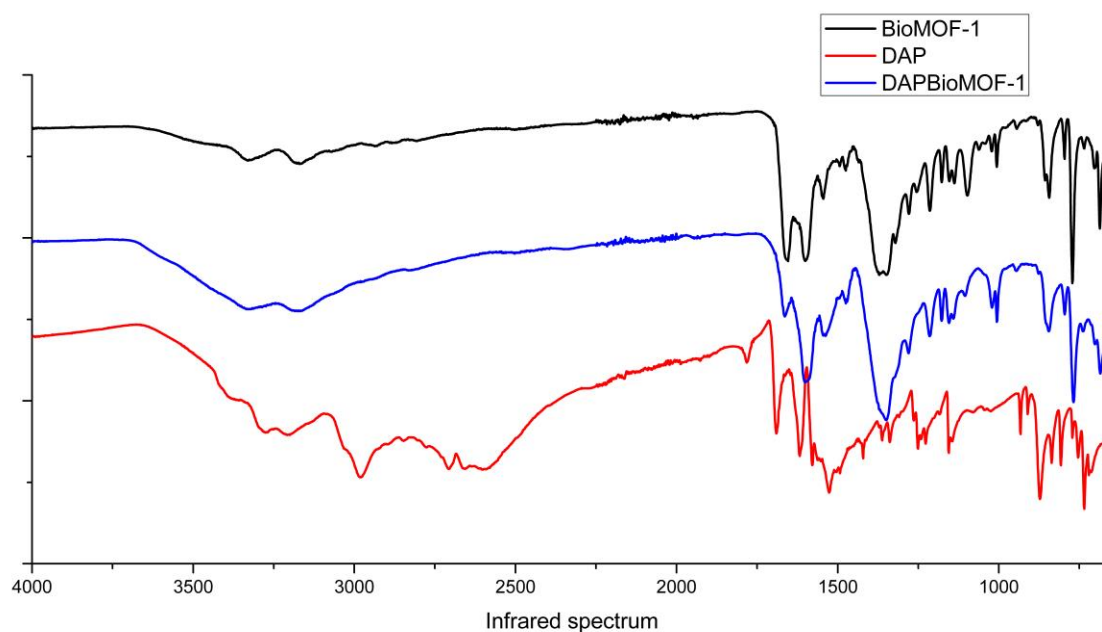
Una vez obtenido un cristal de BioMOF-1 de gran tamaño se realizó la inclusión de la molécula y se colectó la celda unidad de nuevo para observar si se daba algún cambio en la estructura, dado que los parámetros fueron los mismos y no hubo un cambio en la celda se corroboró que la inclusión de la molécula fue como se previó, es decir, no existió un anclaje por parte de la molécula huésped hacia el cristal hospedero que modificara la estructura fundamental del cristal quedando claro que su inclusión lo hace mediante las cavidades porosas mediante fuerzas electrostáticas débiles.<sup>76</sup>

## 7.5 Espectroscopia infrarroja

Los espectros de transmitancia infrarroja de los diferentes compuestos utilizados fueron realizados en un espectrofotómetro de infrarrojo (FT- IR) con un accesorio ATR incluido marca Shimadzu®, en la región de  $4000$  a  $600 \text{ cm}^{-1}$  con una resolución de  $2 \text{ cm}^{-1}$  y a 30 escaneos por muestra.

La síntesis de DAP, BioMOF-1 y de BioMOF-1 con la inclusión de DAP fueron corroboradas mediante una obtención de espectros FT – IR determinando sus bandas características. La comparación de los espectros de la molécula DAP fueron realizados en base a los estudios reportados por Sylvestre, S., et al.; así como también de las tablas de espectros infrarrojos reportadas.<sup>25</sup> De acuerdo a estos, las bandas  $3434 \text{ cm}^{-1}$ ,  $3307 \text{ cm}^{-1}$  y  $3180 \text{ cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones stretching

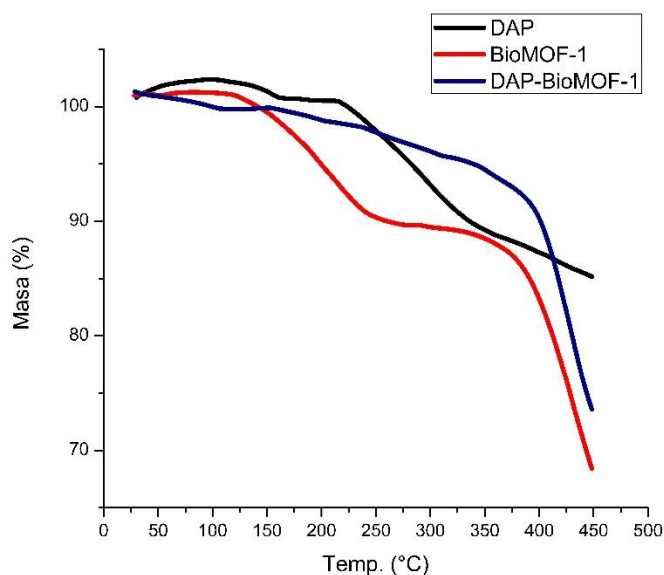
de enlaces N-H, las bandas a  $1643\text{ cm}^{-1}$  y a  $1562\text{ cm}^{-1}$  son atribuidas a deformaciones de aminas primarias y vibraciones stretching C=N, las vibraciones stretching C=C se encuentran registradas en tablas a  $1492\text{ cm}^{-1}$ , las bandas “out of plane” (OOP) a  $586\text{ cm}^{-1}$  y  $487\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la flexión de anillos aromáticos, para finalizar, los sobretonos característicos presentes en el rango de  $1744\text{ cm}^{-1}$  a  $2000\text{ cm}^{-1}$  confirman la presencia de anillos aromáticos.<sup>21, 23, 25</sup> (Figura 37)



**Figura 37.** Espectro de transmitancia IR del cristal BioMOF-1, la molécula 2, 3 diaminofenazina y el complejo DAP-BioMOF-1.

## 7.6 Análisis termogravimétrico (TGA)

Los análisis TGA fueron realizados mediante el uso del equipo Netzsch® STA 449 F3 Jupiter con las siguientes condiciones; tasa de calentamiento de 10°C/min in el rango de temperatura de 0°C a 450°C con atmosfera de nitrógeno al 99.999%. (Figura 38)



**Figura 38.** Análisis termogravimétrico de DAP (negro); BioMOF-1 (rojo) y DAP-BioMOF-1 (azul).

La figura 16 nos muestra una comparativa entre los compuestos (DAP, BioMOF-1 y DAP-BioMOF-1) evidenciando una clara diferencia en la pérdida de masa con respecto a la temperatura ascendente (desde 25°C hasta 450°C) entre los distintos compuestos. La pérdida de masa de la molécula DAP en TGA comienza a partir de los 100°C hasta los 175°C, se piensa que en este intervalo se produce la evaporación de solventes remanentes en cristales de DAP, a partir de 175°C hasta 225°C el material parece estable al no tener una pérdida apreciable de masa, sin embargo, una vez pasada la temperatura de 225°C se observa una pérdida de masa bastante pronunciada presumiblemente al comienzo de la degradación de la molécula sensor, desde la última temperatura antes mencionada hasta los 450°C

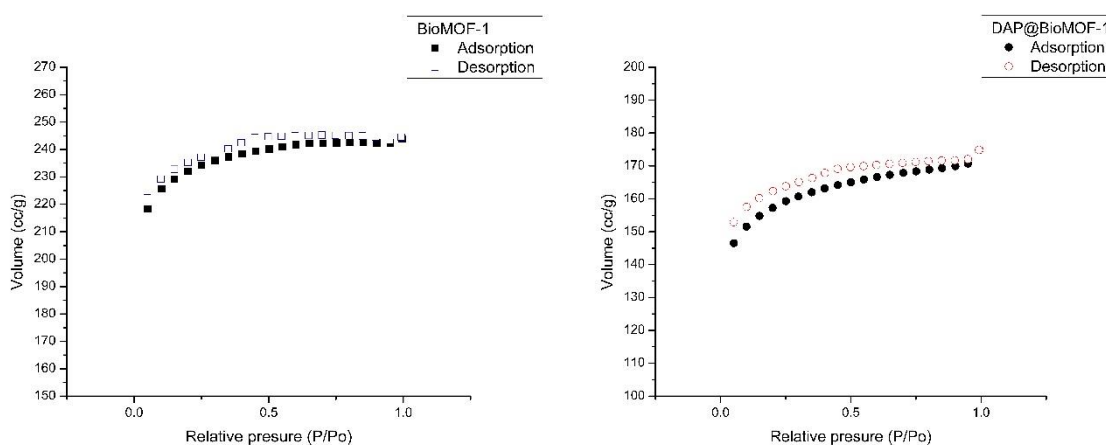
se observa una pérdida alta de masa. El comportamiento de los cristales (BioMOF-1) de manera general corresponde a una degradación escalonada pues en el intervalo de 25°C a 120°C es estable (sin pérdida de masa), en contraposición existe un notable descenso de masa al llegar a la temperatura de 125°C que se prolonga hasta los 250°C presumiblemente de las moléculas de disolvente huésped (incluyendo DMAs, DMFs, metanol y agua) que se encuentran alojadas en los poros del cristal, una vez pasado este rango de temperatura se establece una pequeña zona de estabilidad (260°C-300°C), finalmente a partir de los 350°C (punto de inflexión) la masa desciende de manera abrupta debido a la descomposición del cristal de BioMOF-1. El análisis para DAP-BioMOF-1 revela un comportamiento totalmente diferente a los dos análisis anteriores, mostrando desde temperaturas muy tempranas una pérdida de peso atribuida a la evaporación de solventes residuales del soaking, una vez llegado a la temperatura de 100°C y hasta los 160°C el gráfico muestra una ligera elevación interpretado como un estado de corrosión u oxidación metálica, una vez pasado este rango de temperatura a partir de 175°C la pérdida de masa se inicia de forma gradual y lenta debido a la posible degradación de la molécula huésped (DAP) hasta perder cerca del 5% de su masa, una vez llegada a la temperatura de 375°C se inicia un proceso rápido de descomposición del material.<sup>77</sup>

El análisis reveló el comportamiento de los materiales en un determinado rango de temperatura mostrando diferencias notables en la pérdida de masa con el aumento de la temperatura entre cada uno de los materiales sintetizados, concluyendo que la pérdida de masa correspondiente a la temperatura es característica para cada compuesto.

## **7.7 Análisis de fisisorción**

La evaluación de la alta porosidad y el área superficial de los cristales (BioMOF-1 y DAP-BioMOF-1) fueron llevadas a cabo bajo estudios de la adsorción de nitrógeno a una temperatura constante de 77 K.

El análisis Langmuir del área superficial para el cristal de BioMOF-1 tuvo un registro de 1071.826 m<sup>2</sup>/g, mientras tanto, el área superficial del cristal modificado, DAP-BioMOF-1, fue de 760.124 m<sup>2</sup>/g, el decremento del área superficial en comparación con los cristales de BioMOF-1 es esperado debido a la modificación que sufre el cristal al incluir la molécula dentro de los poros. Cabe destacar que ambos materiales presentaron una isoterma clasificada de acuerdo con la IUPAC como de tipo 1 característica para materiales microporosos con una adsorción en mono-capa debido al mantenimiento horizontal de los puntos de adsorción y desorción al aumentar la presión relativa.<sup>78</sup> (Figura 39)



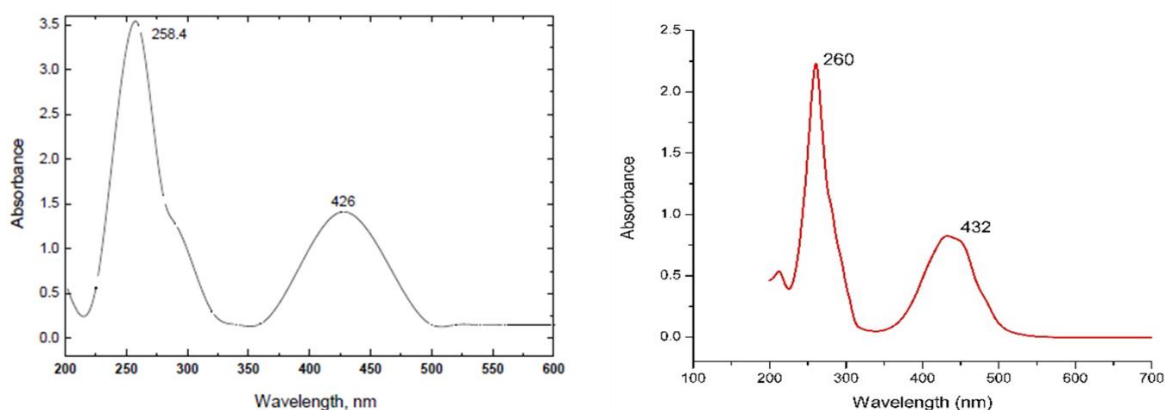
**Figura 39.** Isotermas de adsorción, BioMOF-1 (izquierda) y DAP-BioMOF-1 (derecha)

## 7.8 Espectrofotometría UV-visible

Los análisis de espectrofotometría UV visible fueron realizados en un espectrofotómetro UV-vis marca Shimadzu® modelo UV-2600. La finalidad del estudio UV-vis fue la de corroborar la correcta obtención de la molécula DAP gracias a la comparación con respecto a espectros reportados para el mismo compuesto, también se utilizó el equipo para el estudio de la interacción DAP-DA en solución y de esta forma determinar el pico de excitación necesario para las pruebas de fluorometría; finalmente se realizó una curva de calibración de la concentración de DAP con respecto a su absorbancia para ser utilizada en el cálculo

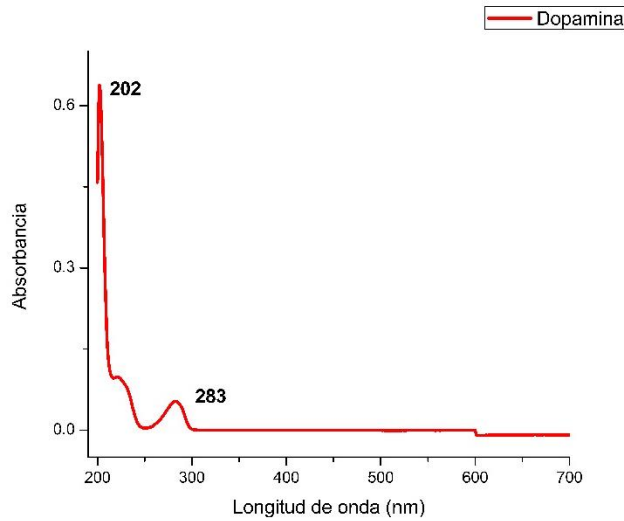
de la concentración de DAP liberada del complejo DAP-BioMOF-1 en la película plástica.

La molécula DAP fue disuelta en metanol y analizada por UV en un intervalo de 190 nm a 700 nm obteniendo un espectro característico con dos bandas a 260 nm y 432 nm que corroboran la presencia de la molécula, comparando su espectro contra espectros de la molécula DAP publicados. Cabe mencionar que de acuerdo a la literatura, el pico presente en la longitud de onda de 260 nm es atribuido a las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  del grupo fenil, mientras el pico presente a 432 nm es debido a las transiciones electrónicas  $n \rightarrow \pi^*$ .<sup>16, 23, 25</sup> (Figura 40)



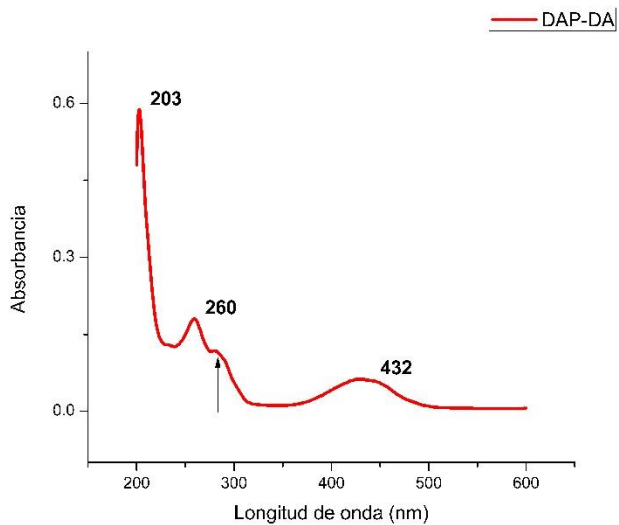
**Figura 40.** Espectros UV-vis de la molécula DAP, espectro reportado por Zhou, Pandeng, et al (izquierda) comparado con el análisis UV de la molécula sintetizada.

El espectro de dopamina fue realizado bajo las mismas condiciones que el análisis realizado a la molécula anterior (disuelto en metanol, con un intervalo de longitud de onda de 190 nm a 700 nm). Así también el espectro resultante fue comparado con otros publicados anteriormente, encontrando bandas en las longitudes de onda de 202 nm (correspondiente a la banda primaria “p” del grupo benzénico) y 283 nm (que corresponde a la banda secundaria de la estructura vibracional del anillo benzénico) respectivamente. (Figura 41)



**Figura 41.** Espectro UV visible de la molécula dopamina disuelta en metanol exhibiendo dos picos.

El espectro UV visible de la interacción entre la molécula DAP y dopamina fue llevado a cabo en una solución 1:1 con una concentración de  $4.75 \times 10^{-8}$  mol de la molécula 2, 3 diaminofenazina y dopamina disueltas en metanol. (Figura 42)

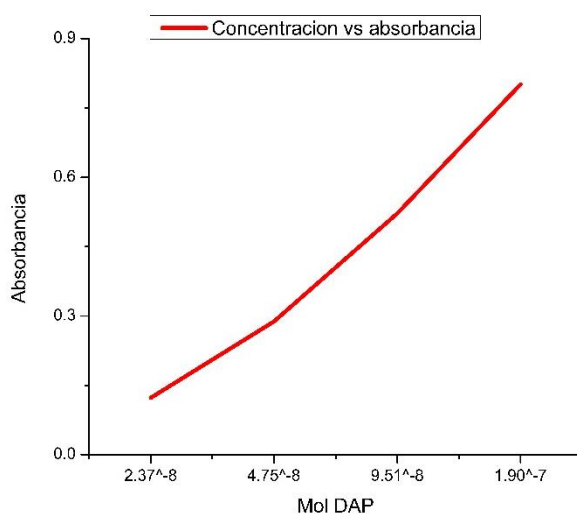


**Figura 42.** Espectro UV visible de la solución que contiene la molécula sensor junto con dopamina.

Podemos apreciar en el espectro de la solución con DAP y DA la presencia de bandas pertenecientes a las encontradas por el mismo análisis en la molécula DAP

(260nm y 432 nm) y en la dopamina (202 nm y 283 nm) por separado, la banda presente a 432 nm que corresponde a las transiciones  $\pi$ - $\pi$  del anillo bencénico a los átomos de nitrógeno tiene gran importancia debido a que es la banda de excitación reportada por Zhao para mediciones de fluorescencia.<sup>24</sup>

La curva de calibración fue realizada con diferentes concentraciones de 2, 3 diaminofenazina, específicamente nueve concentraciones distintas que van desde  $1.42 \times 10^{-8}$  mol hasta  $2.85 \times 10^{-7}$  mol. (Figura 43)

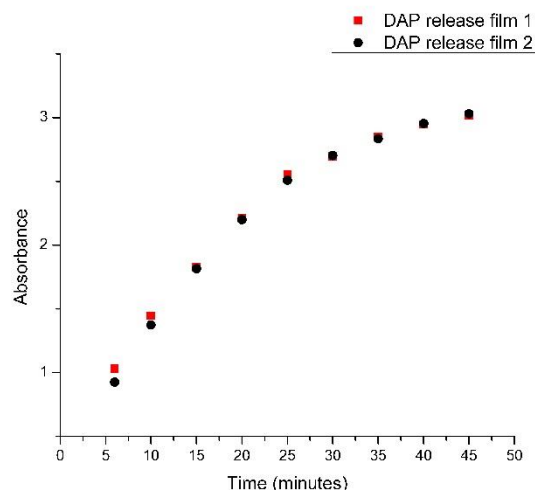


**Figura 43.** Curva de calibración de la concentración de DAP vs absorbancia,  $n=9$ ; y ecuación  $y=a+(b)(x)$

La obtención de la curva facilita el cálculo de la concentración de DAP liberada al ser expuesta en un medio acuoso permitiendo obtener ensayos de detección más controlados y con uso más eficiente de la molécula sensor.

Finalmente, se realizó un estudio de la liberación del sensor de las películas con el complejo DAP-BioMOF-1 mediante el uso del equipo UV-vis realizando mediciones en forma paralela a dos películas con los mismos intervalos de tiempo con el objeto de obtener la certeza de repetitividad en el comportamiento de liberación del sensor. (Figura 44)





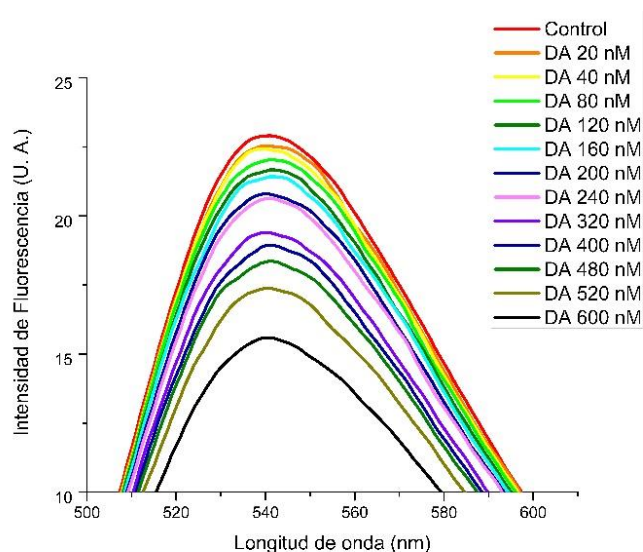
**Figura 44.** Gráfico de comparación de la absorbancia de la DAP liberada con respecto al tiempo (intervalos de 5 minutos) de los dos films.

La reproducibilidad en la liberación de la molécula sensor fue analizada mediante un análisis de varianza mediante el uso del software Statgraphics centurion XVI obteniendo un valor de varianza de 1.09968, por tanto, este valor revela que no existe diferencia entre el comportamiento de liberación de DAP de los dos films estudiados, concluyendo de esta manera que el sistema puede ser reproducible debido a la facilidad con la que puede ser controlada la cantidad de DAP liberada por el sistema DAP-BioMOF-1.

## 7.9 Espectrometría fluorescente

Las mediciones de emisión fluorescente fueron realizadas en un espectrofotómetro de fluorescencia marca Agilent® modelo Cary Eclipse. La longitud de excitación a 436 nm, en un rango de medición de 460 a 900 nm, con un voltaje PTM de 5nm y 550 V fueron los parámetros utilizados para la realización de las mediciones.

La solución con el sensor fue medida inicialmente, después fueron agregadas las soluciones de dopamina de menor a mayor concentración, cada solución de DA fue medida y registrada. (Figura 45)

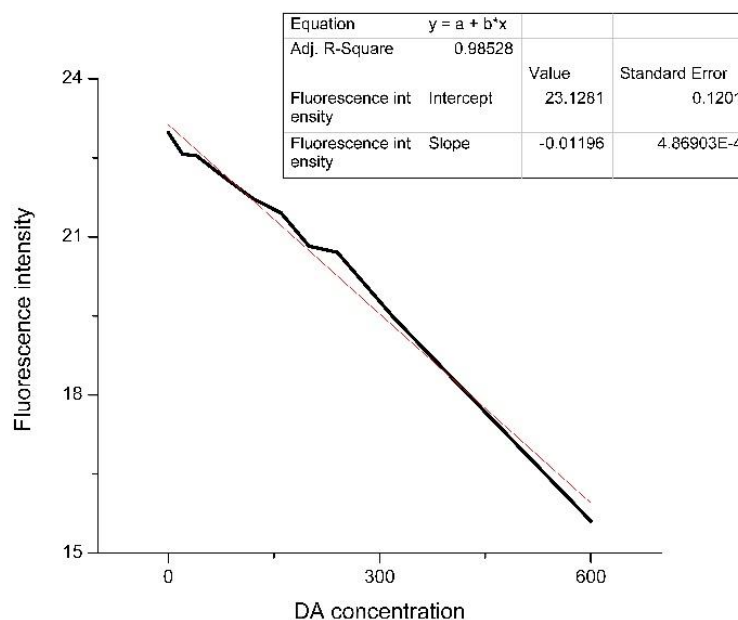


**Figura 45.** Espectros de emisión de fluorescencia de la molécula DAP en contacto con soluciones de dopamina, nótese que el espectro de emisión va bajando de manera gradual en referencia al aumento en la concentración de dopamina en la solución.

La interacción de la molécula DAP con la dopamina en el medio acuoso se debe al proceso denominado como transferencia foto-electrónica o PET (photoelectron transfer) que involucra la transferencia de electrones HOMO provenientes del DAP a orbitales vacantes de menor energía encontrados en la dopamina, es decir el sensor DAP excitado (por tanto más energético) entra en contacto con la dopamina mediante los heterociclos de su estructura que interactúan con la estructura bencénica del grupo catecol de la dopamina por medio de interacciones  $\pi$ - $\pi$  que producen como consecuencia el fenómeno PET “apagando” de esta manera las moléculas de DAP excitadas, este tipo de moléculas se les denomina como Quenchers, de manera general al proceso que envuelve la disminución de la emisión fluorescente se le denomina quenching.<sup>79</sup>

Finalmente, el uso de moléculas fluorescentes sensibles a quenching es ampliamente usado para determinaciones analíticas, como se mencionó anteriormente el uso de un sensor está determinado por un grado de repetitividad congruencia, de este modo, se realizó una curva de calibración (n=12) que involucra

la concentración de dopamina en relación con la intensidad de emisión fluorescente. (Figura 46)



**Figura 46.** Curva de calibración con una correlación  $R^2$  de 0.98528 y ecuación  $y=a+(b)(x)$ .

## VIII. CONCLUSIÓN

La síntesis y obtención de la molécula sensor (DAP) y la estructura que la almacena (BioMOF-1) así como la inclusión de la molécula en los poros del cristal, fue exitosa y en ambos casos, siendo corroborados minuciosamente por técnicas como microscopía óptica y electrónica, difracción de rayos X de polvos y monocristal, espectroscopia infrarroja, análisis termogravimétricos, análisis de adsorción de gases de tipo Langmuir, espectroscopia UV-vis y espectroscopia de emisión fluorescente.

La disposición del complejo DAP-BioMOF-1 en películas de PVC flexibles permitió una fácil manipulación del material al ser analizado y utilizado en diversas pruebas

evitando de este modo una pérdida de material tanto de BioMOF-1 como DAP al ser manipulado.

Una característica fundamental que se consiguió al tener el sensor en esta configuración fue la eficiente, prolongada y controlada liberación de DAP en medios acuosos evitando el uso innecesario de grandes cantidades de 2, 3 diaminofenazina, por tanto, una reducción de material desperdiciado y de esta forma bajando los costos económicos del ensayo.

La alta sensibilidad de la molécula sensor ha sido corroborada al detectar soluciones de dopamina con concentraciones nanomolares teniendo un comportamiento predecible que lo hace reproducible, es importante destacar que las concentraciones de DA son similares a las presentes en tejidos biológicos, además la inocuidad del cristal de BioMOF-1 así como su alta capacidad de modular la liberación del sensor hacen de este sistema una opción a tener en cuenta en la detección de dopamina *in vivo*.

## IX. REFERENCIAS

1. R. A. Wise, *Nature Reviews Neuroscience*, 2004, **5**, 483.
2. S. Heijnen, B. Hommel, A. Kibele and L. S. Colzato, *Frontiers in Psychology*, 2016, **6**.
3. T. Pradhan, H. S. Jung, J. H. Jang, T. W. Kim, C. Kang and J. S. Kim, *Chemical Society Reviews*, 2014, **43**, 4684-4713.
4. L. M. Björklund, R. Sánchez-Pernaute, S. Chung, T. Andersson, I. Y. C. Chen, K. S. P. McNaught, A.-L. Brownell, B. G. Jenkins, C. Wahlestedt and K.-S. Kim, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, **99**, 2344-2349.
5. O. Arias-Carrión, S. Hernández-López, O. Ibañez-Sandoval, J. Bargas, A. Hernández-Cruz and R. Drucker-Colín, *Journal of Neuroscience Research*, 2006, **84**, 1425-1437.
6. V. M. Mekler and S. M. Bystryak, *Analytica Chimica Acta*, 1992, **264**, 359-363.
7. L. Guo, Y. Zhang and Q. Li, *Analytical Sciences*, 2009, **25**, 1451-1455.
8. H. G. Ruhé, N. S. Mason and A. H. Schene, *Molecular Psychiatry*, 2007, **12**, 331.
9. S. Niu, Y. Fang, K. Zhang, J. Sun and J. Wan, *Instrumentation Science & Technology*, 2017, **45**, 101-110.
10. D. P. Nikolelis, D. A. Drivelos, M. G. Simantiraki and S. Koinis, *Analytical Chemistry*, 2004, **76**, 2174-2180.
11. S. Liu, X. Xing, J. Yu, W. Lian, J. Li, M. Cui and J. Huang, *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, **36**, 186-191.
12. B. Piro, Q. D. Zhang, S. Reisberg, V. Noel, L. A. Dang, H. T. Duc and M. C. Pham, *Talanta*, 2010, **82**, 608-612.
13. H. Y. Wang, Y. Sun and B. Tang, *Talanta*, 2002, **57**, 899-907.
14. J.-M. Zen and P.-J. Chen, *Analytical Chemistry*, 1997, **69**, 5087-5093.
15. B. A. McLaughlin, D. Nelson, M. Erecińska and M. F. Chesselet, *Journal of Neurochemistry*, 1998, **70**, 2406-2415.
16. M. Angélica del Valle, F. R. Díaz, M. E. Bodini, G. Alfonso, G. M. Soto and E. D. Borrego, *Polymer International*, 2005, **54**, 526-532.
17. J. Kaizer, R. Csonka and G. Speier, *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*, 2002, **75**, 367-374.
18. A. H. Premasiri and W. B. Euler, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 1995, **196**, 3655-3666.
19. S. Liu, X. Qin, J. Tian, L. Wang and X. Sun, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012, **171**, 886-890.
20. X. Sun and M. Hagner, *Langmuir*, 2007, **23**, 10441-10444.
21. Y. L. Jiang and C. L. Feng, *Guang pu xue yu guang pu fen xi = Guang pu*, 2002, **22**, 436-440.
22. S. Fornera and P. Walde, *Analytical Biochemistry*, 2010, **407**, 293-295.
23. P. Zhou, H. Liu, S. Chen, L. Lucia, H. Zhan and S. Fu, *Molbank*, 2011, **2011**.
24. C. Zhao, Z. Jiang, R. Mu and Y. Li, *Talanta*, 2016, **159**, 365-370.
25. S. Sylvestre, S. Sebastian, K. Oudayakumar, T. Jayavarthanam and N. Sundaraganesan, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012, **96**, 401-412.
26. Z.-F. Chen, Z.-L. Zhang, Y.-H. Tan, Y.-Z. Tang, H.-K. Fun, Z.-Y. Zhou, B. F. Abrahams and H. Liang, *CrystEngComm*, 2008, **10**, 217-231.
27. J. An and N. L. Rosi, *Journal of the American Chemical Society*, 2010, **132**, 5578-5579.
28. S. Rojas, T. Devic and P. Horcajada, *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, **5**, 2560-2573.

29. L.-N. Duan, Q.-Q. Dang, C.-Y. Han and X.-M. Zhang, *Dalton Transactions*, 2015, **44**, 1800-1804.
30. G. Ayano, *J Ment Disord Treat*, 2016, **2**, 2.
31. J. A. Alberts B, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P, *Molecular Biology of the Cell*, Sixth edn., UK, 2014.
32. G. Di Chiara, *Alcohol Research and Health*, 1997, **21**, 108.
33. E. S. Bucher and R. M. Wightman, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2015, **8**, 239-261.
34. D. A. McCormick, *Progress in neurobiology*, 1992, **39**, 337-388.
35. R. Bahena-Trujillo, G. Flores and J. A. Arias-Montaño, *Revista Biomedica*, 2000, **11**, 39-60.
36. T. Nagatsu and M. Sawada, *Parkinsonism & related disorders*, 2009, **15**, S3-S8.
37. J. T. Levitt, T. A. Brown, S. M. Orsillo and D. H. Barlow, *Behavior therapy*, 2004, **35**, 747-766.
38. S. C. Daubner, T. Le and S. Wang, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011, **508**, 1-12.
39. J. Lotharius and P. Brundin, *Nature Reviews Neuroscience*, 2002, **3**, 932-942.
40. G. Di Chiara, *Handbook of chemical neuroanatomy*, 2005, **21**, 303-394.
41. J.-M. Beaulieu and R. R. Gainetdinov, *Pharmacological Reviews*, 2011, **63**, 182-217.
42. L. Heimer, G. F. Alheid, J. De Olmos, H. J. Groenewegen, S. N. Haber, R. E. Harlan and D. S. Zahm, *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 1997, **9**, 354-381.
43. J. L. B. Ramón Latorre, Francisco Bezanilla, Rodolfo Llinás, *Biofísica y fisiología celular*, Universidad de Sevilla, 1996.
44. E. Yu, E. Kanno, S. Choi, M. Sugimori, J. E. Moreira, R. R. Llinás and M. Fukuda, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, **105**, 16003-16008.
45. O. Hornykiewicz, *Pharmacological reviews*, 1966, **18**, 925-964.
46. M. Jaber, S. W. Robinson, C. Missale and M. G. Caron, *Neuropharmacology*, 1996, **35**, 1503-1519.
47. E. Diamanti-Kandarakis, J.-P. Bourguignon, L. C. Giudice, R. Hauser, G. S. Prins, A. M. Soto, R. T. Zoeller and A. C. Gore, *Endocrine reviews*, 2009, **30**, 293-342.
48. A. J. V. VERA and J. A. L. Cancio, *DYNA*, 2000, **75**, 33-36.
49. K. Jackowska and P. Kryszynski, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2013, **405**, 3753-3771.
50. D. He, Y. Wu and B.-Q. Xu, *European polymer journal*, 2007, **43**, 3703-3709.
51. R. D. P. A. ESCOBAR.
52. R. C. C. Gómez, *Ingenierias*, 2004, **7**, 12-16.
53. J. L. I. Razcón, C. C. Vázquez, R. Bernal, H. A. B. Nuñez and V. M. Castaño, *Electronic Materials Letters*, 2017, **13**, 25-28.
54. X.-G. Li, X.-L. Ma, J. Sun and M.-R. Huang, *Langmuir*, 2009, **25**, 1675-1684.
55. Y. Wang and D. K. Newman, *Environmental science & technology*, 2008, **42**, 2380-2386.
56. J. B. Laursen and J. Nielsen, *Chemical reviews*, 2004, **104**, 1663-1686.
57. A. Cimmino, A. Evidente, V. Mathieu, A. Andolfi, F. Lefranc, A. Kornienko and R. Kiss, *Natural Product Reports*, 2012, **29**, 487-501.
58. O. NAKAYAMA, M. Yagi, M. Tanaka, S. Kiyoto, M. Okuhara and M. KOHSAKA, *The Journal of antibiotics*, 1989, **42**, 1221-1229.
59. S. Kato, K. Shindo, Y. Yamagishi, M. Matsuoka, H. Kawai and J. Mochizuki, *The Journal of antibiotics*, 1993, **46**, 1485-1493.
60. N. Raman, Y. P. Raja and A. Kulandaisamy, *PROCEEDINGS-INDIAN ACADEMY OF SCIENCES CHEMICAL SCIENCES*, 2001.
61. S. Y. Kishioka, *Redox Properties of 2,3-Diaminophenazine and Its Electropolymerized Product in Aqueous and Acetonitrile Solutions*, 2013.
62. S. Sorribas and C. Téllez, *Boletín del Grupo Español del Carbón*, 2016, 19-22.

63. A. C. McKinlay, R. E. Morris, P. Horcajada, G. Férey, R. Gref, P. Couvreur and C. Serre, *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, **49**, 6260-6266.
64. J. An, University of Pittsburgh, 2011.
65. C. Tamames Tabar, Versailles-St Quentin en Yvelines, 2014.
66. C. V. McGuire and R. S. Forgan, *Chemical communications*, 2015, **51**, 5199-5217.
67. H. Li, M. Eddaoudi, M. O'Keeffe and O. M. Yaghi, *nature*, 1999, **402**, 276.
68. S. S.-Y. Chui, S. M.-F. Lo, J. P. Charmant, A. G. Orpen and I. D. Williams, *Science*, 1999, **283**, 1148-1150.
69. V. André and S. Quaresma, in *Metal-Organic Frameworks*, eds. F. Zafar and E. Sharmin, InTech, Rijeka, 2016, p. Ch. 07.
70. N. J. Hinks, A. C. McKinlay, B. Xiao, P. S. Wheatley and R. E. Morris, *Microporous and Mesoporous Materials*, 2010, **129**, 330-334.
71. J. An, S. J. Geib and N. L. Rosi, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, **131**, 8376-8377.
72. S. R. Miller, D. Heurtaux, T. Baati, P. Horcajada, J.-M. Grenèche and C. Serre, *Chemical Communications*, 2010, **46**, 4526-4528.
73. G. Wyszogrodzka, B. Marszałek, B. Gil and P. Dorożyński, *Drug Discovery Today*, 2016, **21**, 1009-1018.
74. P. J. Tarcha, V. P. Chu and D. Whittern, *Analytical Biochemistry*, 1987, **165**, 230-233.
75. L. Chai, L. Zhang, H. Wang, W. Yu and P. Sang, *Materials Letters*, 2010, **64**, 2302-2305.
76. J. An, O. K. Farha, J. T. Hupp, E. Pohl, J. I. Yeh and N. L. Rosi, *Nature communications*, 2012, **3**, 604.
77. G. Widmann, *User Com*, 2001, **1**, 1-20.
78. M. Dubinin, *Chemical Reviews*, 1960, **60**, 235-241.
79. X. Liu, L. Cheng, J. Lei and H. Ju, *Analyst*, 2008, **133**, 1161-1163.