



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIOS DE PELÍCULAS DE PORFIRINAS Y SU INTERACCIÓN CON
AMINOÁCIDOS

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. EN C. JESÚS MIGUEL RIVERA CRUZ

Tutor: DRA. MARGARITA RIVERA HERNÁNDEZ

INSTITUTO DE FÍSICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., FEBRERO 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIOS DE PELÍCULAS DE PORFIRINAS Y SU INTERACCIÓN CON
AMINOÁCIDOS

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. EN C. JESÚS MIGUEL RIVERA CRUZ

Tutor: DRA. MARGARITA RIVERA HERNÁNDEZ

INSTITUTO DE FÍSICA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., FEBRERO 2021

“Ves cosas y dices, ¿Por qué?, pero yo sueño cosas que nunca fueron y digo ¿Por qué no?”

George Bernard Shaw

“En algún lugar, una cosa increíble, aguarda a ser descubierta”

Carl Sagan

“Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”

Marie Curie

Dedicatorias

A mi mamá, María de la Luz, gracias por estar conmigo, por apoyarme y brindarme todo tu cariño, termina una etapa en donde tú eras mi sostén, ahora quiero ser yo, quién este para ti, quiero que mi trabajo y esfuerzo te hagan sentir orgullosa de la persona que soy gracias a ti.

A Claudia Nathalli, gracias por estar a mi lado, por escucharme y darme tu opinión, gracias por brindarme tu amor y por enseñarme a amar cada día más, por llenarte de paciencia para después gastarla en mi, ya llego el momento en que debemos de empezar con la construcción de las escaleras para nuestro castillo en el cielo.

Agradecimientos

A la Dra. Margarita Rivera por mostrarme su apoyo y confianza al dejarme desarrollar este proyecto, por guiarme durante el proceso y por animarme a siempre superarme y fijarme metas cada vez más altas.

Agradezco a la Dra. Pilar Carreón y al Dr. Ernesto Rivera por los consejos y el apoyo que me mostraron a lo largo del desarrollo del proyecto.

Agradezco a **CONACyT**, por el apoyo económico brindado, para la realización de este trabajo de investigación, con CVU: **555178** y No. de Becario: **293324**.

Se agradece a los proyectos **PAPIIT-UNAM IN108017** y **PAPIIT-UNAM IN112420** por el apoyo en la adquisición de materiales y consumibles.

Se agradece al proyecto **LANCAD-UNAM-DGTIC-289** por el uso de los recursos de super-computo para los cálculos DFT mostrados en esta tesis.

Al Laboratorio Central de Microscopia del Instituto de Física de la UNAM por el uso de los microscopios SEM7800F y AFM4210, y en especial, al Arq. Diego Quitero, por la preparación de las películas para ser analizadas por SEM; al Dr. Carlos Magaña y al Dr. Samuel Tehuacanero por las imágenes de SEM obtenidas, y al M. en C. Manuel Aguilar por el apoyo con el equipo de AFM, así como con la adquisición de imágenes por esta técnica.

Se agradece al Fís. Héctor de Jesús Cruz Manjarrez y M. en I. Jorge Israel Cruz Morales por su apoyo en la revisión y mantenimiento de varios de los equipos empleados en este trabajo.

Finalmente, quiero agradecerle al Sr. Arturo Martínez por la ayuda que me brindo a lo largo del proyecto, al apoyarme con la preparación de muestras, el manejo de equipo en el laboratorio, y sobre todo, por darme ánimos en los momentos más pesados de los experimentos.

Resumen

En esta tesis, se emplearon películas delgadas de tetrafenil porfirina de cobre (CuTPP), zinc (ZnTPP) y sin centro metálico (H_2 TPP) depositadas por evaporación física para estudiar su interacción con los aminoácidos glicina, serina, glutamato, lisina y arginina, con el fin de investigar el efecto del centro metálico y las características de los aminoácidos, en los fenómenos de adsorción.

Se estudio la morfología de las películas antes y después de la inmersión en las disoluciones de aminoácidos, utilizando los microscopios electrónico de barrido y de fuerza atómica. La cantidad de aminoácidos adsorbidos en las películas se cuantificó utilizando el método de Ruhemann con el que se determinó que la serina, fue el aminoácidos que menos se adsorbio en todas las películas, mientras que para las películas con centro de Cu, la arginina fue el aminoácido más adsorbido. Por otro lado, las películas de porfirina libre y con Zn mostraron mayor adsorción hacía la lisina.

Además, se obtuvieron y analizaron isothermas de adsorción para conocer el tipo de interacción entre algunos aminoácidos con las película de porfirina. Se utilizaron dos modelos de adsorción, Langmuir y Freundlich, para analizar la respuesta experimental. En base a esto, se determinó que el modelo de Freundlich era el que mejor describía la adsorción de los aminoácidos, indicando que se trata de una adsorción en multicapas.

Por otro lado, se hizo un análisis cinético en donde se estudio el comportamiento de la adsorción del aminoácido en cada película en función del tiempo de interacción. Para ello, se usaron dos modelos cinéticos de adsorción, a saber, el de pseudo primer orden y pseudo segundo orden. El primero, describe una interacción de tipo física, mientras que el segundo una de tipo química.

El resultando que se obtuvo en la mayoría de las interacciones quedo clasificado como de pseudo segundo orden, indicando que son quimisorciones en casi todos los casos.

Asimismo, se analizaron los cambios de adsorbancia en las películas de porfirinas antes y después de la interacción utilizando espectroscopía UV-Vis, en donde se observaron desplazamientos batocrómicos en las bandas de Soret para todos los aminoácidos que interactuaron con la H_2TPP y $ZnTPP$.

Por otro lado, la posición de la banda de Soret apenas cambio cuando se uso la superficie de $CuTPP$, excepto por un ligero desplazamiento batocrómico para la arginina. También, se observó que el ensanchamiento de la banda de Soret fue más importante para las superficies de $ZnTPP$ y H_2TPP , pero la interacción con las interfaces de $CuTPP$ disminuyó el ancho de las bandas en todos los casos.

Adicionalmente, se empleó una microbalanza de cuarzo para investigar la adsorción de los aminoácidos en las películas como función del tiempo. A partir de estos resultados, se identificó que los aminoácidos cargados positivamente (arginina y lisina) no solo se adsorbieron con mayor facilidad en las películas, sino también en mayor cantidad. Lo anterior contrasto con el aminoácido polar serina, que fue el que menos material adsorbió en todas las superficies.

También, se realizaron mediciones del ángulo de contacto dinámico para monitorear el fenómeno de mojado, así como los cambios en la naturaleza hidrófoba de las superficies después de la interacción con los aminoácidos. A partir de los resultados, se observó que el aminoácido depositado que mostró un mayor ángulo de contacto en las superficies, fue el aminoácido que más adsorción mostró, siendo la arginina para la $CuTPP$, mientras que para la H_2TPP y $ZnTPP$, fue la lisina. Por otro lado, la serina fue el aminoácido adsorbido con menor ángulo de contacto en todos los casos.

Los cálculos de teoría de funcionales de la densidad (DFT) mostraron deformaciones importantes

para la molécula H₂TPP, el desplazamiento fuera del plano del átomo de Zn para la molécula de ZnTPP, e interacciones de enlaces de hidrógeno con la molécula de CuTPP. Los resultados obtenidos con DFT, también mostraron altas energías de enlace para los aminoácidos cargados positivamente, pero bajas energías de enlace para la serina, de acuerdo con los datos experimentales.

A partir de estos resultados, se puede inferir que las películas de porfirina podrían usarse como elementos de identificación selectivos para diferentes moléculas de L-aminoácidos.

Derivado de este proyecto, se publicaron dos artículos en la revista "Journal of Porphyrins and Phthalocyanines", los cuales se anexan en el apéndice de este trabajo:

1. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2020; 24: 577–588
DOI: 10.1142/S1088424620500108
2. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2020; A–I
DOI: 10.1142/S1088424620500340

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Sensores	1
1.1.1. Características de un sensor	3
1.1.2. Tipos de selectividad de un sensor	4
1.1.3. Diseño básico de sensores químicos	5
1.1.4. Moléculas macrocíclicas aplicadas en sensores	6
1.2. Porphirinas	6
1.2.1. Estructura de la porfirina	7
1.2.2. Espectro UV-Vis de las porfirinas	9
1.2.3. Metaloporphirinas	10
1.3. Películas delgadas	12
1.3.1. Películas delgadas de materiales moleculares	14
1.3.2. Formación de películas delgadas	15
1.4. Aminoácidos	17
1.4.1. Química de los aminoácidos	17
1.4.2. Enfermedades asociadas a los aminoácidos	20
1.4.3. Cuantificación de aminoácidos	23
1.5. Hipótesis	25
1.6. Objetivos	25
2. Antecedentes	27
2.1. Porphirina soluble	27
2.1.1. Espectro UV-Vis en presencia de aminoácidos	28
2.2. Sitios de interacción entre porfirinas y aminoácidos	30
2.3. Interacción aminoácido - porfirinas inmovilizadas	31
2.3.1. Modificaciones en las bandas de Soret	32
3. Metodología	34
3.1. Compuestos utilizados	34
3.2. Selección de aminoácidos	34
3.2.1. Preparación de disoluciones	35
3.3. Preparación de sustratos	38
3.3.1. Vidrio	38
3.3.2. Discos de cuarzo	39
3.4. Formación de películas vía evaporación térmica	39
3.5. Caracterización de las películas	40

3.5.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM)	40
3.5.2. Microscopia de Fuerza atómica (AFM)	41
3.5.3. Espectros UV-Vis de las películas de porfirina	42
3.6. Cuantificación de aminoácidos	43
3.6.1. Curvas de calibración	43
3.6.2. Cuantificación de aminoácido residual y adsorbido	43
3.7. Isotermas de adsorción de aminoácido en películas	44
3.8. Cinética de adsorción de aminoácidos en películas	45
3.9. Microbalanza de cuarzo	45
3.10. Ángulo de contacto	46
3.11. Cálculos empleando la teoría de funcionales de la densidad (DFT)	46
4. Resultados y Discusión	48
4.1. Caracterización de las películas	48
4.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)	48
4.2.1. Análisis de las imágenes SEM de la película CuTPP	49
4.2.2. Análisis de las imágenes SEM de la película H ₂ TPP	51
4.2.3. Análisis de las imágenes SEM de la película ZnTPP	52
4.3. Microscopia de Fuerza atómica (AFM)	54
4.3.1. Análisis de las imágenes de AFM de la película CuTPP	54
4.3.2. Análisis de las imágenes AFM de la película H ₂ TPP	56
4.3.3. Análisis de las imágenes AFM de la película ZnTPP	56
4.4. Espectros UV-Vis de las películas de porfirina	59
4.5. Cuantificación de aminoácidos	63
4.5.1. Curvas de calibración	63
4.5.2. Cuantificación del aminoácido residual y adsorbido	64
4.6. Isotermas de adsorción de aminoácido	68
4.6.1. Isotherma de Langmuir	68
4.6.2. Isotherma de Freundlich	72
4.7. Cinética de adsorción de aminoácidos en películas	75
4.7.1. Análisis cinético de la película de CuTPP	76
4.7.2. Análisis cinético de la película de H ₂ TPP	78
4.7.3. Análisis cinético de la película de ZnTPP	80
4.8. Microbalanza de cuarzo	83
4.8.1. Evolución temporal de la adsorción en la película de CuTPP	83
4.8.2. Evolución temporal de la adsorción en la película de H ₂ TPP	86
4.8.3. Evolución temporal de la adsorción en la película de ZnTPP	89
4.9. Ángulo de contacto	92
4.10. Cálculos usando la teoría de funcionales de la densidad (DFT)	97
4.10.1. Estudio DFT para el sistema CuTPP	97
4.10.2. Estudio DFT para la H ₂ TPP	98
4.10.3. Estudio DFT para la ZnTPP	99
5. Conclusiones	102
Referencias	104

Apéndice	110
.1. Artículos	111
.2. Técnicas de caracterización	132
.2.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	132
.2.2. Microscopia de Fuerza atómica (AFM)	133
.2.3. Espectroscopia Ultravioleta-visible	135
.2.4. Ángulo de contacto	136
.2.5. Microbalanza de cuarzo	137
.2.6. Cálculos DFT	140
.3. Fundamentos de adsorción	142
.3.1. Tipos de adsorción	142
.3.2. Isotermas de adsorción	143
.3.3. Modelos de isotermas de adsorción	145
.3.4. Modelo de Langmuir	145
.3.5. Modelo de Freundlich	147
.4. Cinética química	148
.4.1. Velocidad de reacción	148
.4.2. Ley de velocidad o ecuación de velocidad	149
.4.3. Modelos cinéticos de adsorción	149

Capítulo 1

Introducción

1.1. Sensores

Los sensores son elementos sensibles a señales o estímulos del medio circundante que transforman cierta propiedad física o química en una señal útil que pueda ser procesada de una manera rápida y sin necesidad de análisis muy complejos. Estas características, combinadas con la incorporación de los últimos avances en tecnologías de miniaturización en la fabricación masiva de sensores, permiten fabricar elementos de gran interés para la industria y la sociedad en general [1]. Existen dos clases de sensores, clasificados según el tipo de información que son capaces de transformar:

- **Físicos:** Sensores que detectan cambios en parámetros físicos (temperatura, presión, flujo de masa, etc.) [1].
- **Químicos:** Detectan cambios de pH, concentración, composición, etc.[1].

En la actualidad, la mayoría de los sensores utilizados para el control de procesos industriales son físicos. Sin embargo, las interacciones con compuestos químicos son cada vez más importantes, y esto, ha favorecido la investigación y el desarrollo de elementos de detección de tipo químico [2, 3, 4, 5].

La investigación para el diseño de sensores químicos se presentan como una clara alternativa ya que ofrece una sensibilidad mucho menor a la ofrecida por la instrumentación analítica convencional, la cual tradicionalmente ha utilizado instrumentación muy sofisticada tal como cromatógrafos, espectrofotómetros, ICP-masas, etc., que requieren altos costos de manejo, mantenimiento, y alta

especialización por parte del operador. Además, este tipo de equipos son incompatibles con análisis en continuo o pruebas de campo, lo que ha limitado su uso comercial [1, 6].

A pesar de lo anterior, y gracias a los avances tecnológicos actuales, hoy en día existe un número considerable de sensores químicos que se emplean principalmente en áreas como biomedicina y medio ambiente, entre otros. Sin embargo, en los últimos años, sectores como la industria alimentaria, así como la bioseguridad, han impulsado su desarrollo dadas sus necesidades particulares [2, 4, 5, 7].

De manera específica, un sensor químico es un elemento capaz de traducir la información química de una muestra en una señal cuantificable útil. Los sensores químicos constan de dos componentes básicos: un sistema de reconocimiento o receptor, y un transductor [6]. El receptor reconoce selectivamente la información química presente en la muestra y la convierte de forma que pueda ser reconocida por el transductor. Éste último, la transforma a su vez de una señal primaria a una señal secundaria fácilmente procesable que generalmente es de tipo eléctrico u óptica [1, 6].

Tipos de transductores	Descripción
Ópticos	Transforman los cambios producidos en una señal óptica por la interacción de un analito con el receptor.
Químicos	La señal transformada es debida a una interacción química entre analito y el electrodo.
Piezoeléctricos	Transforman cambios de fuerzas que se dan sobre el electrodo en cambios de voltaje o viceversa.
Térmicos	Son capaces de medir cambio de temperatura del elemento a investigar.
Eléctricos	Son elementos capaces de medir un cambio en la conducción eléctrica en el receptor

Tabla 1.1: Tipos de transductores [1]

La clasificación de los sensores se puede realizar atendiendo a diferentes criterios. Principalmente, se consideran el tipo de receptor y la metodología empleada para inmovilizar este receptor, ó el tipo de transductor utilizado, siendo el segundo el más aceptado. En la tabla 1.1 se engloban algunos de los distintos tipos de sensores según el último criterio [6].

1.1.1. Características de un sensor

Las características principales que debe de tener un sensor son [6]:

- Selectividad
- Sensibilidad
- Buena respuesta en el tiempo
- Tamaño pequeño

En la actualidad, el diseñar sensores que cumplan con todas estas características es demasiado complicado, siendo la selectividad, es una de las características más importantes y quizá, una de las más difíciles de conseguir. En ausencia de una adecuada selectividad se han desarrollado diversos tipos de sensores con diferentes características que permiten aumentar la selectividad [6]:

- *Sensores con limitada selectividad:* muchos de estos sensores pueden ser aceptables en un ambiente controlado, donde se puede conocer y controlar la naturaleza y el rango de diferentes contaminantes, así como las cantidades o concentraciones esperadas de analito que se puedan identificar con la presencia de estos contaminantes [6].
- *Sensores poco selectivos con arreglos matemáticos:* Este tipo de arreglos generalmente son una mezcla de sensores donde cada uno genera una señal para el analito o algún contaminante en específico que se encuentre en la muestra. Después, un apropiado análisis matemático puede permitir la extracción de la respuesta del analito de la mezcla obtenida de los múltiples sensores [6].
- *Sensores sensibles pero no selectivos:* En este caso, el sensor es capaz de detectar un gran numero de analitos dentro de una disolución con contaminantes. Sin embargo, no es capaz de distinguir entre los diferentes analitos presentes, por lo que en este tipo de procesos es necesario llevar a cabo separaciones por diferentes técnicas como cromatografías y electroforesis [6].

1.1.2. Tipos de selectividad de un sensor

La selectividad del sensor hacia su analito puede lograrse por medio de diferentes maneras, algunas de ellas son:

- *Reconocimiento del tamaño / forma / propiedades por películas:* Esto puede ser por receptores (estructuras que permiten el reconocimiento molecular) o la interacción anfitrión- huésped con moléculas que presenten ciertas cavidades. Este reconocimiento molecular conduce a una adsorción o absorción del analito al material sensor [6].
- *Permeación selectiva del analito en un sensor en forma de película:* Si la unión o permeación del analito es reversible, la película sensor puede ser reutilizable para futuras mediciones. Una unión irreversible entre el analito y el sensor, o reacciones secundarias con contaminantes, pueden ocupar sitios en el sensor e ir consumiendo su capacidad de detección por limitación estequiométrica [6].
- *Reacciones catalíticas por el material sensor:* En este caso, el sensor consume al analito y no puede ser usado para varias determinaciones [6].

Miniaturización de sensores

Los orígenes de la química de sensores a menudo incluyen estudios analíticos usando instrumentos voluminosos y complejos, lo que impedía su uso en diferentes circunstancias. Es por eso que, en los últimos años, se ha buscado transformar la necesidad de utilizar instrumentos voluminosos en algo más útil y que también implique una disminución en los costos de formación e implementación [1, 6].

Lo anterior, requiere generalmente llevar a cabo una miniaturización del sensor y utilizar técnicas más sencillas de caracterización y lectura de los resultados. Sin embargo, esta miniaturización suele venir acompañada de una disminución en el rendimiento del sensor, y principalmente, de su selectividad [1, 6].

En la miniaturización de sensores actualmente existen diferentes tipos empleados, tales como [1, 6]:

- Recubrimientos y películas delgadas con cierto nivel de selectividad basada en: Selectividad química, eficiencia cromatográfica, exclusión molecular, estabilidad bajo gradientes de campo eléctrico etc.

- Fibras ópticas que llegan a aumentar el rango de rendimiento y mejorar la sensibilidad del detector.

1.1.3. Diseño básico de sensores químicos

Los sensores químicos de estado sólido se componen generalmente de dos partes bien diferenciadas: un material químicamente interactivo (MQI) y un elemento básico. En el caso de este estudio, el MQI corresponderá a las películas de porfirina. El MQI es la interfaz entre el transductor y el medio ambiente, que se caracteriza por un mecanismo de detección que es capaz de capturar con una cierta selectividad las moléculas circundantes y, como consecuencia, cambia alguna de sus propiedades físicas o químicas. Un sensor básico, está convenientemente hecho como un circuito electrónico que permite interpretar los cambios en las propiedades físicas del MQI en una señal eléctrica (u óptica) [1, 6].

Por ejemplo, la microbalanza de cuarzo (QCM, por sus siglas en inglés) y las ondas acústicas superficiales (SAW, por su sigla en inglés) convierten cambios de masa o de presión sobre el MQI en una señal eléctrica. De igual forma, un transistor semiconductor-oxido-metal de efecto campo (MOSFET por sus siglas en inglés) puede traducir una variación de señal en cambios de corriente eléctrica. La figura 1.1 muestra un diseño genérico de un sensor químico [1, 6].

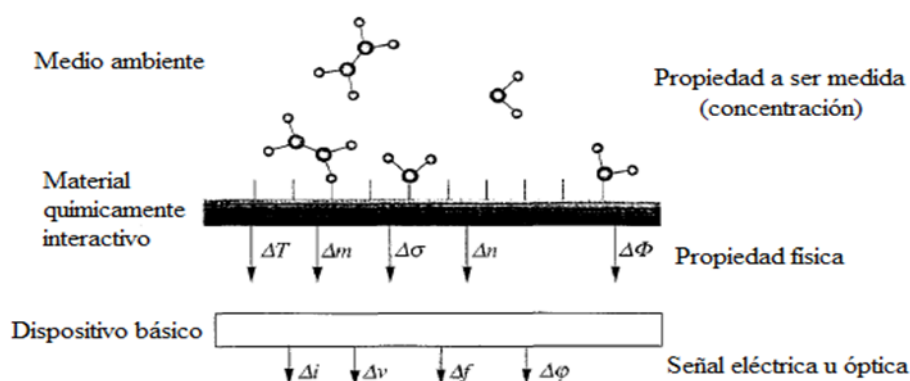


Figura 1.1: Un sensor químico genérico puede ser representado esquemáticamente por la unión de un material químicamente interactivo (MQI) y un elemento básico [6].

1.1.4. Moléculas macrocíclicas aplicadas en sensores

El estudio de la química macrocíclica es un área muy extensa del conocimiento que presenta múltiples áreas de aplicación. Una de estas áreas emplea moléculas de estas características para el reconocimiento de analitos, ya que ofrecen potenciales sitios de unión para moléculas pequeñas gracias a que los espacios que proveen funcionan como receptores. Típicamente, se tiene una interacción complementaria donde una de las moléculas (huésped u hospedero) es rica en carga electrónica y la otra deficiente, generando en la mayoría de los casos uniones no covalentes reversibles. Es debido a esta característica, que han sido ampliamente utilizadas para su uso como sensores [1, 6, 8].

Otra ventaja de las moléculas macrocíclicas, principalmente aquellas que tienen estructura plana, es que dada su geometría, pueden formar arreglos apilados que permiten no sólo un buen acomodo molecular, sino que pueden a su vez, propiciar un eficiente traslape orbital. Ya que este tipo de macrociclos presentan una alta deslocalización de electrones π -conjugados por la parte superior e inferior de la molécula, la eficiencia de traslape les permite exhibir propiedades eléctricas y ópticas únicas, mismas que pueden ser moduladas tomando ventaja de la capacidad de estos materiales para formar complejos estables con iones metálicos [1, 6, 8].

1.2. Porphirinas

En la actualidad, existen macrociclos orgánicos que presentan buenas propiedades eléctricas y ópticas debido principalmente a que los átomos de carbono de estos compuestos están unidos por dobles enlaces conjugados, dos ejemplo típicos de estos compuestos son las ftalocianinas y las porfirinas. Estos compuestos han demostrado que son materiales muy versátiles, ya que pueden ser modificadas fácilmente al hacer variaciones en ciertos elementos de coordinación o a través de incorporar ligantes en diferentes sitios de la molécula. Lo anterior, permite modificar sus propiedades físicas o químicas, que tendrán como consecuencia cambios importantes en ciertas respuestas del sistema.[9]

De manera específica, las porfirinas se han ido consolidando como compuestos de gran interés químico y físico debido a sus potenciales aplicaciones en tecnologías emergentes incluyendo cel-

das solares, fotoconductores y sensores químicos, entre muchos otros. Cuando las porfirinas se depositan en forma de película delgada, la capa expuesta tiene la capacidad de responder ante la presencia de diversos compuestos orgánicos, entre ellos, moléculas pequeñas o biológicas, al existir cambios en sus propiedades tales como la adsorción en el espectro UV-Vis, rugosidad, propiedades eléctricas, entre otras.[10]

1.2.1. Estructura de la porfirina

Todas las porfirinas tienen la misma estructura “clásica”. Esta consiste en cuatro “pirroles”, (figura 1.2 (a)) enlazados por cuatro puentes metínicos (figura 1.2 (b)). La estructura resultante es un macrociclo con propiedades físicas y químicas diferentes a sus precursores, aunque dependen de la manera en que éstos fueron ensamblados.[7]

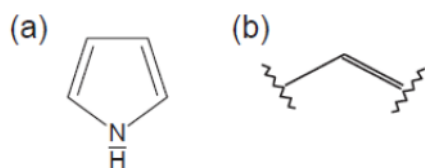


Figura 1.2: a) pirroles, b) puentes metínicos [7]

Hans Fischer creó el primer sistema de nomenclatura para las porfirinas, donde señala cuales son los sitios preferenciales para colocar algún sustituyente. Dentro de los “fragmentos del pirrol”, los carbonos adyacentes al nitrógeno fueron llamados α -carbonos. Sin embargo, no participaban en una sustitución por lo que no fueron enumerados. Por otro lado, los denominados β -carbonos, en donde sí era posible enlazar un sustituyente, fueron enumerados del 1 al 8, y los carbonos puente meso-carbonos, fueron nombrados usando las letras griegas, α , β , γ y δ como se muestra en la figura 1.3(c) [7]. Este método para nombrar a las porfirinas se utilizó con éxito hasta 1979, cuando el número y complejidad de las porfirinas sintetizadas resultó en una ambigüedad. A partir de ese momento, la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, IUPAC (por sus siglas en inglés), propuso una nueva nomenclatura en la cual numera del 1 al 24 todos los carbonos y nitrógenos en el macrociclo como se muestra en la figura 1.3(d) [7]. Además, el macrocíclico de la porfirina cumple con la teoría ideada por el físico alemán Erich Hückel en 1931, en donde una molécula es aromática sólo si tiene un sistema de conjugación monocíclico plano y si este contiene un total

$4n + 2$ electrones π , donde n es un número entero ($n = 0, 1, 2, 3, \dots$) [11], en el caso específico de la porfirina, tiene 18 π -electrones conjugados, haciendo que la teoría de Hückel se cumpla con $n = 4$.

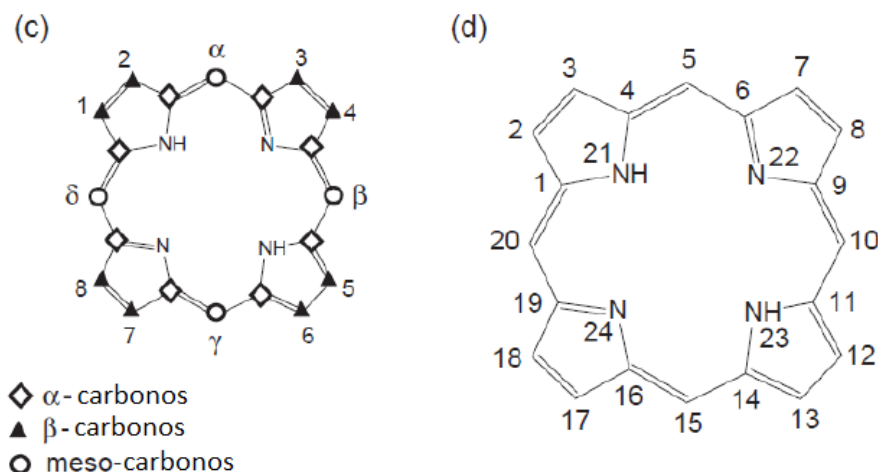


Figura 1.3: c) nomenclatura de Hans Fischer, d) nomenclatura IUPAC [7]

El macrociclo puede ser sustituido en las posiciones β y meso en la periferia, o dentro del macrociclo, al reemplazar los hidrógenos centrales principalmente con un metal. En el caso de la sustitución en las posiciones meso, se pueden diseñar desde moléculas simples hasta sistemas dendríticos de gran peso molecular [12]. Por otro lado, a la fecha, las porfirinas han sido coordinadas a diferentes metales de transición, de tal forma que se altera tanto la geometría como la estructura, dando lugar a cambios en sus propiedades físicas y químicas [10].

Algunos de los ejemplos más comunes de las porfirinas como elementos que se encuentran en la naturaleza dada su actividad son: los grupos hemo de la hemoglobina que contienen una porfirina que tiene la función de capturar hierro, así como de transportar oxígeno en el organismo; La clorofina, que contiene una porfirina coordinada a un magnesio, cuya finalidad de absorber energía para participar en el proceso de la fotosíntesis; La cianocobalamina (o vitamina B12) que contiene una porfirina unida a un metal de cobalto, la cuál participa en la maduración de los eritrocitos, entre otros ejemplos [13].

1.2.2. Espectro UV-Vis de las porfirinas

El espectro UV-Vis típico de absorción de una porfirina se compone por dos regiones distintas, una en el ultravioleta cercano y otra en la región del visible. La primera banda corresponde a la transición desde el estado fundamental al segundo estado excitado y se conoce como banda de Soret. La zona de absorción aparece aproximadamente entre los 300 y 400 nm dependiendo de la sustitución de la porfirina. La segunda región es el resultado de transiciones más débiles desde el estado fundamental al primer estado excitado en el intervalo entre 400 y 650 nm generando las bandas Q. Estos picos proporcionan una identificación fácil y precisa de los estados de enlace y transiciones electrónicas en las porfirinas, que se pueden determinar a través de métodos de espectroscopia UV-Visible. El espectro de absorción de una porfirina libre de metal se muestra en la figura 1.4.

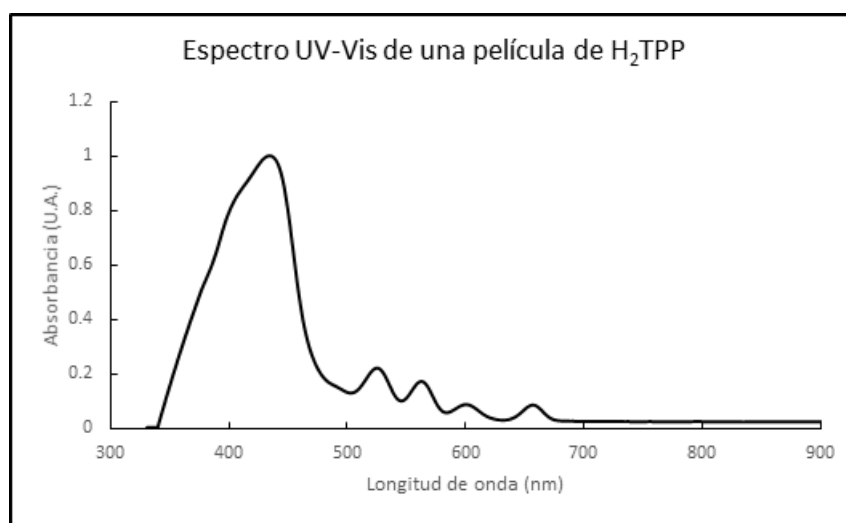


Figura 1.4: Espectro UV-Vis de una película (estado sólido) de tetrafenil porfirina sin centro metálico (H_2TPP)

Se ha documentado ampliamente que los cambios en la conjugación y la simetría de una porfirina afectan su espectro de absorción óptica en la región UV-Vis. El espectro de absorción de las porfirinas sigue un modelo aplicado por primera vez en 1959 por Martín Gouterman, en donde se introdujo el concepto de la existencia de “cuatro orbitales”, asumiendo una simetría C_{2v} .

Según esta teoría, las bandas de absorción en las porfirinas surgen de las transiciones entre $HOMO - LUMO^{+1}$ y $HOMO^{-1} - LUMO^{+1}$ [10], en donde la identidad del centro metálico

y de los sustituyentes en el macrociclo afecta las energías relativas de estas transiciones. Los $HOMO^{-1} - HOMO$ se asociaron a orbitales a_{1u} y a_{2u} , mientras que los $LUMO - LUMO^{+1}$ se asociaron a un conjunto degenerado de orbitales e_g . Las transiciones entre estos orbitales dieron origen a dos estados excitados, donde la mezcla de orbitales divide estos dos estados de energía, creando un estado de mayor energía con una gran fuerza oscilatoria llamada banda de Soret, y un estado de energía con menos fuerza, que da lugar a las bandas Q. Cabe señalar que las porfirinas no coordinadas presentan en su banda Q una serie de 4 picos característicos representados en la figura 1.5.

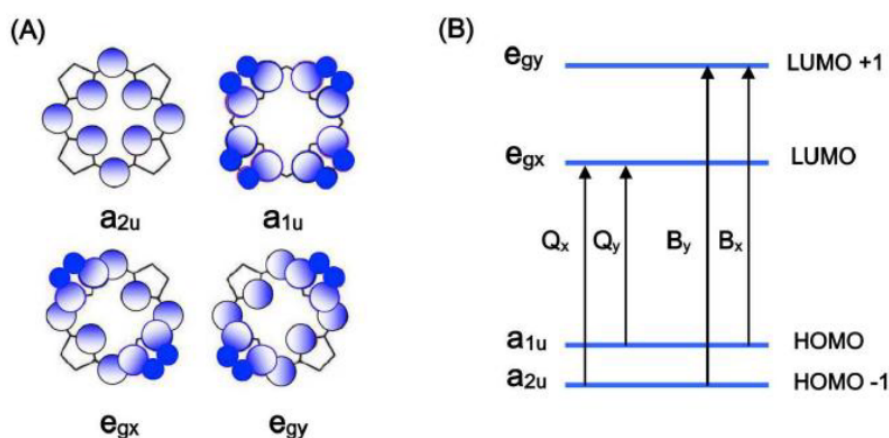


Figura 1.5: (A) Representación de los cuatro orbitales de Gouterman en las porfirinas (B) Esquema de los niveles energéticos de los cuatro orbitales [10]

1.2.3. Metaloporfirinas

La formación de las metaloporfirinas es uno de los procesos más importantes desde el punto de vista analítico y bioinorgánico. Gracias al coeficiente de absorción molar y a la estabilidad que presentan las porfirinas, en análisis UV-Vis, se pueden diferenciar entre una porfirina sin centro metálico y una que posee uno. Por otro lado, las diversas velocidades de reacción para la formación de las metaloporfirinas, permiten hacer un análisis cinético, para entender la incorporación de un metal al macrociclo de la porfirina [10].

Con la formación de las metaloporfirinas surge un cambio muy marcado en su espectro UV-Vis, especialmente en la zona de las bandas Q. Generalmente se forman dos bandas Q, llamadas α y β .

(figura 1.6) La intensidad relativa de estas bandas puede ser correlacionada con la estabilidad del complejo metálico, esto es, cuando $\alpha > \beta$, el metal forma un complejo cuadrado estable, mientras que en el otro caso, $\beta > \alpha$ (p.e. $Ni(II)$, $Pd(II)$, $Cd(II)$), los metales son fácilmente desplazados por protones [10].

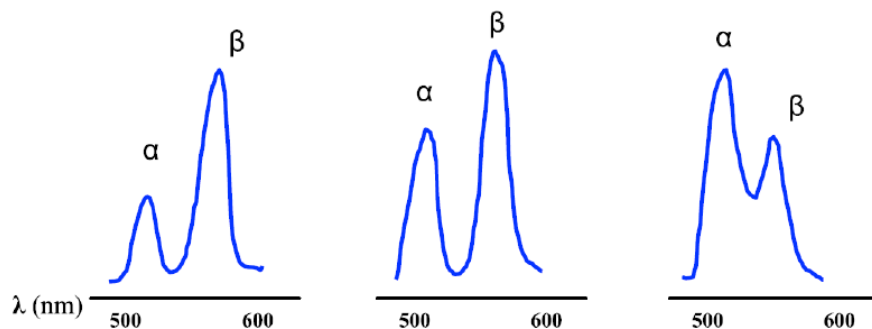


Figura 1.6: Bandas Q en complejos de metaloporfirinas [10]

El tamaño del macrociclo de la porfirina es perfecto para enlazar la mayoría de los iones metálicos y ciertamente un gran número de metales pueden ser insertados en el centro del macrociclo formado metaloporfirinas, las cuales son piezas clave en varios procesos bioquímicos [10, 14].

Dependiendo de la carga y el tamaño (50-80 pm) de los iones metálicos (p. e. Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , etc.), los átomos pueden caber en el centro del plano tetrapirrólico formando una *metaloporfirina regular* resultando en complejos cinéticamente inertes. Figura 1.7 (a). Sin embargo, cuando el radio iónico del metal es muy grande (80-90 pm) no cabe en el hueco del macrociclo, por lo que éste se localiza fuera del plano dando lugar a una *metaloporfirina "sitting-a-top" (SAT)*. Figura 1.7 (b).

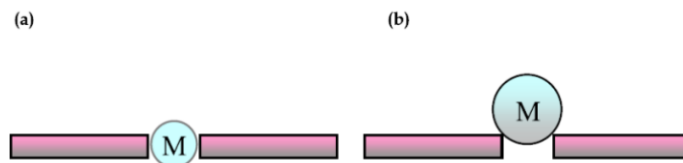


Figura 1.7: Representación esquemática de una metaloporfirina (a) regular y (b) SAT ("Sitting a top") [10]

Cuando un ion metálico divalente (p. e. Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) es coordinado a una porfirina, el

complejo tetracoordinado resultante no tiene carga residual. Además, el Cu^{2+} y el Ni^{2+} en sus complejos con porfirina generalmente tienen baja afinidad por un ligante adicional, mientras que los complejos de Cd^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} , fácilmente se combinan con un ligante más para formar un complejo pentacoordinado con geometría de pirámide de base cuadrada (figura 1.8 a)). Algunas metaloporfirinas (p.e. Co^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+}) son capaces de tomar una forma octaédrica (figura 1.8 b)) con dos ligantes adicionales.

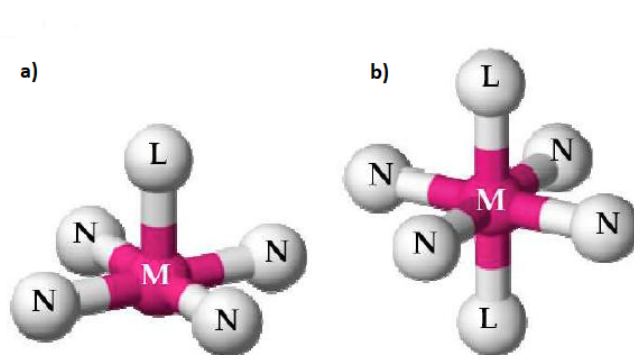


Figura 1.8: Representación esquemática de una estructura de pirámide de a) base cuadrada y b) octaédrica (sólo enlazadas a nitrógeno N, metal M y ligantes L) [10]

1.3. Películas delgadas

La inmensa mayoría de los dispositivos fabricados en la actualidad por cualquier rama de la industria (electrónica, mecánica, óptica, energía, transporte, deporte, etc.), requieren en algún momento de su construcción, de la síntesis y apilamiento sucesivo de pequeñas capas de materiales sólidos de espesores inferiores a una micra denominadas películas delgadas o capas finas. Por su extremada delgadez y fragilidad, estas películas no se suelen emplear aisladas sino que se hallan soportadas sobre otros sólidos de mayor grosor y distintas propiedades físicas o químicas que son denominados sustratos o soportes. (Figura 1.9 a)).

En términos generales, las películas delgadas se emplean para dos finalidades: la más simple, optimizar alguna o varias de las propiedades de los sustratos a los que recubren o incluso dotarlos de propiedades nuevas. En este caso, se suele referir a las películas delgadas con el termino de “recubrimiento”. La segunda aplicación generales es la fabricación de dispositivos con propiedades



Figura 1.9: a) Esquema de una capa delgada recubriendo un sustrato y b) de un sistema multicapa físicoquímicas específicas y singulares, que guardan muy poca o ninguna relación con las propiedades iniciales del sustrato. Lo anterior, hace que éste se comporte como un mero soporte físico. Para este segundo tipo de aplicación se pueden ocupar capas sencillas o sistemas multicapas.(Figura 1.9 b)).

Para que una película delgada cumpla su cometido, ya sea empleada como recubrimiento o formado parte de un sistema multicapa, es necesario que presente las siguientes características:

- Grosor, que podrá variar desde una sola capa de átomos (10^{-7}mm) hasta varias micras (10^{-3}mm).
- Composición química definida, con estequiometría que puede llegar a ser muy compleja y un control de impurezas que en los casos más exigentes pueden llegar a ser de una parte por billón.
- Estructura intrínseca definida, que puede ser amorfa, mono o policristalina. En los últimos casos, con sus respectivas propiedades microestructurales tales como tamaño cristalino, orientación, textura, etc.

Estas características de composición y estructura determinan las propiedades físicas o químicas de cada capa, y por ende, del arreglo completo. Algunas de estas propiedades son:

- Naturaleza eléctrica (conductor, aislante, semiconductor, etc.).
- Respuesta en presencia de luz (transparente, refractante, adsorbente, etc.).
- Comportamiento magnético (ferromagnético, antiferromagnético, paramagnético, etc.).
- Características químicas y/o biológicas (reactivo, inerte, catalítico, biocompatible, etc.).

Como consecuencia de la delgadez de las películas y de las exigencias anteriores, se precisa para su fabricación reacciones y técnicas especiales que se hallan en continua evolución y progreso, dado el interés de la ciencia básica y la industria por desarrollar dispositivos mejorados, aumentar su producción y abaratar su costo. Igualmente, se requieren de instrumentos y técnicas de caracterización muy sofisticados para lograr la determinación precisa de sus propiedades intrínsecas [8].

En la actualidad, existen diversos métodos de formación de películas de porfirinas. Entre las más empleadas a nivel micro y macroscópico se encuentran las técnicas de crecimiento por evaporación térmica, inmersión (“dip-coating”) y giro (“spin-coating”), que dan características particulares a las películas debido a los procesos específicos de formación de cada método.

1.3.1. Películas delgadas de materiales moleculares

Las películas delgadas de materiales orgánicos han atraído la atención de investigadores en áreas de ciencia básica y aplicada, debido principalmente a un bajo costo de fabricación y procesabilidad para lograr un fácil diseño. El autoensamble de dos o más unidades macrocíclicas en un arreglo unidimensional puede llevar a tener sistemas moleculares con características fisicoquímicas mejoradas.

Se pueden preparar materiales moleculares como películas delgadas mediante evaporación al alto vacío, recubrimiento por giro, autoensamblado o lanzando el material en forma de rocío (spray), principalmente. Las películas delgadas de materiales moleculares pueden presentar arreglos cristalinos, aunque también pueden exhibir acomodos amorfos, dependiendo sobre todo de la habilidad de apilamiento de los materiales, así como del proceso de fabricación de la película.

Es posible, mediante un proceso controlado durante la fabricación de la película, llegar a tener una película delgada con estructura altamente ordenada; este control en la estructura de la película se vuelve entonces de gran importancia cuando se tiene un material de interés probado, ya que las principales características opto-electrónicas, como el transporte de portadores de carga, depende altamente del grado de organización molecular [1].

Así entonces, mediante estas técnicas se fabrican películas delgadas de muy alta pureza, o bien con una cantidad mínima de impurezas dependiendo de las propiedades o aplicaciones específicas. A continuación se describe la técnica de deposición física en fase vapor (PVD por sus siglas en inglés) que fue utilizada en este proyecto.

1.3.2. Formación de películas delgadas

Evaporación térmica

La deposición física de fase vapor es un término genérico empleado para un amplio conjunto de técnicas que engloban procesos de crecimiento de películas delgadas o capas, que involucran la deposición de átomos ó moléculas en fase de vapor sobre un sustrato sólido. Generalmente, los procesos de PVD son usados para depositar películas con espesores en el rango de decenas a cientos de nanómetros. Además, estos procesos también pueden ser usados para depositar multicapas. Las técnicas de PVD más usadas se podrían agrupar en muchas categorías, pero es de nuestro interés particular el proceso de evaporación simple mediante una resistencia calefactora. La figura 1.10, muestra un esquema del sistema de evaporación.

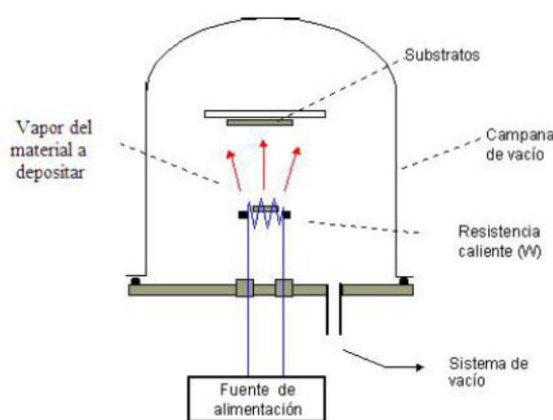


Figura 1.10: Esquema del sistema más común de evaporación térmica [15]

El depósito físico en fase vapor normalmente se hace en vacío, 10^{-5} Torr o valores de vacío superiores, en el cual átomos o moléculas alcanzan un sustrato ubicado a unos cuantos centímetros de la fuente térmica de vaporización. Este proceso es uno de los más simples y más antiguos en lo que

respecta al depósito de películas delgadas. El material que va a recubrir se coloca sobre un soporte, que se calienta por el paso de una corriente eléctrica, como en el caso de una resistencia directa. Dicho proceso se hace normalmente mediante una rampa de calentamiento para poder controlar mejor el depósito.

La figura 1.11 presenta los distintos soportes para calentar el material a evaporar. Posteriormente, la sustancia evaporada se condensa en el sustrato, el cual a su vez puede calentarse o mantenerse a temperatura ambiente.

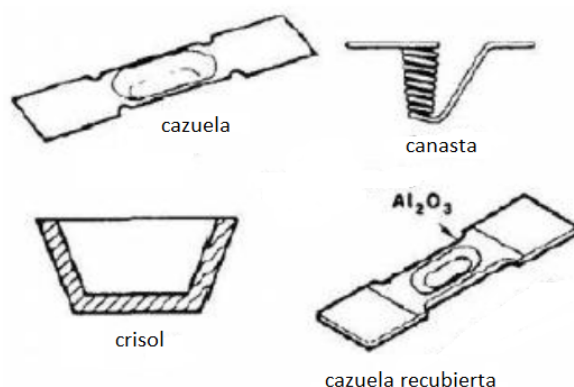


Figura 1.11: Distintos soportes utilizados mediante PVD [15]

En la evaporación en vacío la forma final del depósito está dominado por factores como la nucleación y crecimiento del material sobre el sustrato. El crecimiento de las películas delgadas presenta un mecanismo muy complejo, en el cual suceden una serie de etapas a nivel microscópico que dependen de las etapas previas, y al mismo tiempo, de los parámetros del proceso de deposición como la velocidad de depósito, la presión, la temperatura, la naturaleza del material depositado, etc. El conjunto de todas estas etapas determinan el modo de crecimiento, la morfología y finalmente, las propiedades fisicoquímicas de la capa depositada.

El conocimiento de las variables que afectan la morfología de las películas permite modificar los procesos y obtener películas con propiedades mejoradas. Las etapas de crecimiento presentes en los procesos de depósito físico en fase vapor son: transporte de masa del compuesto a la superficie, adsorción sobre la superficie, difusión superficial, la nucleación, y finalmente, el crecimiento de la

película.

1.4. Aminoácidos

Las proteínas son las biomoléculas más abundantes presentes en todas las células. Se presentan en una gran variedad formas ya que existen miles de diversos tipos de proteínas con diferentes funciones biológicas y tamaños, que van desde péptidos relativamente pequeños hasta enormes polímeros de pesos moleculares muy grandes. Estas proteínas están constituidas por aminoácidos, que se unen en cadena uno a uno por medio de un enlace peptídico. Así entonces, los aminoácidos son considerados los precursores de la vida, ya que son las unidades fundamentales para la construcción de las proteínas, y por ende, son de vital importancia en la mayoría de los procesos de los organismos vivos.

Todas las proteínas conocidas están constituidas por los mismo 20 aminoácidos en muy diversas combinaciones (figura 1.12). De hecho, este grupo de 20 aminoácidos se puede considerar el alfabeto en el que se escribe el lenguaje estructural de una proteína. El primer aminoácido descubierto fue la aspargina en 1806, y el último de los 20 aminoácidos fue la treonina en 1938 [16].

Para entender más sobre las características fisicoquímicas de los aminoácidos se pueden estudiar las cuatro clases principales según las propiedades de sus grupos R, en particular, basándose en su polaridad o tendencia a interactuar con el agua a un pH biológico ($\text{pH} = 7.4$). En la figura 1.12, se muestra esta clasificación nombrando los grupos como: **Apolares, polares neutros, polares aniónicos y polares catiónicos** [16, 11].

1.4.1. Química de los aminoácidos

Con excepción de la glicina, todos los aminoácidos tienen un carbón denominado carbono- α , el cual está unido a cuatro diferentes grupos: un grupo carboxilo, un grupo amino, un átomo de hidrógeno y un grupo R, el cual varía dependiendo del aminoácido (figura 1.13). Son las propie-

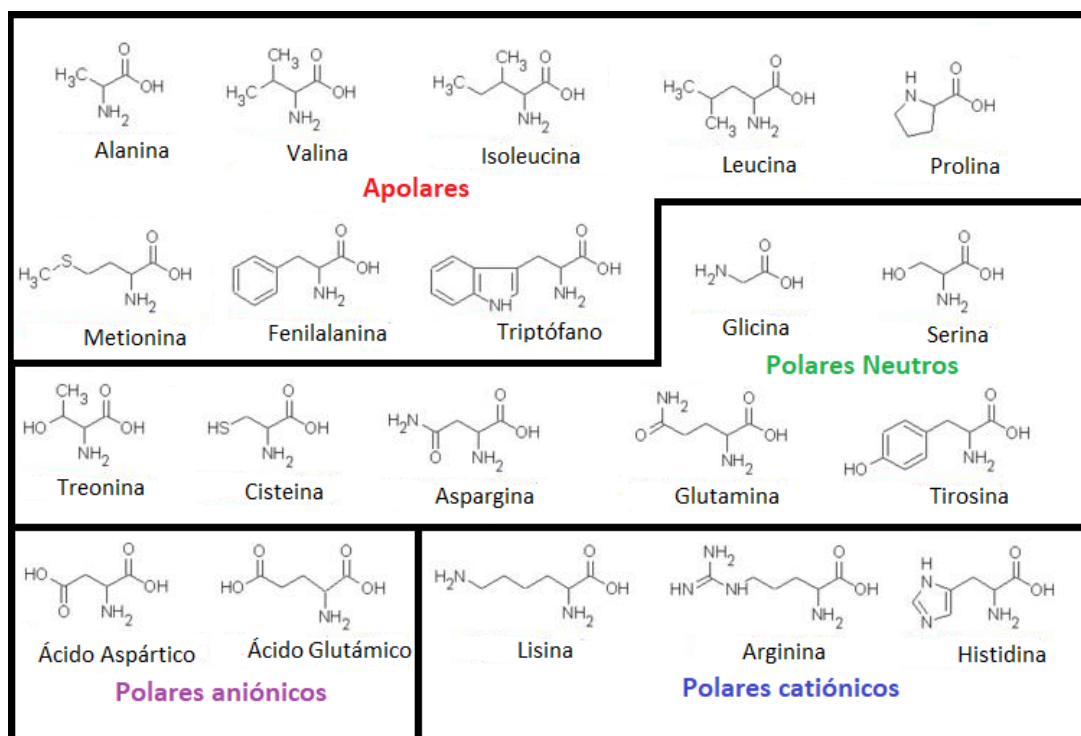


Figura 1.12: Representación de los 20 aminoácidos principales en la formación de proteínas [16, 11]

dades del grupo R, las que provocan las modificaciones en la estructura, tamaño, carga eléctrica y solubilidad de los aminoácidos [11].

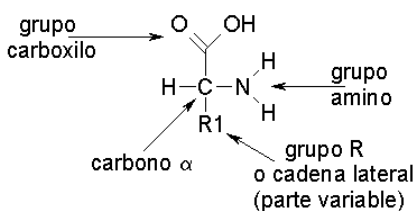


Figura 1.13: Estructura básica de un aminoácido. [11]

El carbono- α es, por lo tanto, un *centro quiral* y debido a la disposición tetraédrica de los orbitales de enlace a su alrededor, los cuatros diferentes grupos pueden ocupar dos disposiciones espaciales únicas y, por lo tanto, los aminoácidos tienen dos estereoisómeros posibles. Dado que son imágenes especulares no superponibles entre sí, las dos formas representan una clase de estereoisómeros llamados enantiómeros. Todas las moléculas con un centro quiral también son ópticamente activas, es decir, rotan la luz polarizada en el plano [16].

Una nomenclatura especial ha sido desarrollada para especificar la configuración absoluta de los cuatro sustituyentes del carbono- α . Esta configuración absoluta de aminoácidos y también de azúcares simples, queda determinada por el sistema D, L (figura 1.14). Históricamente, las designaciones L y D se utilizaron para Levógiro (rotan la luz polarizada hacia la izquierda), y Dextrógiro (rotan la luz polarizada hacia la derecha). Sin embargo, la convención de Fischer propuso que al referirse a D o L sólo se refiera a la configuración absoluta de los sustituyentes, y no a las propiedades ópticas de las moléculas [16].

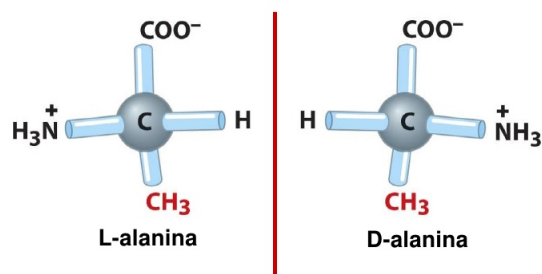


Figura 1.14: Ejemplo de estereoisómeros de alanina [16].

Los aminoácidos que construyen a las proteínas son exclusivamente estereoisómeros L. Sin embargo, se han encontrado aminoácidos D sólo en unos pocos péptidos, generalmente pequeños, que incluyen algunos péptidos de las paredes celulares bacterianas y ciertos antibióticos peptídicos. Esto es notable a pesar de que de manera general los compuestos quirales se forman por reacciones químicas ordinarias, y resultan en una mezcla de ambos enantiómeros que son muy difíciles de distinguir y separar. Se ha encontrado y descrito que las células pueden sintetizar específicamente los isómeros L de los aminoácidos, porque los sitios activos de las enzimas son asimétricos, lo que hace que las reacciones que catalizan sean estereoespecíficas.

Se sabe que un grupo carboxílico se desprotona y existe como el anión carboxilato a un pH fisiológico de 7.4 [17], mientras que un grupo amino se protona y existe como el catión amonio. Por esta razón, los aminoácidos existen en disolución acuosa principalmente en la forma de un ion dipolar, o zwitterion (del alemán *zwitter*, que significa “híbrido”) [18].

Basándose en sus características ácido-base, los aminoácidos comparten muchas de sus propieda-

des, y es por eso, por lo que se permite simplificar o generalizar su comportamiento. Por ejemplo, todos los aminoácidos con un solo grupo α -carboxilo, un α -amino y un grupo R no ionizable tienden a presentar el mismo comportamiento ácido-base. Estos aminoácidos presentan valores de pKa similares, pero no idénticos, que van de 1.8 a 2.4 para el pKa correspondiente al grupo α -carboxilo, y de 8.8 a 11.0 para el grupo α -amino [16]. En la figura 1.15 se muestra el comportamiento de un aminoácido en forma de zwitterion.

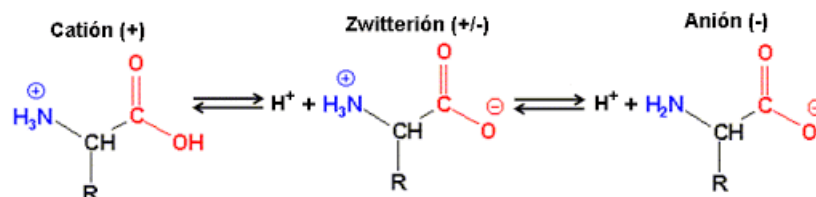


Figura 1.15: Representación de un aminoácido en forma de zwitterion. [11]

Los zwitteriones de los aminoácidos son sales internas, y por tanto, tienen muchas de las propiedades físicas asociadas a las sales. Tienen momentos dipolares grandes, son solubles en agua y son sustancias cristalinas con puntos de fusión relativamente altos. Además, los aminoácidos son *anfóteros*, ya que pueden reaccionar como ácidos o como bases dependiendo del medio. En disolución ácida acuosa, un zwitterion de aminoácido es una base que *acepta* un protón para producir un catión; en disolución básica acuosa, el zwitterion es un ácido que *pierde* un protón para formar un anión. En otras palabras, el carboxilato $-\text{CO}_2^-$, es el que actúa como el sitio básico y acepta un protón en la disolución ácida, mientras que es el catión amonio, $-\text{NH}_3^+$, el que actúa como sitio ácido y dona un protón en la disolución básica [11].

1.4.2. Enfermedades asociadas a los aminoácidos

El análisis de la composición de aminoácidos es importante en varios sectores que van desde la industria alimentaria hasta la salud humana, y es en este último campo, en el que se han descrito varias enfermedades, principalmente, desordenes metabólicos relacionados con la acumulación o disminución de diferentes aminoácidos [19].

Las enfermedades metabólicas se han definido como todas las enfermedades o trastornos que interrumpen el proceso de conversión de alimentos en energía a nivel celular. Miles de enzimas participan en numerosas e interdependientes vías metabólicas. En el caso de las enfermedades metabólicas relacionadas con aminoácidos, estas afectan la habilidad de las células de realizar reacciones bioquímicas críticas que intervienen en el proceso de transporte y conversión a energía de las proteínas, y otras biomoléculas basadas en aminoácidos. Es debido a esta interconexión entre rutas metabólicas, que un error simple en una de ellas puede afectar a numerosos procesos bioquímicos [20].

El primer trastorno metabólico relacionado a los aminoácidos fue descrito en 1909 por Sir Archibald Garrod (llamado alcaptonuria), el cual ocasionó que la orina de algunas personas se volviera negra. El estudio de este trastorno concluyó que el problema era un defecto en el metabolismo de la tirosina con la oxidasa del ácido homogentísico. Este transtorno se consideró una enfermedad ya que en individuos sanos, sólo una muy pequeña cantidad de proteínas de la ingesta se excreta por orina o heces. Cabe señalar que las proteínas no solo sirven como bases estructurales, sino también pueden ser metabolizadas como fuente de energía, generando estructuras carbonadas para la producción de glucosa o sus derivados como glucógeno o ácidos grasos con el objetivo de mantener los niveles plasmáticos de glucosa para una fuente rápida de energía [21]. Para ser utilizados, los aminoácidos necesitan ser transportados del tracto intestinal a la sangre o ser recuperados de la orina en el riñón.

Por lo tanto, mutaciones en las proteínas requeridas para este transporte presentaran una disminución en la actividad que puede causar la disminución en la absorción de los aminoácidos de la dieta y causar su pérdida por orina. En la cistinuria hay un incremento en la excreción de cisteína, ornitina, arginina y lisina en orina, lo que genera cálculos en el riñón. Además, el transporte defectuoso a través de la membrana de los intestinos por la lisina, arginina y ornitina causa intolerancia a la proteína lisinúrica (LPI). Este trastorno, está caracterizado por la intolerancia a la proteína y ocasiona diarrea, aumento de peso, osteoporosis y erupciones cutáneas pudiendo llegar a ocasionar una enfermedad renal y/o pulmonar [20].

Otro ejemplo de enfermedades relacionadas a los aminoácidos es la encefalopatía por glicina (tam-

bién conocida como hiperglicemia no cetónica), que es un desorden asociado a la acumulación de la glicina en el fluido cerebroespinal y otros tejidos corporales. La mayoría de los pacientes afectados lo presentan en el periodo neonatal con convulsiones intratables, tono muscular bajo, retención del aliento, y los sobrevivientes presentan una discapacidad intelectual profunda. Incluso se ha demostrado que alrededor del 15 % lo llegan a presentar hasta la edad adulta, en cuyo caso el desarrollo de la enfermedad es menor. Este trastorno sigue una herencia autosómica recesiva y su diagnóstico es muy poco probable, ya que por lo general, no se realizan estudios de los niveles de glicina en el líquido cefalorraquídeo. Las únicas pruebas de confirmación son pruebas genéticas para al menos tres proteínas que comprenden el complejo enzimático de escisión de la glicina. Es por ello, que se ha propuesto su detección en recién nacidos por medio de la medición de los niveles plasmáticos de glicina. Sin embargo, la sensibilidad aún no está clara, ya que la glicina en plasma puede no estar elevada en este trastorno [21]. También, se ha demostrado que el nivel de d-aminoácidos en el cerebro humano es un indicador de la enfermedad de Alzheimer [19].

La deficiencia de glutamato formiminotransferasa es una enfermedad causada por la disminución de la actividad de esta enzima en la degradación de la L-histidina para formar amoniaco, 5,10-metinetetrahidrofolato y glutamato. Esta enfermedad autosómica recesiva está caracterizada por un retardo físico y mental, concentraciones séricas elevadas de folato, y la presencia de FIGLU (ácido formiminoglutámico) en orina después de la administración de histidina, así como una deficiencia de L-glutamato [22].

Una de las principales enfermedades relacionadas a la L-lisina es la hiperlisinemia que se caracteriza por una elevación de la concentración plasmática de lisina cuyos niveles exceden los 600 $\mu\text{mol/L}$, y pueden alcanzar hasta 2000 $\mu\text{mol/L}$, siendo que en una persona sana los valores de referencia se encuentran en el rango de 111-248 $\mu\text{mol/L}$. Esta enfermedad es autosómica recesiva, y es causada por un defecto en la vía catabólica de la lisina en la producción de acetil-CoA que puede llevar a la generación de complicaciones mayores [23].

Dada la importancia de los aminoácidos en la formación de proteínas y a las diversas funciones que realizan que son indispensables para el correcto funcionamiento del organismo, así como su papel en las enfermedades relacionadas, es necesario contar con elementos que permitan su correcta iden-

tificación y cuantificación. Aunque existen métodos que permiten la identificación y separación de aminoácidos, normalmente son técnicas costosas y complejas. Una manera fácil y económica que se ha usado para identificar diferentes compuestos tanto volátiles como en solución en general, ha sido mediante el uso de películas delgadas como elementos de interacción. En particular, las películas de porfirina ya han sido usadas como sensores químicos y biológicos, y es por ello, que se consideran una buena opción para evaluar su selectividad hacia aminoácidos de diferentes características.

1.4.3. Cuantificación de aminoácidos

El análisis de aminoácidos emplea técnica basada en la cromatografía líquida de intercambio iónico, que pertenece a las técnicas analíticas desarrolladas en la década de 1950 por William Stein y Stanford Moore del instituto Rockefeller, ahora Universidad Rockefeller, en Nueva York. La técnica comienza con la preparación de un péptido, el cual se descompone en los aminoácidos que lo constituyen, reduciendo todos los enlaces disulfuro y aislando los grupos -SH de los residuos de cisteína a través de una reacción S_N2 con ácido yodoacético, e hidrolizando los enlaces amida mediante el calentamiento con HCl 6 M a 110 °C por 24 horas.[11]

Una vez separados, los aminoácidos salen (eluyen) del extremo de la columna cromatográfica mezclados con una disolución de ninhidrina, y experimentan una reacción rápida que produce un color púrpura intenso. El color es detectado por un espectrómetro y se obtiene una gráfica de tiempo de elución contra la absorbancia en el espectrómetro. Debido a que es reproducible el tiempo requerido para que un aminoácido dado eluya de la columna estándar, pueden determinarse las identidades de los aminoácidos en un péptido. La cantidad de cada aminoácido en la muestra se determina midiendo la intensidad del color purpura que resulta de su reacción con ninhidrina.

En la figura 1.16, se muestran un ejemplo de los resultados del análisis de aminoácidos de una mezcla equimolar de 17 α -aminoácidos [11]. Típicamente, el análisis de aminoácidos requiere alrededor de 100 picomoles (2-3 μg) de muestra para una proteína que contiene alrededor de 200 residuos.[11].

Para los propósitos de este trabajo, la reacción colorimétrica será una técnica indispensable pa-

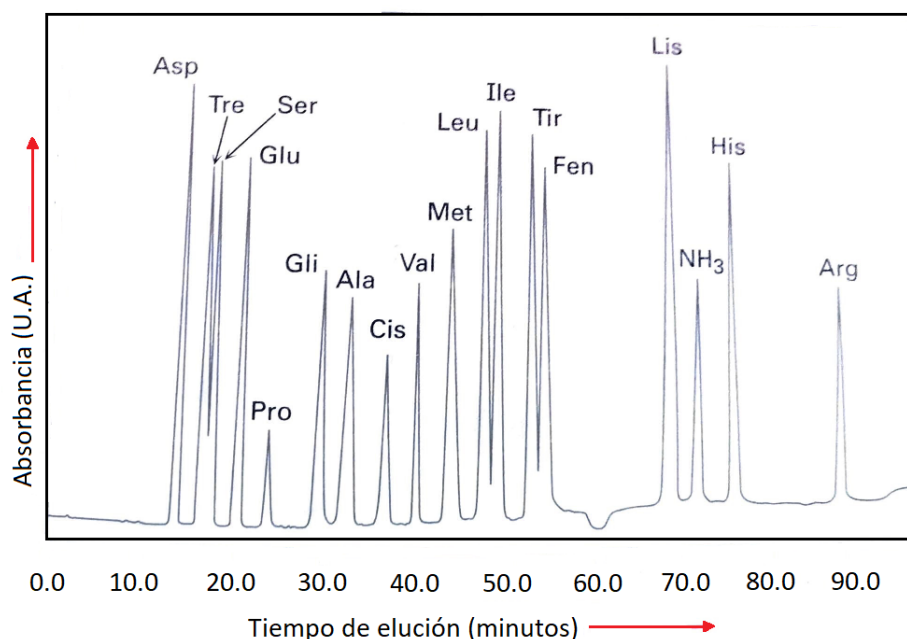


Figura 1.16: Gráfica de tiempo de elución contra absorbancia de 17 α -aminoácidos [11]

ra la cuantificación de aminoácidos, por lo que es necesario comprender la técnica. La reacción colorimétrica entre los aminoácidos y la ninhidrina ha sido ampliamente estudiada en el pasado, y se sabe que esta reacción produce el mismo producto final con todos los aminoácidos, diacetohidrindilideno-dicetohidrindamina (DYDA) o el púrpura de Ruhemann.

Hace casi 70 años, Stanford Moore y William Stein introdujeron la ninhidrina como reactivo químico para el estudio cuantitativo de aminoácidos. La producción del púrpura de Ruhemann por la interacción entre aminoácidos y la ninhidrina se inicia por la deshidratación del aminoácido. Esto, genera una amina terciaria la cual sufre una descarboxilación liberando CO_2 . Luego, esa amina terciaria es rehidratada, por lo que se descompone en hidrantina y un aldehído. Posteriormente, la hidrantina reacciona con otra ninhidrina para lograr finalmente la formación de DYDA o púrpura de Ruhemann. Todos estos pasos están representados en la figura 1.17 [24].

En la literatura, [24] se ha reportado el uso del púrpura de Ruhemann para la cuantificación de los aminoácidos haciendo reaccionar la ninhidrina con una disolución de concentración conocida de aminoácido. Así, utilizando el método descrito en las referencias, la concentración de los aminoácidos a analizar se pueden obtener mediante un estudio UV-Vis.

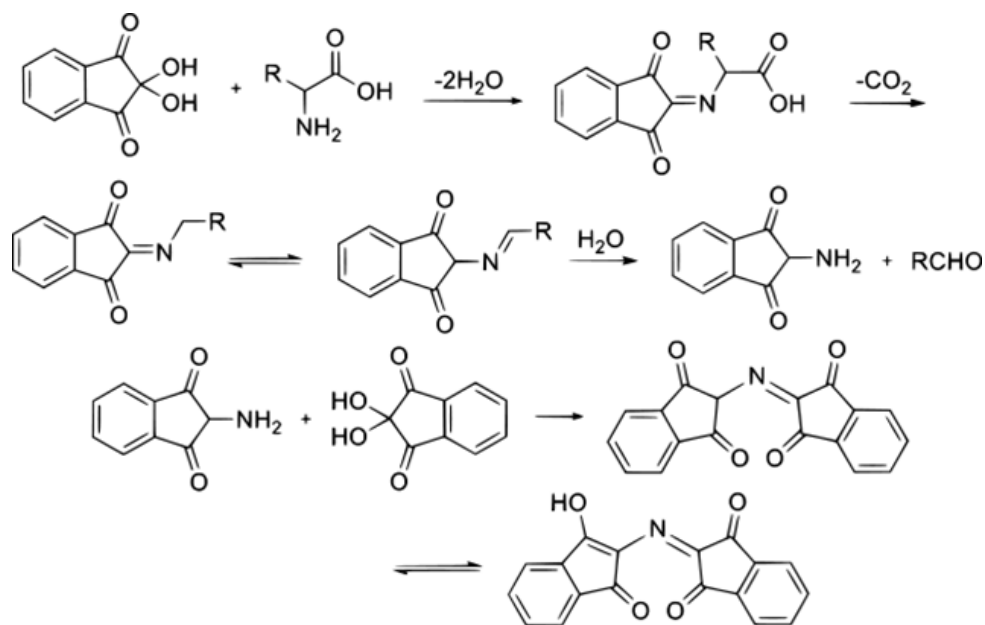


Figura 1.17: Mecanismo de reacción de la ninhidrina con un aminoácido para formar el púrpura de Ruhemann [24].

1.5. Hipótesis

Se observará una mayor interacción entre los aminoácidos y las películas de porfirina que posean un centro metálico coordinado.

1.6. Objetivos

Objetivo General

Estudiar la interacción de diferentes aminoácidos con películas fabricadas con tetrafenilporfirinas con y sin centro metálico.

Objetivos particulares

- Fabricar películas de tetrafenil porfirina sin metal y con centros metálicos de cobre y zinc usando la técnica de evaporación física

- Caracterizar las propiedades morfológicas, ópticas e hidrofóbicas de cada película inicial
- Identificar la afinidad entre películas de porfirinas sin metal y con metal con diferentes tipos de aminoácidos
- Confirmar si existe un cambio en la morfología de las películas debido al procesos de adsorción
- Detectar cambios en los espectros UV-Vis de las películas de porfirinas después de ser expuestas a aminoácidos
- Cuantificar la cantidad de aminoácido que se adsorbe en las películas formadas
- Emplear modelos y cinéticas de adsorción para conocer el tipo de interacción entre cada sistema
- Determinar el sitio de interacción preferencial entre las porfirinas y los aminoácidos usando técnicas de DFT
- Con los resultados obtenidos, concluir si existe algún tipo de selectividad entre las películas y los aminoácidos de acuerdo a su cadena lateral

Capítulo 2

Antecedentes

2.1. Porphirina soluble

En años recientes, se han hecho investigaciones en donde se ha logrado el desarrollo de una gran variedad de moléculas funcionalizadas que poseen propiedades fisicoquímicas bien definidas, capaces de comportarse como sensores químicos y biológicos. Estas nuevas moléculas tendrían la capacidad de alterar su estructura y/o propiedades, dando lugar a parámetros medibles, reproducibles y en algunos casos reversibles en respuesta a un apropiado estímulo externo.

En el campo biomédico, ha sido necesario realizar investigación específica para el desarrollo de moléculas solubles en agua capaces de realizar un reconocimiento selectivo de analitos para el diagnóstico bioquímico de anomalías, o para el desarrollo de nuevas técnicas farmacológicas. En este ámbito, debido a su papel vital desempeñado en procesos biológicos, las porfirinas metálicas parecen ser candidatas ideales. Lamentablemente, la estructura característica de las porfirinas las ubica en compuestos que no son solubles en agua, haciendo que su interacción con otras moléculas en un ambiente biológico sea prácticamente imposible. Como consecuencia, recientemente se han sintetizado moléculas de porfirina solubles en medios acuosos que tienen la capacidad de ser receptores moleculares de aminoácidos, polipéptidos, o ADN (ya que los derivados metálicos de porfirina pueden proporcionar sitios de reconocimiento a través del ion metálico y / o grupos funcionales activos en posiciones periféricas), etc [25].

En algunos estudios, la insolubilidad de la porfirina en agua ha sido superada por la introduc-

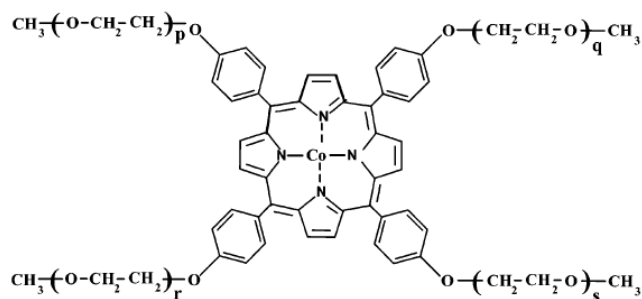


Figura 2.1: Estructura química de una porfirina soluble con centro de cobalto(II). [25]

ción de grupos iónicos (sales de piridinio, carboxilato, unidades de sulfonato, etc.) en posiciones periféricas de la molécula. Sin embargo, la presencia de las cargas libres parece no modificar las propiedades de ligando de la porfirina, aunque en algunos casos (como ejemplo, el cruce a través de membranas celulares), la posibilidad de efectos indeseables debido a la presencia de las cargas no puede ser excluido. Para minimizar estos efectos, se han diseñado, sintetizado y caracterizado nuevos derivados de porfirina, (y sus complejos metálicos) en los que la presencia de unidades sin carga y biocompatibles de poli-(etilenglicol) hidrofílico, unidas a las posiciones meso de la porfirina, les da la capacidad no solo de ser solubles, sino también, capaces de interactuar con elementos biológicos. La estructura de una metaloporfirina soluble en agua se muestra en la figura 2.1 [25].

2.1.1. Espectro UV-Vis en presencia de aminoácidos

Angelini (et. al.) [25], reportaron la modificación de las propiedades espectroscópicas empleando técnicas de resonancia magnética nuclear, absorción UV-visible y dicroísmo circular de la molécula 5,10,15,20-tetraquis simétrica ρ - [ω -metoxí-poli(oxietileno)]-fenil porfirina de cobalto (II) (Co-P) interaccionando con *R-L*-aminoácidos alifáticos y aromáticos en soluciones acuosas. En particular, dado que el Co-P es un producto aquiral, la aparición de señales en correspondencia en la región de la banda de Soret, constituyen evidencia directa de las interacciones entre la Co-P y los aminoácidos aromáticos para formar complejos quirales.

En la figura 2.2, se pueden observar los cambios que sufre el espectro de la Co-P tanto solo, como después de ser expuesto a diferentes aminoácidos.

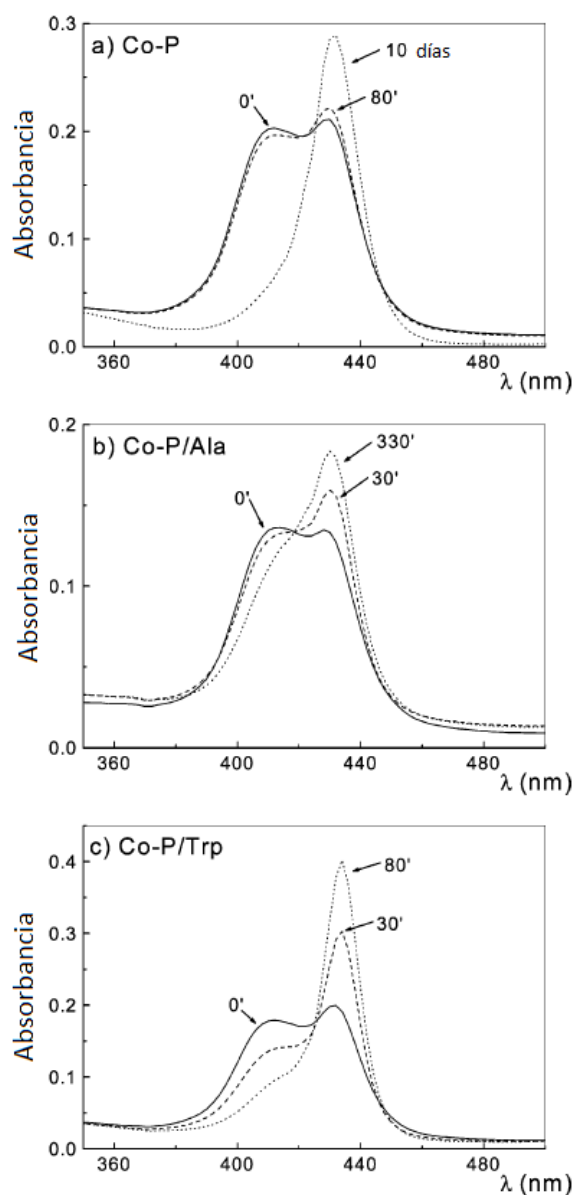


Figura 2.2: Cambios en la zona de la banda de Soret de los espectros de Co-P al ser expuesto a diferentes aminoácidos [25]

Por ejemplo, en la figura 2.2 a), la porfirina no se expone a ningún aminoácido, y sin embargo, se reporta un desdoblamiento en la banda de Soret de la porfirina que logra su estabilidad después de 10 días. En la figura 2.2 b) se observa el espectro de la Co-P en contacto con alanina en donde el desdoblamiento de la banda de Soret también es observado, pero en este caso, se llega a la estabilidad en 330 minutos. Por último en la figura 2.2 c), la Co-P ahora expuesta a triptofano muestra un espectro en donde el desdoblamiento de la banda de Soret logra su estabilidad en tan sólo 80 minutos [25].

Con esos resultados se evidencian dos cosas: al tener ligantes largos, la porfirina sufre un desdoblamiento en la banda de Soret que al estar en disolución acuosa, se logra estabilizar aunque le toma bastante tiempo; el otro resultados interesantes es que en presencia de aminoácidos, el desdoblamiento que sufre la banda de Soret se estabiliza en tiempos menores. Sin embargo, esa cantidad de tiempo se ve afectada

por el tipo de aminoácido con el que la Co-P tiene contacto. Con toda esta información, es posible que la interacción de los aminoácidos con la porfirina sea en el anillo central, por eso se estabiliza la banda de Soret en un tiempo menor.

2.2. Sitios de interacción entre porfirinas y aminoácidos

El reconocimiento molecular de aminoácidos y sus derivados es un tema importante ya que por ejemplo, puede servir para entender el mecanismo de transferencia del aminoacil ARN sintasa para reconocer un aminoácido específico y estudiar varios tipos de modos de interacción en la química molecular. En las últimas décadas, algunos de los estudios han sido enfocado en metaloporfirinas que actúan como aceptores de aminoácidos, ya que la metaloporfirina puede proporcionar varios sitios de reconocimiento múltiple a través de su ion metálico central y/o en los grupos funcionales de las cuatro posiciones *meso* y ocho posiciones β de pirrol.

Peng et. al. (2000) [26], investigaron un sistema de reconocimiento de aminoácidos, en el que la molécula *anfitrión* era un tetrafenilporfirinato de Zinc (II) con un grupo carboxilo en uno de los cuatro fenilos en el anillo de la porfirina, mientras que la molécula *huésped* era un etil-ester-aminoácido.

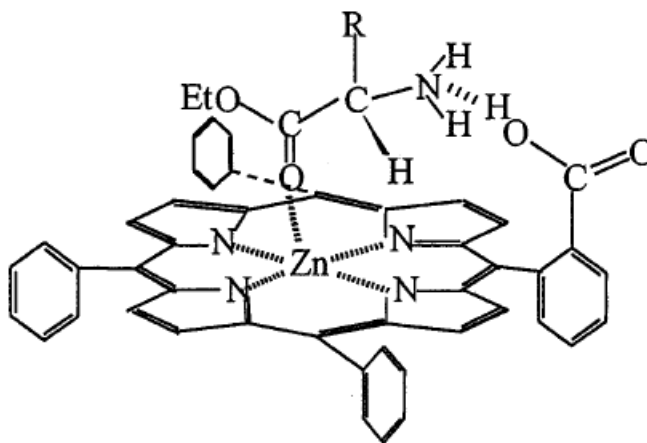


Figura 2.3: Representación de la interacción entre el tetrafenilporfirinato de Zinc (II) y un etil-ester-aminoácido [26].

Utilizando estudios de H-RMN, Peng et. al. [26], encontraron que la unión entre el huésped y el anfitrión era un enlace de coordinación del grupo carbonilo del huésped en el átomo de Zn del anfitrión, y un enlace tipo puente de hidrógeno entre el grupo amino del huésped y el grupo carboxilo del anfitrión. Este es un nuevo tipo de modo de enlace que no se había observado para sistemas de reconocimiento previos. Lo anterior, pudo haber sido causado por una afinidad especialmente fuerte entre el hidroxilo en el grupo carboxilo del anfitrión con el nitrógeno del grupo amino del

huésped, como se muestra en la figura 2.3. Además, parece que los sustituyentes de la porfirina tienen un efecto importante sobre la unión de los ésteres de aminoácidos al tetrafenilporfirinato de Zinc (II) [26].

2.3. Interacción aminoácido - porfirinas inmovilizadas

Hasta la fecha, no se encuentran reportados en la literatura estudios centrados en la interacción de aminoácidos con películas puras de porfirinas. Sin embargo, Awawdeh et. al. (2003) [27], utilizaron una meso-tetra-(4-sulfonatofenilo)-porfirina (TPPS) (figura 2.4), la cual fue inmovilizada en una membrana porosa para formar una especie de recubrimiento a manera de agente sensible y selectivo para diferentes L-aminoácidos a pH 7 [27].

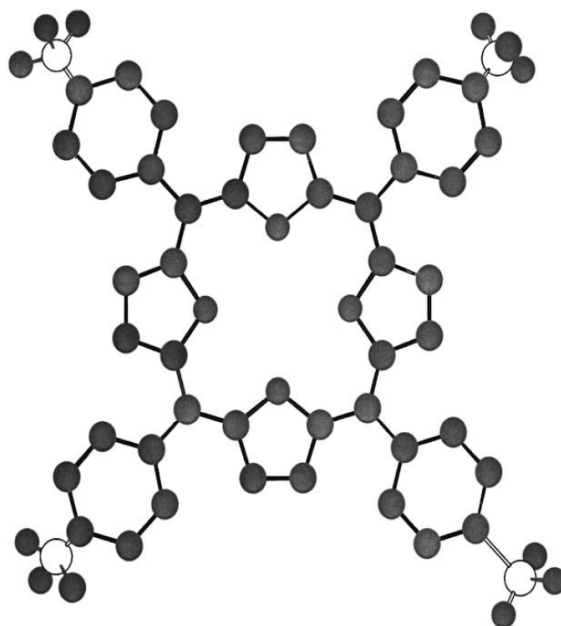


Figura 2.4: Representación de la molécula de meso-tetra-(4-sulfonatofenilo porfirina) [27]

Los L-aminoácidos que se usaron en el trabajo de Awawdeh et. al. [27], fueron seleccionados no sólo por ser aminoácidos esenciales, sino también, por poseer características especiales dadas por su cadena lateral. Por ejemplo, la cadena lateral de la arginina es catiónica, la glicina es de tipo no polar, la histidina también es catiónica, y por último, la serina es polar.

2.3.1. Modificaciones en las bandas de Soret

Awawdeh et. al. [27] hicieron mediciones espectrofotométricas a la porfirina fijada en la membrana y posteriormente la expusieron a diferentes aminoácidos. Acto seguido, repitieron las mediciones espectrofotométricas para identificar diferencias entre el antes y después de la exposición, reportando cambios en el espectro de absorción. Ellos hicieron un tratamiento en donde tomaron el espectro que se tuvo después de la exposición al aminoácido, y lo restaron al espectro original. A la diferencia entre ambas señales, le sacaron la segunda derivada que les dio como resultado un pico y un valle. El pico correspondió a la banda de Soret del espectro original, y el valle, es la banda de Soret en presencia del aminoácido. Esto queda más claro en la siguiente figura 2.5

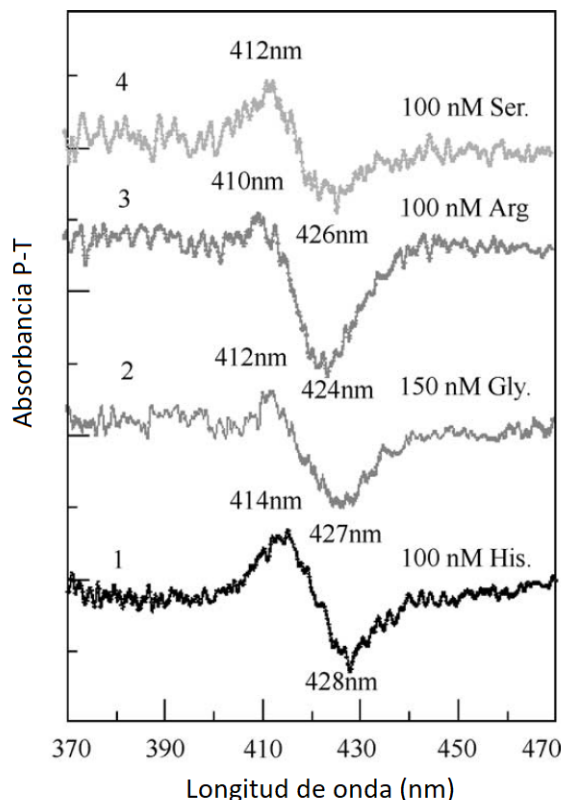


Figura 2.5: Diferentes espectros de la interacción entre TPPS y varios aminoácidos a pH 7 [27]

Los cambios que los autores reportan, son modificaciones en la banda de Soret de la porfirina, principalmente, a manera de corrimientos hipsocrómicos como se observa en la tabla mostrada en la figura 2.6.

Adicionalmente, Awawdeh et. al. [27] concluyen que los corrimiento hipsocrómicos como resultado

Aminoácido	Posición del pico (nm)	Corrimiento del pico (nm)	Limite de detección (nM)
Arginina	410 ^a , 415 ^a	422	30
Glicina	412	427	30
Histidina	414	427	20
Serina	412	421 ^a , 427 ^a	60

a, Designa un pico o señal dividida

Figura 2.6: Tabla de picos y valles para diferentes aminoácidos

de la interacción de los aminoácidos con la molécula TPPS se dan en función del tipo de interacción entre la porfirina y el aminoácido en cuestión. Dicha interacción, esta dada por el grupo funcional activo de los aminoácidos. Esto hace posible distinguir cualitativamente cuatro aminoácidos diferentes a un nivel nanomolar. Además, el resultado sugiere que es factible cuantificar diversos aminoácidos en líquidos usando esta metodología.

A pesar de los promisorios resultados de Awawdeh et. al. [27] en relación a poder emplear las porfirinas en estado sólido para diferenciar distintos aminoácidos, a la fecha, no se encontraron trabajos que hayan seguido esta línea de investigación, por lo que en este trabajo se van a investigar estas interacciones.

Capítulo 3

Metodología

3.1. Compuestos utilizados

Las porfirinas utilizadas en este trabajo fueron 5, 10, 15, 20-tetrafenil-porfirina (H_2TPP), STREAM CHEMICALS S/L, la 5, 10, 15, 20-tetrafenil-Zn-porfirina (ZnTPP). TCl Lot.S70-FC-MO y la 5, 10, 15, 20-tetrafenil-Cu-porfirina (CuTPP) Aldric Chemistry Lot.No. MKBR6622V. Los aminoácidos L-Glicina Lot.No. MKBV5513V, L-Serina Lot.No. SLBR7980V, L-Arginina Lot.No. MKBX9645V, L-lisina Lot.No. BCBW8728 y ácido mono sódico L-Glutámico Lot.No. SLBS2424V fueron obtenidos en Sigma-Aldrich. Para la identificación de los aminoácidos en las disoluciones residuales se ocupó Ninhidrina Lot.No. BCBT4744. Todos los compuestos empleados fueron de grado analítico y se usaron como fueron recibidos.

3.2. Selección de aminoácidos

La selección de los aminoácidos utilizados en este proyecto esta basada en lo reportado por Awawdeh et. al. [27], en referencia a que se eligieron con base en las características fisicoquímicas de su grupo R o cadena variable. Es por eso, que se escogió la arginina que tiene carga (+), la glicina que es “no polar”, el glutamato que tiene carga (−), la lisina tiene carga (+) pero posee una cadena lateral más larga, y finalmente, la serina que es “polar”.

3.2.1. Preparación de disoluciones

Para asegurar que hubiera la mayor interacción posible por parte de los aminoácidos con las películas de porfirinas, se utilizó un buffer de fosfatos a $\text{pH} = 7.0$. De acuerdo a reportes en la literatura se sugieren este valor como el idóneo para la interacción [17]. La preparación de esta solución se describe a continuación:

Se utilizó ácido fosfórico (H_3PO_4) y fosfato trisódico (Na_3PO_4) para preparar una solución a $\text{pH} 7$, sabiendo que el valor de pk_a para el par ácido-base utilizado es de 7.4, y que la concentración final de la disolución a preparar era de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ en un volumen total de 3 L. Se utilizó la ecuación de Hendersson Hasselbach para llevar a cabo este procedimiento.

$$\text{pH} = \text{pk}_a + \log \left(\frac{[\text{base}]}{[\text{ácido}]} \right) \quad (3.1)$$

Sustituyendo el valor del pH que buscamos y del pk_a que ya sabemos, se tiene:

$$7.00 = 7.40 + \log \left(\frac{[\text{base}]}{[\text{ácido}]} \right) \quad (3.2)$$

De la ecuación anterior y despejando los valores numéricos, se tiene:

$$7.00 - 7.40 = \log \left(\frac{[\text{base}]}{[\text{ácido}]} \right) \quad (3.3)$$

$$-0.40 = \log \left(\frac{[\text{base}]}{[\text{ácido}]} \right) \quad (3.4)$$

Ahora, a la ecuación anterior se le aplica un antilogaritmo para obtener:

$$10^{-0.40} = \left(\frac{[ácido]}{[base]} \right) \quad (3.5)$$

Despejando el valor del ácido se tiene:

$$[ácido] = 10^{-0.4} [base] \quad (3.6)$$

Con esta ecuación, se pudo obtener la concentración de la base, ya que se buscaba que la concentración final del buffer fuera de 5×10^{-3}

$$5 \times 10^{-3} = [ácido][base] \quad (3.7)$$

Por lo tanto:

$$5 \times 10^{-3} = 10^{-0.4} [base] + [base] \quad (3.8)$$

$$[base] = \frac{5 \times 10^{-3}}{1 + 10^{-0.4}} = 1.42 \times 10^{-3} \frac{mol}{L} \quad (3.9)$$

Mientras que para el ácido se tiene:

$$[ácido] = \frac{5 \times 10^{-3}}{1 + 10^{-0.4}} * 0.005 = 3.57 \times 10^{-3} \frac{mol}{L} \quad (3.10)$$

Como se prepararon 3 L de la disolución buffer, y teniendo en cuenta los valores de pureza de los reactivos, para el ácido fosfórico (H_3PO_4) se tiene:

$$[H_3PO_4] = 3.57 \times 10^{-3} \frac{mol}{L} \left| \frac{3 L}{1} \right| \left| \frac{48 g}{mol} \right| \left| \frac{1 mL}{1.68 g} \right| \left| \frac{85}{100} \right| = 0.528 mL \quad (3.11)$$

Por otro lado, para el fosfato trisódico (Na_3PO_4) se tiene:

$$[Na_3PO_4] = 1.42 \times 10^{-3} \frac{mol}{L} \left| \frac{3 L}{1} \right| \left| \frac{163.94 g}{mol} \right| \left| \frac{96}{100} \right| = 0.660 g \quad (3.12)$$

Una vez preparado el buffer de fosfatos con esta disolución, se prepararon 100 mL de disolución a 4000 ppm de aminoácido para poder asegurar que la disolución preparada a la concentración requerida, garantizará la repetibilidad y reproducibilidad del experimento.

$$4000 \frac{mg}{L} \left| 0.1 L \right| = 400 mg = 0.4 g \quad (3.13)$$

Para todos los aminoácidos se utilizaron 0.4 g para preparar las disoluciones concentradas. A partir de estas disoluciones se tomaron alícuotas para preparar 20 mL de disolución con una concentración de 1000 ppm de aminoácido, siendo esta la concentración usada en las disoluciones con las que se pusieron en contacto las películas de porfirinas.

$$aminoácido = \frac{20 mL * 1000 ppm}{4000 ppm} = 5 mL \quad (3.14)$$

Por lo tanto, para preparar las disoluciones de 20 mL a 1000 ppm de aminoácido, se utilizaron 5 mL de la disolución concentrada de los aminoácidos utilizando como disolvente el buffer de fosfato.

La disolución de ninhidrina que se ocupó para cuantificar los aminoácidos remanentes se preparó utilizando el buffer de fosfato. Aquí, se definió que la concentración más alta fuera de 0.013 M para la glicina. Con esta información, se adecuó la concentración máxima de ninhidrina para obtener la curva de calibración correspondiente.

$$0.1 \frac{\text{mol}}{L} |0.2 L| = 0.02 \text{ mol de ninhidrina} \quad (3.15)$$

$$0.02 \text{ mol} \times 178.14 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 3.56 \text{ g de ninhidrina} \quad (3.16)$$

Para preparar 200 mL de la disolución a 0.1 M de ninhidrina, se ocuparon 3.56 g de ninhidrina, y para determinar la cantidad de aminoácido remanente, se calculó el volumen de la alicuota que se ocuparía:

$$\text{Vol alicuota} = \frac{0.013 \text{ mol/L} * 25 \text{ mL}}{0.1 \text{ mol/L}} = 3.25 \text{ mL} \quad (3.17)$$

El mismo procedimiento se realizó para los demás aminoácidos.

3.3. Preparación de sustratos

Los sustratos utilizados en este proyecto fueron vidrio y discos de cuarzo para emplear la microbalanza, los cuales fueron previamente tratados (limpiados) para depositar las películas de porfirinas.

3.3.1. Vidrio

El vidrio debía de estar libre de polvo y residuos orgánicos con el fin de evitar defectos en las películas que pudieran interferir con las mediciones morfológicas y ópticas. Es por eso, que el lavado de estos sustratos fue agresivo. Para ello, se utilizó una disolución “piraña”, la cual es una mezcla de ácido sulfúrico (H_2SO_4) con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [28].

Procedimiento:

1. Medir en proporción de 3:1 el H_2SO_4 y el H_2O_2 , respectivamente.
2. Una vez medidos los reactivos, se agrega lentamente el ácido al peróxido y se mezcla lentamente.
3. La disolución “piraña fue agregada lentamente a los sustratos previamente acomodados en el fondo de un recipiente de vidrio, procurando que fueran cubiertos completamente por la disolución, la cual se mantuvo a $\approx 70^\circ\text{C}$.
4. Al terminar el calentamiento, se retiraron los sustratos de la disolución y se enjuagaron con agua de tipo *milli-Q*. Posteriormente, se colocaron en otro recipiente de vidrio limpio, en baño sónico por 5 minutos. Finalmente, los sustratos se secaron con aire comprimido y se guardaron hasta su uso.

3.3.2. Discos de cuarzo

Los discos de cuarzo tienen una película delgada de Cr/Au la cual es muy delicada, por lo que la limpieza de estos sustrato se realizó con un método menos agresivo, siendo:

1. Usar detergente diluido en agua *milli-Q* para cubrir el cuarzo, en baño sónico por 10 minutos.
2. Se retiró el detergente y se enjuago con agua *milli-Q* en baño sónico por 10 minutos.
3. Se intercambio el agua, por acetona y se dejo en baño sónico por 10 minutos.
4. Se cambió la acetona por isopropanol repitiendo el baño sónico por otros 10 minutos. Finalmente, se secaron los cuarzoes con aire comprimido.

3.4. Formación de películas vía evaporación térmica

Para el depósito físico en fase vapor se utilizó una evaporadora térmica NORM Vacuum modelo VCM 600 (figura 3.1), y sustratos de vidrio y cuarzo previamente lavados.

Los sustratos fueron colocados en la cámara de vacío junto con la porfirina a evaporar, y el proceso de depósito se llevó a cabo a una presión del orden de 10^{-5} mbar a temperatura ambiente. Cabe



Figura 3.1: Evaporadora física en fase vapor

señalar que todas las evaporaciones se realizaron con las mismas condiciones experimentales. Una vez fabricadas las películas, se guardaron hasta el momento de su caracterización.

3.5. Caracterización de las películas

Las películas interaccionaron con las disoluciones preparadas en un buffer de fosfato a $\text{pH} = 7$, con 1000 ppm de aminoácido (figura 3.2) durante dos horas. Luego, se retiraron, se secaron con aire comprimido y fueron caracterizadas utilizando diversas técnicas para conocer los cambios físico y químicos de las películas que permitieran identificar diferencias por el contacto con el aminoácido.

3.5.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La caracterización por microscopia electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) se llevó a cabo con un microscopio electrónico de barrido de ultra-alta resolución (JEOL JSM-7800F, figura 3.3 a)). Para obtener las imágenes de las superficies de las muestras, se utilizaron electrones secundarios a voltajes menores de 5 kV y distancias de trabajo menores de ~ 10 mm. En la figura 3.3 b), se muestra el montaje de las películas al momento del estudio.



Figura 3.2: Películas de porfirina sumergidas en una disolución de aminoácido

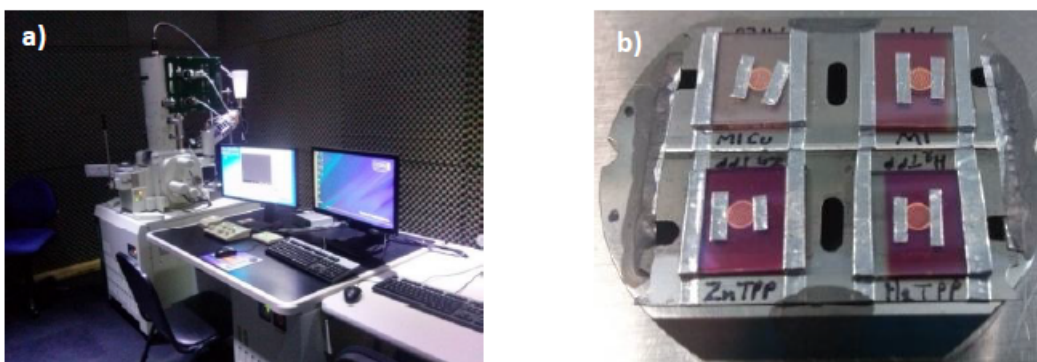


Figura 3.3: a) Microscopio electrónico de barrido de ultra-alta resolución (JEOL JSM-7800F), b) películas preparadas para ser analizadas por SEM

3.5.2. Microscopia de Fuerza atómica (AFM)

La caracterización de las películas por microscopia de fuerza atómica se llevó a cabo con un microscopio JEOL JSPM 4210 (figura 3.4). Para este estudio, se empleó el modo intermitente o “tapping” debido a la naturaleza orgánica (suave) de las películas. Se realizaron barridos de $20\ \mu\text{m}$ por lado sobre la superficie de las películas para conocer su morfología y rugosidad.



Figura 3.4: Microscopio de fuera atómica JEOL JSPM 4210

3.5.3. Espectros UV-Vis de las películas de porfirina

La caracterización por UV-Vis se hizo con un equipo de doble rayo CT-8600 spectrophotometer de E-Chrom Tech Co., Ltd., con un rango entre los 300 y 900 nm. Se tomaron mediciones de las películas antes y después de tener contacto con las disoluciones de los aminoácidos, para identificar posibles cambios en los espectros de absorción debido a la presencia de los aminoácidos en las películas.



Figura 3.5: Espectrofotometro de doble rayo CT-8600 spectrophotometer de E-Chrom Tech Co., Ltd.

3.6. Cuantificación de aminoácidos

3.6.1. Curvas de calibración

Para cuantificar los aminoácidos residuales, se tuvieron que determinar primero curvas de calibración para cada uno de ellos con el espectrofotómetro. Se hicieron disoluciones a $\text{pH} = 7$ de concentración conocida de aminoácido en un rango de 30 a 100 ppm. A estas disoluciones se les agrego ninhidrina para formar el purpura de Ruhemann. Una vez que hubo coloración, se hicieron mediciones espectrofotométricas para obtener los diferentes valores de absorbancia asociados a cada valor de concentración conocida (figura 3.6).

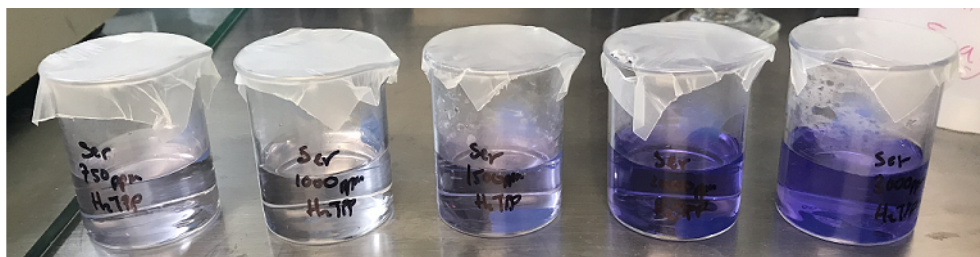


Figura 3.6: Diferentes gradas de coloración para hacer una curva de coloración de la serina a diferentes concentraciones

Una vez obtenidos todos los espectros de las disoluciones a diferente concentración para cada aminoácido, se empleó el valor de la absorbancia a 570 nm de acuerdo con varias referencias bibliográficas, para hacer un ajuste de mínimos cuadrados, y así, obtener una ecuación lineal que describa el comportamiento de la concentración en función de la absorbancia [29, 24].

3.6.2. Cuantificación de aminoácido residual y adsorbido

Después de la interacción de las películas de porfirina con las disoluciones de aminoácidos a $\text{pH} = 7$, a las disoluciones remanentes, se les agrego una alícuota de 3.25 mL de la disolución de ninhidrina de concentración 0.1 M aforando con buffer de fosfatos hasta 25 mL. Después de que se llevó a cabo la reacción entre ambos reactivos, se tomó una alícuota de 0.5 mL aforados a un volumen de 5 mL (figura 3.7). Por último, a la disolución diluida, la cual ya contiene el púrpura de Ruhemann, se le hicieron mediciones con el equipo UV-Vis para obtener el espectro de absorción. Una vez obtenido el espectro, se utilizó la curva de calibración para determinar la concentración del aminoácido en

la disolución residual.



Figura 3.7: Última dilución de la muestra de púrpura de Ruhemann para ser analizadas en el espectrofotómetro

Una vez que se determinó la concentración del aminoácido en la disolución residual, usando una diferencia, se pudo conocer la cantidad de aminoácido que fue adsorbido por la película.

3.7. Isotermas de adsorción de aminoácido en películas

Una vez que se determinó la concentración de aminoácido que las películas son capaces de adsorber, se decidió hacer un estudio de isotermas de adsorción. Para ello, las películas de porfirinas fueron sumergidas en disoluciones a pH 7 de diferentes concentraciones de aminoácidos (750, 1000, 1500, 2000 y 3000 ppm) durante dos horas. Para este estudio, los aminoácidos utilizados fueron aquellos que mostraron una mayor y menor afinidad a las películas de porfirinas. En el caso de la CuTPP, se sumergió en arginina y serina, mientras que para la H₂TPP y ZnTPP fueron la lisina y serina, respectivamente.

Se utilizó la metodología ya descrita para conocer la concentración del aminoácido residual y adsorbido. Con los datos de la concentración de aminoácido adsorbido en las películas, se determinó el modelo de adsorción que mejor describía la interacción entre la película y el aminoácido. Los modelos comparados fueron la isoterma de Langmuir, que describe una adsorción en monocapa, y el modelo de Freundlich, el cual describe una adsorción en multicapas. [30]

3.8. Cinética de adsorción de aminoácidos en películas

Seguendo con los estudios de adsorción, también se realizaron cinéticas de adsorción. Para ello, las películas de porfirinas fueron sumergidas a diferentes tiempos (30 min, 1, 2, 3 y 4 h) a $\text{pH} = 7$ y 1000 ppm, en soluciones con los aminoácidos que mostraron una mayor y menor afinidad a las películas de porfirinas, como ya se explico en el experimento de las isothermas de adsorción.

Utilizando la metodología ya descrita para conocer la concentración del aminoácido residual y adsorbido, se usaron los datos del aminoácido más y menos adsorbido en las películas para determinar las cinéticas correspondientes. Se emplearon los modelos de pseudo-primer orden (que indicaría que la adsorción se da vía fisisorción) y pseudo-segundo orden (que mostraría que la adsorción se da a través de una quimisorción) en todos los casos [30].

3.9. Microbalanza de cuarzo

Para conocer no solo la cantidad en masa de aminoácido que puede adsorber la película de porfirina, sino también la velocidad y comportamiento del proceso de adsorción, se utilizó una microbalanza SRS Inc. figura 3.8). Para este estudio, se colocó 1 mL de disolución de aminoácido a 1000 ppm sobre un disco de cuarzo (al que previamente se le evaporo una película de porfirina), para seguir los cambios en masa durante dos horas.

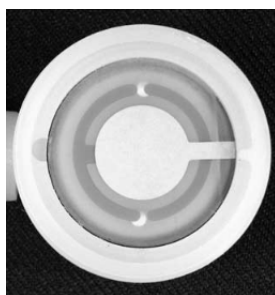


Figura 3.8: Disco de cuarzo en la microbalanza

3.10. Ángulo de contacto

Las mediciones del ángulo de contacto dependientes del tiempo se realizaron para todas las disoluciones de aminoácidos con un goniómetro comercial, en condiciones ambientales. En este estudio, se siguió el cambio en la forma de la gota de disolución de aminoácido durante 60 s (figura 3.9), para investigar la afinidad y el fenómeno cinético de mojado en la superficie.

Los volúmenes de las gotas fueron iguales en todos los casos.

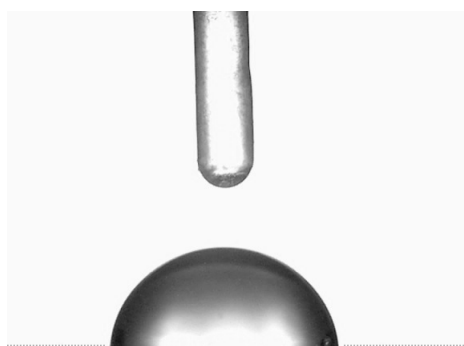


Figura 3.9: Fotografía de una gota de agua al entrar en contacto con una película de porfirina

La respuesta de la adsorción como función del ángulo de contacto fue graficada con respecto al tiempo en todos los casos, y la forma de la curva fue ajustada empleando diferentes modelos matemáticos de acuerdo al tipo de forma obtenida para conocer los parámetros cinéticos de adsorción.

3.11. Cálculos empleando la teoría de funcionales de la densidad (DFT)

Finalmente, para comprender los resultados experimentales, se usó la teoría de funcionales de la densidad (DFT) empleando el programa Gaussian en la supercomputadora Miztli de la UNAM. Como ello, inicialmente, se investigaron las geometrías optimizadas para cada molécula de porfirina (Cu, H₂, y Zn) y aminoácido de manera independiente. También, se investigaron las interacciones entre las porfirinas y los aminoácido de mayor y menor adsorción, para determinar la energía de enlace y los sitios de adsorción preferenciales.

En todos los casos, se comenzó con diferentes configuraciones iniciales y se analizaron las que obtuvieron la energía más baja. Para estos estudios, las simulaciones se realizaron en agua para emular las condiciones experimentales, ya que la interacción principal entre ambos sistemas se dio en presencia del buffer. Para todos los cálculos, se empleó la base *DFT B3LYP/6-31g(d)*, ya que se ha observado que este funcional exhibe buenos resultados para este tipo de moléculas de acuerdo con datos experimentales [31].

Capítulo 4

Resultados y Discusión

4.1. Caracterización de las películas

Después de obtener las películas vía depósito por evaporación física, se realizó una comparación visual para determinar que las películas fueran uniformes y con la menor cantidad de defectos posibles.

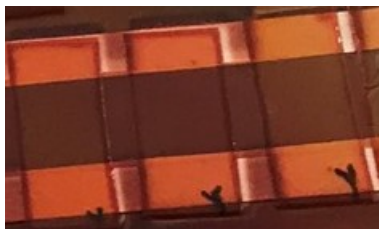


Figura 4.1: Películas obtenidas mediante evaporación física

En la figura 4.1, se observa que las películas obtenidas de evaporación física son homogéneas, ya que poseen un color uniforme. Además, no presentan agregados macroscópicos por lo que tuvieron características idóneas para su uso posterior como elementos de detección.

4.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Debido al soporte de vidrio y a la naturaleza orgánica de las películas, estas se cargaban y se quemaban rápidamente a pesar de que las películas de porfirinas pueden presentar comportamien-

tos semiconductores. Para mejorar las condiciones de adquisición y obtener imágenes de buena calidad de acuerdo a las condiciones mencionadas en la metodología, las muestras se aterrizaron a la platina del microscopio para evitar el exceso de carga estática.

A continuación, se presentan las imágenes SEM obtenidas para las películas de CuTTP, H₂TPP y ZnTPP antes y después de ser expuestas a los diferentes aminoácidos.

4.2.1. Análisis de las imágenes SEM de la película CuTTP

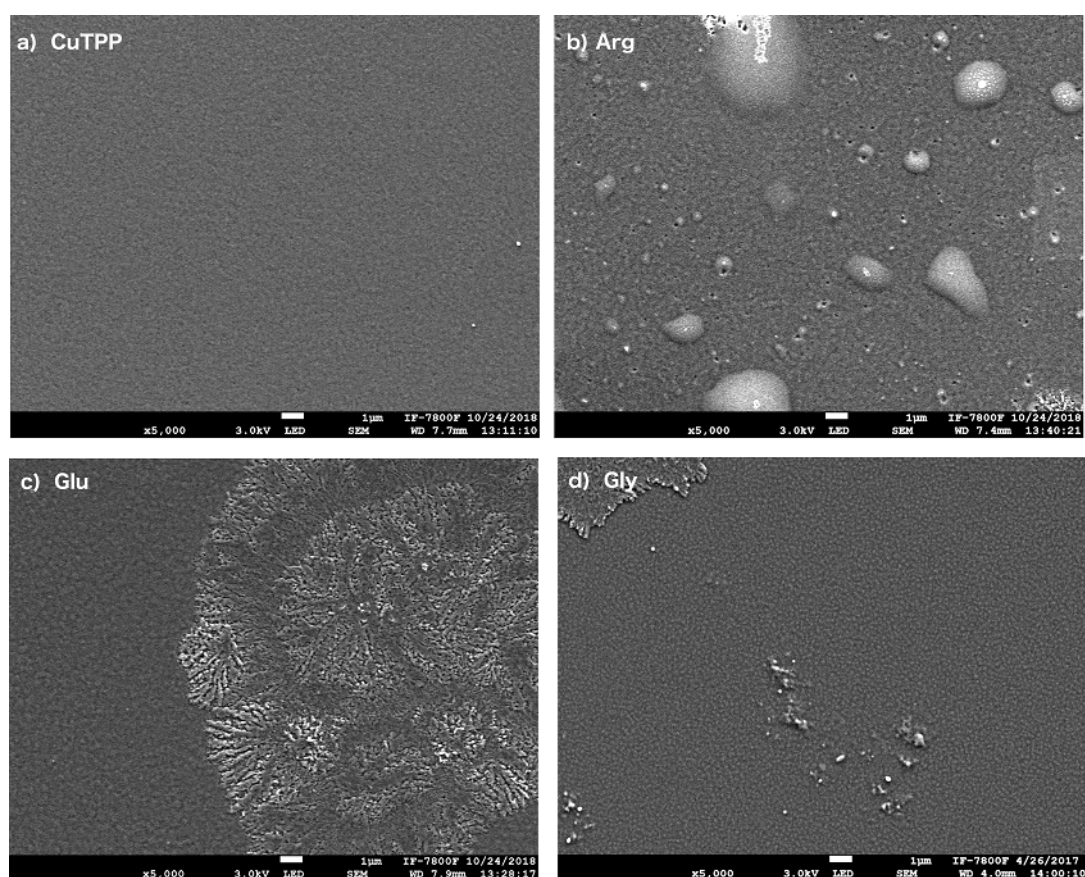


Figura 4.2: Imágenes SEM a 5000X, obtenidas para el sistema CuTTP sin aminoácido y con los diferentes aminoácidos utilizados

En la figura 4.2 a), se puede ver el aspecto de la película de tetrafenilporfirina de cobre sin aminoácido como una superficie lisa y plana. En la esquina superior izquierda la figura 4.2 b), se muestra la superficie después de la interacción con arginina. Aquí, se ve una película compacta con algunos poros aleatorios, y además, agregados sobre la película de tipo globular de diferentes formas y

dimensiones, teniendo el más grande alrededor de $3\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro.

Dado que la textura de las estructuras globulares es similar a la interfaz de la película, es posible que se hayan formado con el mismo material, en su caso, la arginina.

En la figura 4.2 c), después de la interacción con glutamato, se observa la formación de una película de tipo ramificado que se extiende a lo largo de la superficie de la porfirina. Las regiones brillantes y oscuras en esta imagen sugieren la presencia de zonas con diferentes espesores, siendo las estructuras más gruesas las que están en las regiones tipo rama. En la figura 4.2 d) derivado de la interacción con glicina, se observa la formación de una capas compactas de varios tamaños que parece estar creciendo sobre la superficie de la porfirina en forma de islas. En la esquina superior izquierda también se parecía un crecimiento tipo ramificado como en el caso del glutamato.

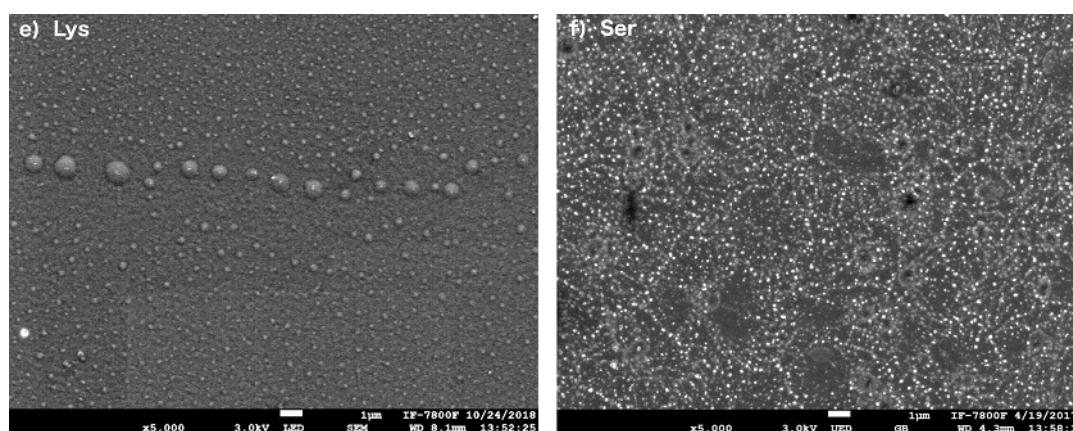


Figura 4.3: Imágenes SEM a 5000X, obtenidas para el sistema CuTPP sin aminoácido y con los diferentes aminoácidos utilizados

Por otro lado en la Figura 4.3 e), después del contacto con lisina, se observa una película compacta con características granulares de varias dimensiones en la interfaz. Finalmente, en la figura 4.3 f) asociada a la exposición con serina, se exhibe una interfaz granular donde los granos se distribuyen aleatoriamente formando zonas con agregados de baja y alta densidad. Además, la nueva película muestra algunos defectos donde se observa claramente la ausencia de granos correspondientes al aminoácido. Dada la diferencia en tonos de grises de las distintas zonas de la interfase, se puede inferir que la serina podría estar creciendo en forma de capas en la superficie de la porfirina.

4.2.2. Análisis de las imágenes SEM de la película H₂TPP

A continuación se muestran imágenes SEM de las películas H₂TPP antes y después de las interacciones con aminoácidos. A partir de estas imágenes, está claro que existe una diferencia importante con respecto a la morfología de la superficie en términos de las características de los aminoácidos. En la figura 4.4 a), se muestra la película de porfirina libre de metal muy plana y lisa antes de la interacción.

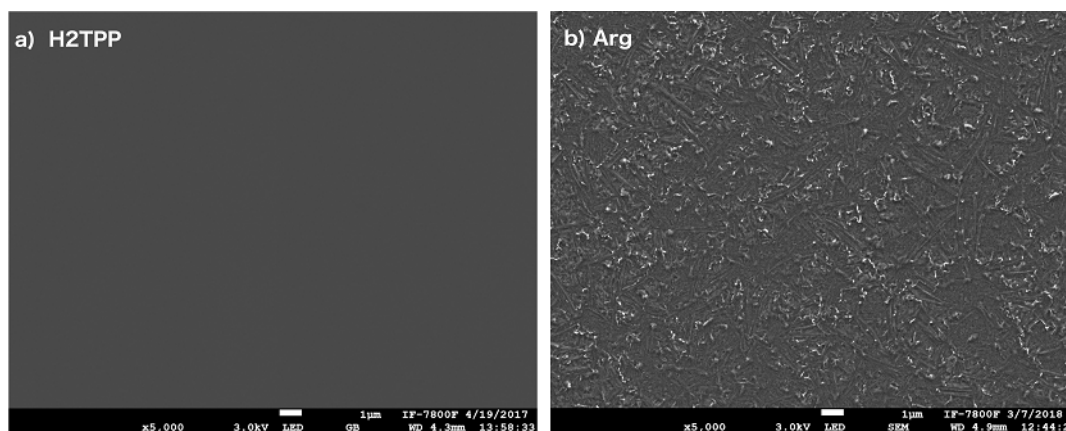


Figura 4.4: Imágenes SEM a 5000X, obtenidas para el sistema H₂TPP sin aminoácido y con los diferentes aminoácidos utilizados

Después de la inmersión en los aminoácidos, en todos los casos, la superficie expuesta mostró una cobertura superficial completa sin poros evidentes o zonas sin recubrir, lo que sugiere una buena interacción entre la película de porfirina H₂TPP y los aminoácidos. Además, las estructuras en la interfaz muestran un crecimiento 3D en todos los casos. Por ejemplo, las figuras 4.5 c), d) y f) correspondientes al glutamato, glicina y serina, respectivamente, exhibieron grandes agregados en la superficie, siendo la glicina la que mostró las estructuras más grandes (2.5 µm).

Por otro lado, las figuras 4.4 b) y 4.5 e), correspondientes a la arginina y la lisina respectivamente, ambas cargadas positivamente a valores de pH neutro, mostraron las superficies más regulares. La interfaz de la lisina tiene un aspecto granular con estructuras de tamaño pequeño, mientras que la superficie con arginina muestra una apariencia compacta tipo fibroso de apariencia bidimensional.

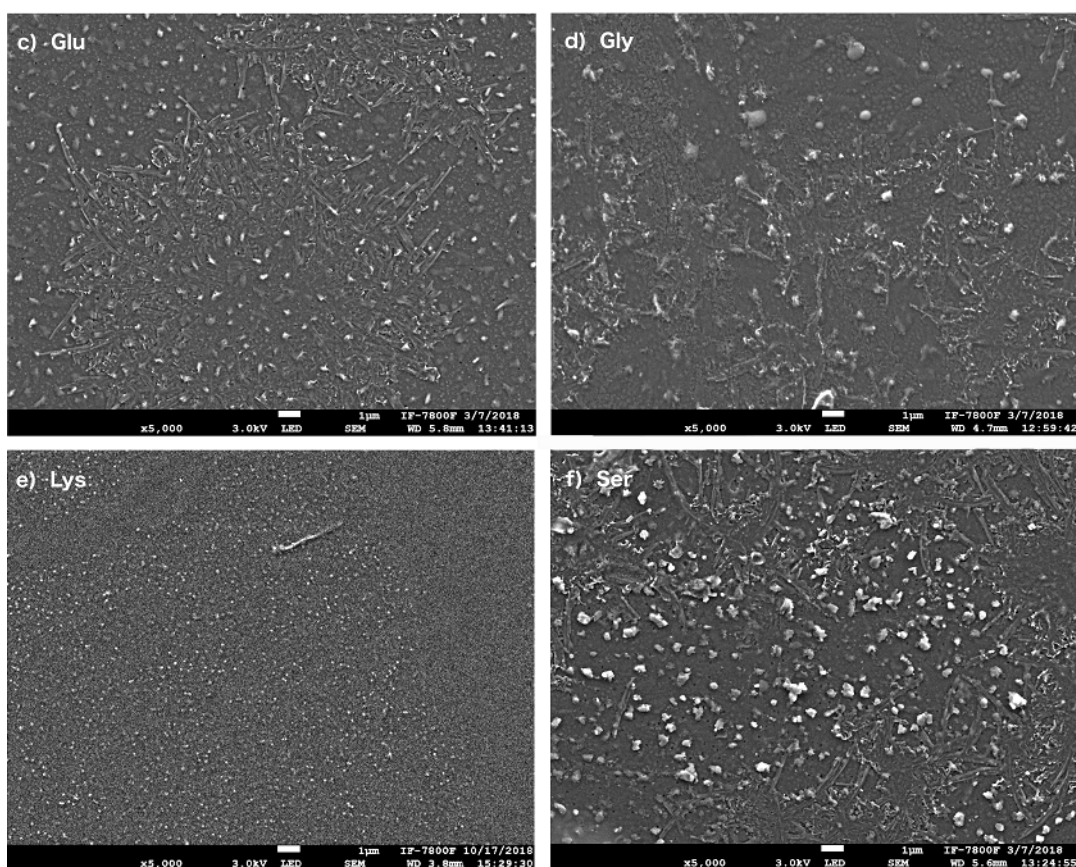


Figura 4.5: Imágenes SEM a 5000X, obtenidas para el sistema H_2TPP sin aminoácido y con los diferentes aminoácidos utilizados

4.2.3. Análisis de las imágenes SEM de la película ZnTPP

Las imágenes SEM de las superficies de ZnTPP antes y después de la interacción de aminoácidos se muestran en la figura 4.6. En la parte superior izquierda, se ve la superficie de porfirina pura cuya aspecto es plano y homogéneo (ver figura 4.6 a)).

Por otro lado, la superficie modificada por glicina (figura 4.6 d)) exhibe una película compacta con pequeños agregados dispersos al azar en la interfaz. A su vez, la superficie modificada con serina muestra una interfaz con muchos núcleos de dimensiones similares y formas tipo esféricas, lo que sugiere la formación de agregados como respuesta a interacciones tipo hidrofóbicas. Vale la pena notar que la textura de la interfaz de la serina es diferente a la de la glicina a pesar de ser similares a escala macroscópica.

La superficie con lisina como se ve en la figura 4.6 e) se muestra con agregados de forma circular

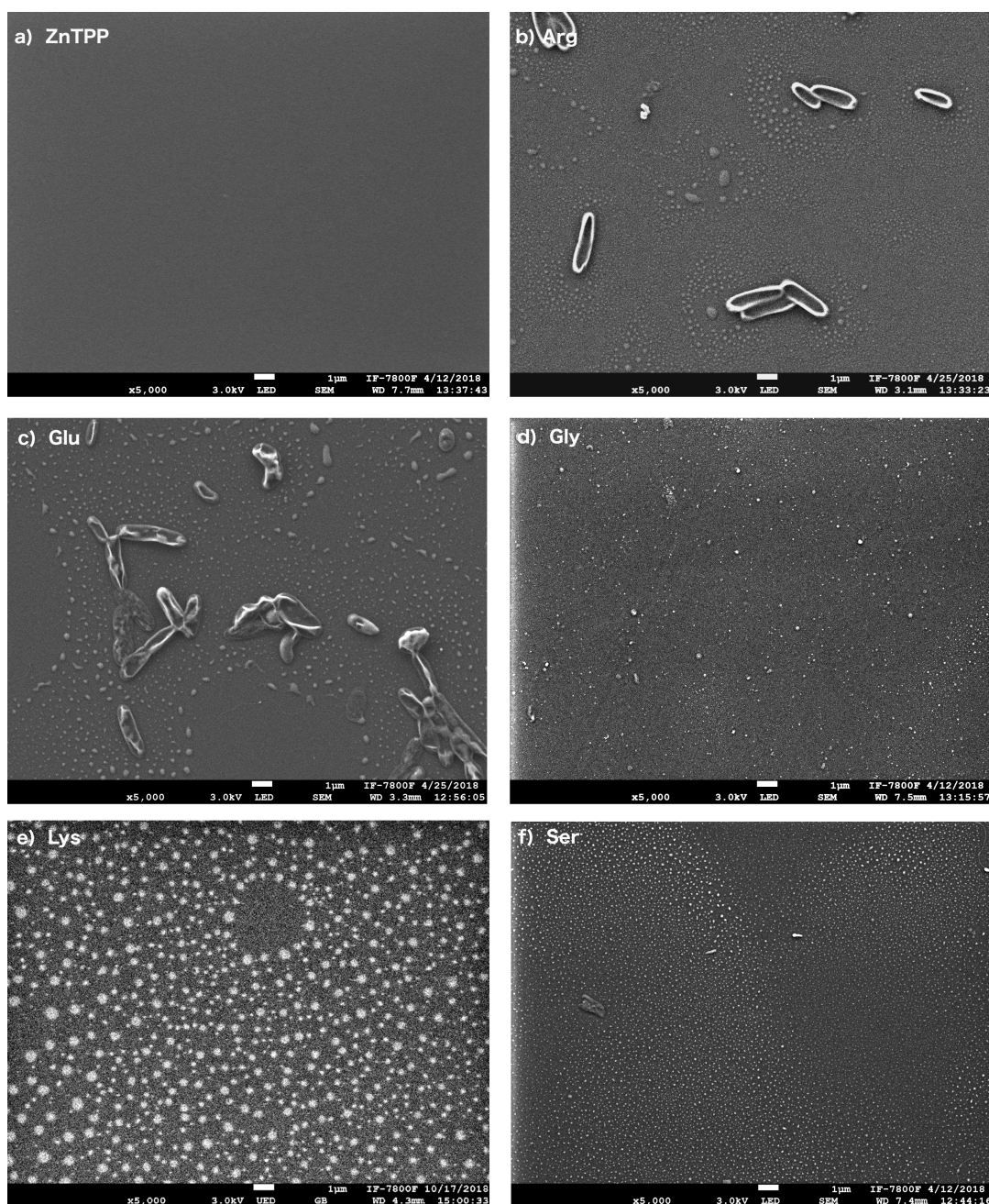


Figura 4.6: Imágenes SEM a 5000X, obtenidas para el sistema ZnTPP sin aminoácido y con los diferentes aminoácidos utilizados

cuyas dimensiones están en el intervalo entre 0.2 y 0.5 μm . Finalmente, se puede observar un aspecto similar para las figuras 4.6 b) y c), con superficies modificadas por arginina y glutamato, respectivamente. Además de presentar una película compacta homogénea en la superficie de la porfirina, se ven estructuras entre 0.1 y 1 μm de forma alargada que alcanzan hasta 4 μm de longitud.

4.3. Microscopia de Fuerza atómica (AFM)

Mediante la técnica de AFM fue posible conocer el grosor de las películas de porfirinas obtenidas vía evaporación física. Este parámetro es importante, ya que no solo garantiza la homogeneidad de la película, sino también da idea de la cantidad de material depositado dado la masa inicial de evaporación. Adicionalmente, con AFM fue posible conocer la forma, dispersión tridimensional y rugosidad de las películas de porfirinas antes y después de la interacción con los aminoácidos, como se verá mas adelante.

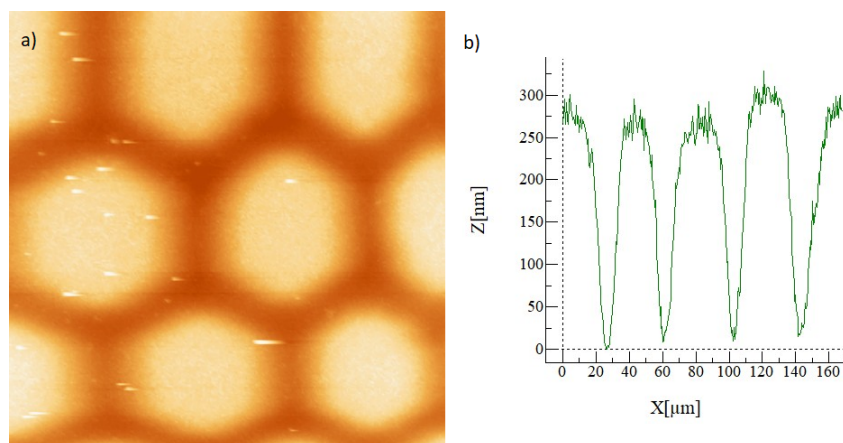


Figura 4.7: a) Imagen AFM de $100\ \mu\text{m}$ por lado, de una película de porfirina estructurada, b) perfilometría de la película a lo largo de una dirección lineal

En la figura 4.7 a), se muestra una película de porfirina con ciertas periodicidades que permitieron conocer el espesor de la película. Mediante el uso del programa *WSxM 5.0 Developed 7.0* [32] de uso libre para análisis de imágenes de AFM, se procesó la imagen para conocer el espesor de la película. En la figura 4.7 b) se aprecia la perfilometría de la imagen, en donde se pueden ver las crestas y los valles del arreglo (que caen en los mismo valores para las diferentes periodicidades), obteniendo una película homogénea de espesor promedio de $\approx 275\ \text{nm}$.

4.3.1. Análisis de las imágenes de AFM de la película CuTPP

La figura 4.8 a) pertenece a la película CuTPP sin contacto con aminoácido. Aquí, se observa una superficie muy lisa y libre de defectos. Por otro lado, en las figuras 4.8 d) y 4.8 e), pertenecientes a la interacción con glicina y lisina, respectivamente, se observan superficies con agregados de di-

mensionen que varían entre 0.2 y 2 μm de tipo circular.

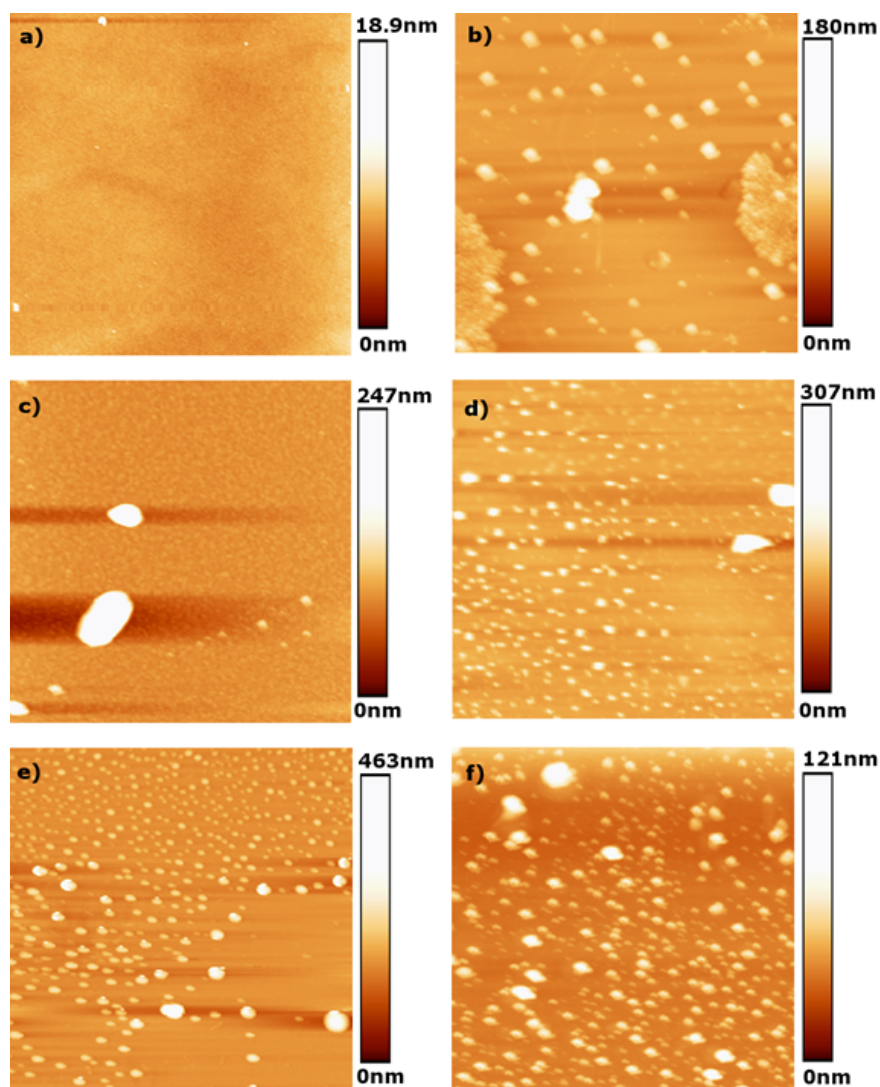


Figura 4.8: Imágenes AFM de 20 μm por lado, obtenidas para el sistema CuTPP, a) sin aminoácido, b) Arg, c) Glu, d) Gly e) Lys y f) Ser

En la figura 4.8 b) perteneciente a la interfaz modificada por la presencia de arginina, se observan además de los agregados, dos regiones de una película ramificada que crece en diferentes zonas en la superficie. Esta característica es similar a la figura 4.2 c) de la superficie modificada con glutamato, como se vio con SEM. Esto sugiere, que al inicio del crecimiento de la película y a menores escalas, el crecimiento de ambos aminoácidos es similar.

Finalmente, en la figura 4.8 c) se muestra una superficie plana con la formación granos pequeños

en el fondo de la imagen, así como de agregados grandes que miden entre 2 y 5 μm . En la figura 4.8 f) se observan la formación de agregados más grandes que en las otras imágenes, sin embargo, no llegan a tener más de 2 μm de diámetro. En todos los demás casos, las superficies muestran la presencia de granos pequeños y grandes de forma irregular distribuidos de forma dispersa en la superficie de la película de CuTPP original.

4.3.2. Análisis de las imágenes AFM de la película H₂TPP

Ahora se muestran los resultados de AFM de las muestras de H₂TPP. Como se esperaba, la película de H₂TPP sin interacción exhibió una superficie muy lisa y compacta. Es interesante resaltar que todas las demás interfases muestran diferentes características. Por ejemplo, la película en contacto con glicina, (figura 4.9 d) muestra una modificación en la superficie de la película de forma irregular con agregados de varios tamaños en diferentes regiones del sustrato.

La muestra que estuvo en contacto con serina (figura 4.9 f)) muestra una película de tipo granular con regiones de agregados de alta y baja densidad. Por otro lado, las figuras 4.9 b) y c), correspondientes a las películas que estuvieron en contacto con arginina y glutamato, respectivamente, presentan un aspecto similar que se asemeja a una película incompleta con agregados de diferentes formas. Finalmente, la figura 4.9 e), muestra una superficie plana cubierta con núcleos de diámetro pequeño (alrededor de 200 nm) y escasos agregados de tamaño mayor.

4.3.3. Análisis de las imágenes AFM de la película ZnTPP

Las imágenes de AFM obtenidas para la película de ZnTPP, se muestran a continuación. La película de porfirina de zinc sin aminoácido, figura 4.10 a), exhibe una superficie granular en contraste con las superficies lisas que mostraron las películas puras de CuTPP y H₂TPP. Esto también se evidencia con la altura máxima en la película de acuerdo a la barra de altura de la misma imagen.

De manera general, todas las imágenes de este grupo poseen la presencia de agregados a lo largo de la interfaz cuyas características son similares a sus contra partes de SEM (figura 4.6), donde las características de la superficie sugieren interacciones de tipo hidrofóbico entre esta película de

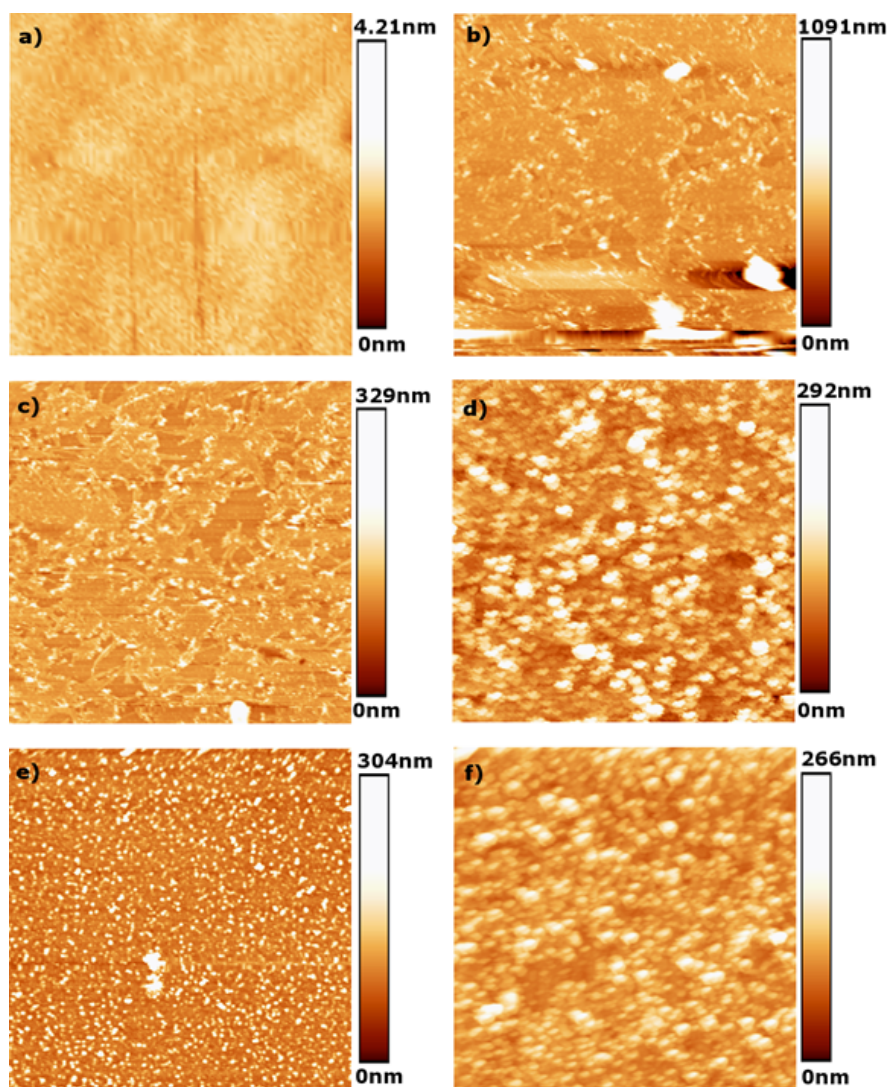


Figura 4.9: Imágenes AFM de $20\ \mu\text{m}$ por lado, obtenidas para el sistema H_2TPP , a) sin aminoácido, b) Arg, c) Glu, d) Gly, e) Lys y f) Ser.

porfirina y los aminoácidos bajo estudio. Este detalle resalta en la figura 4.10 b), en donde se observa un área que no tiene formación de agregados. Del mismo modo se observa dicho comportamiento en la figura 4.10 c). Sin embargo, en este caso, hubo la formación de estructuras grandes tridimensionales de un tamaño entre 2 y $5\ \mu\text{m}$. Por último, la figura 4.10 e), muestra la formación de agregados pequeños de $\approx 0.2\ \mu\text{m}$ distribuidos a lo largo de la superficie.

Para finalizar, el análisis de la película con la técnica de AFM permitió la obtención de los valores de rugosidad de las películas antes y después de estar expuestas a los aminoácidos, los cuales se resumen en la tabla 4.1. Aquí, se aprecia que hay un gran cambio en la rugosidad debido a la

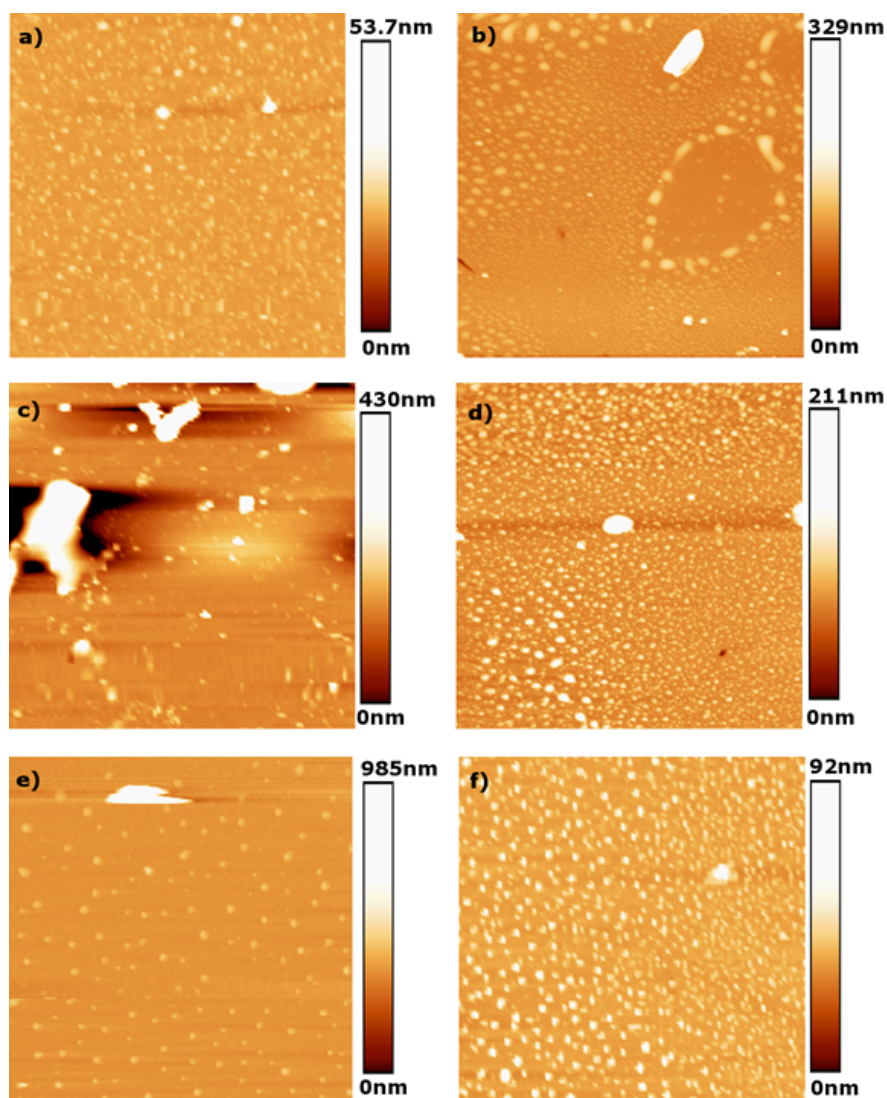


Figura 4.10: Imágenes AFM de $20\ \mu\text{m}$ por lado, obtenidas para el sistema ZnTPP, a) sin aminoácido, b) Arg, c) Glu, d) Gly, e) Lys y f) Ser.

presencia de los aminoácidos adsorbidos. Sin embargo, no se observa una correlación para el valor máximo o mínimo de la rugosidad entre el tipo de película y un aminoácido en particular.

	Sin Aminoácido (nm)	Arginina (nm)	Glicina (nm)	Glutamato (nm)	Lisina (nm)	Serina (nm)
CuTPP	1.39	12.79	25.01	20.30	20.96	14.48
H ₂ TPP	1.39	0.07	32.01	26.41	12.21	28.54
ZnTPP	3.05	16.32	11.49	29.57	0.06	9.06

Tabla 4.1: Se muestran los valores de rugosidad para cada película de porfirina antes y después de la interacción con los aminoácidos

4.4. Espectros UV-Vis de las películas de porfirina

Los datos de absorbancia UV-Vis para las tres películas antes y después de las interacciones con todos los aminoácidos se muestran a continuación. En este caso, todas las gráficas se normalizaron para eliminar la influencia del grosor de las películas reflejada en la intensidad de absorbancia en las gráficas.

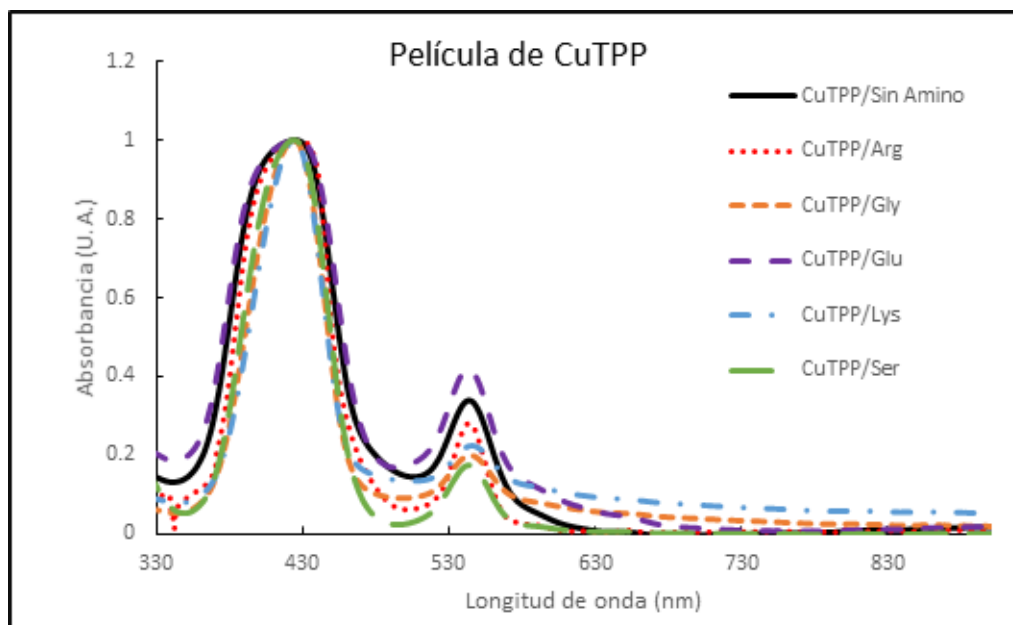


Figura 4.11: Espectros UV-Vis de la película de CuTPP antes y después de interactuar con los todos los aminoácidos

En la figura 4.11, se observan los espectros de UV-Vis de la película CuTPP antes y después de la interacción con todos los aminoácidos. De manera general, se puede observar que la posición del pico de Soret mantiene su máximo en 424 nm para todos los casos.

Aunque existen similitudes entre las bandas de Soret de todas las muestras, se observan ligeros cambios en el ancho de los picos en comparación con la película pura, esto es, son más estrechos para las películas después de la interacción. Los cambios anteriores pueden deberse a la interacción aminoácido-porfirina, la cual parece que modifica los grados de libertad del sistema reduciendo ligeramente el ancho del pico de Soret debido a una disminución en la deslocalización electrónica.

Por otro lado, en la región de la banda Q únicamente se observa un pico predominante alrededor de los 544 nm para todas las muestras. Reportes anteriores posicionan el pico α de la metaloporfirina alrededor de esa longitud de onda, siendo este el pico dominante cuando el metal forma una estructura cuadrada planar estable con el macrociclo [10].

Además, la banda Q muestra cambios en su intensidad después de la exposición a los aminoácidos, siendo la película expuesta al glutamato la que presenta el mayor aumento en la intensidad. Para los otros aminoácidos, hay una reducción en la intensidad de las bandas Q que, según Giovanetti et. al. [10], puede deberse a la interacción entre el centro metálico y el aminoácido.

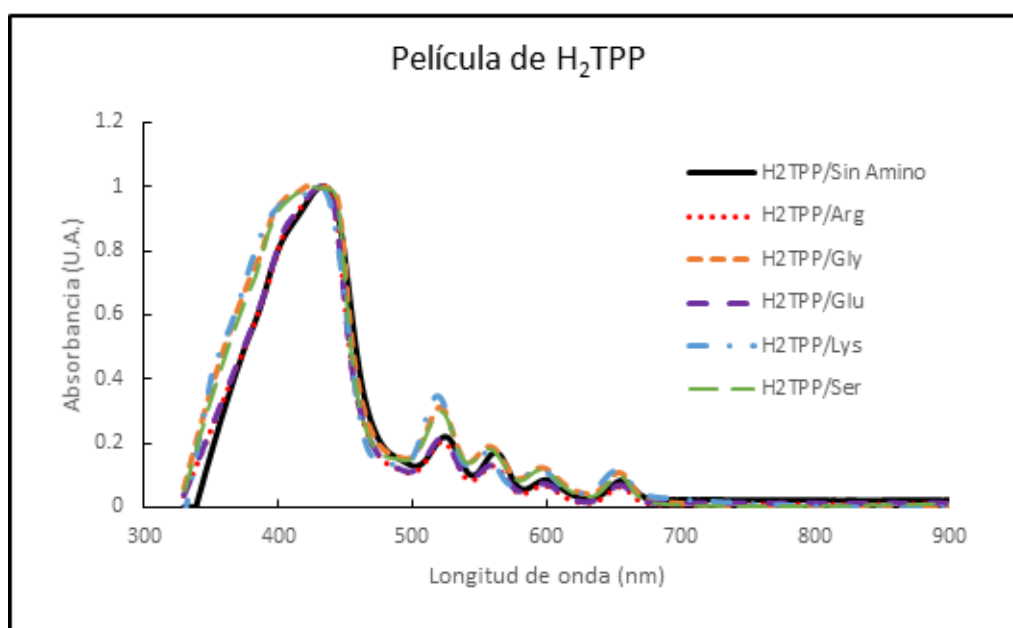


Figura 4.12: Espectros UV-Vis de la película de H_2TPP antes y después de interaccionar con los aminoácidos

Los espectros de absorbancia de la película H_2TPP antes y después de la inmersión con las diferentes disoluciones de aminoácidos se muestran en la figura 4.12. Aquí, se observa el característico espectro de la porfirina libre de metal. La banda de Soret de la película pura de H_2TPP se ubica en 434 nm, pero exhibió un corrimiento hipocrómico con los aminoácidos lisina y serina de 5 nm. Este comportamiento de acuerdo a reportes anteriores [10], sugiere que existe una interacción entre la lisina y la serina con el anillo de la porfirina.

Por otro lado, los otros aminoácidos no muestran cambios en la banda de Soret respecto a la película de porfirina original. Adicionalmente, cuatro de las cinco bandas de Soret exhibieron corrimientos hipsocrómico de entre 2 - 7 nm. También, se observa un ligero aumento de intensidad de las bandas Q para la glicina, lisina y serina, en comparación con la arginina y glutamato. Estos resultados sugieren que la energía de transición de las bandas Q de la película H_2TPP aumentó ligeramente después de las interacciones con la glicina, lisina y serina.

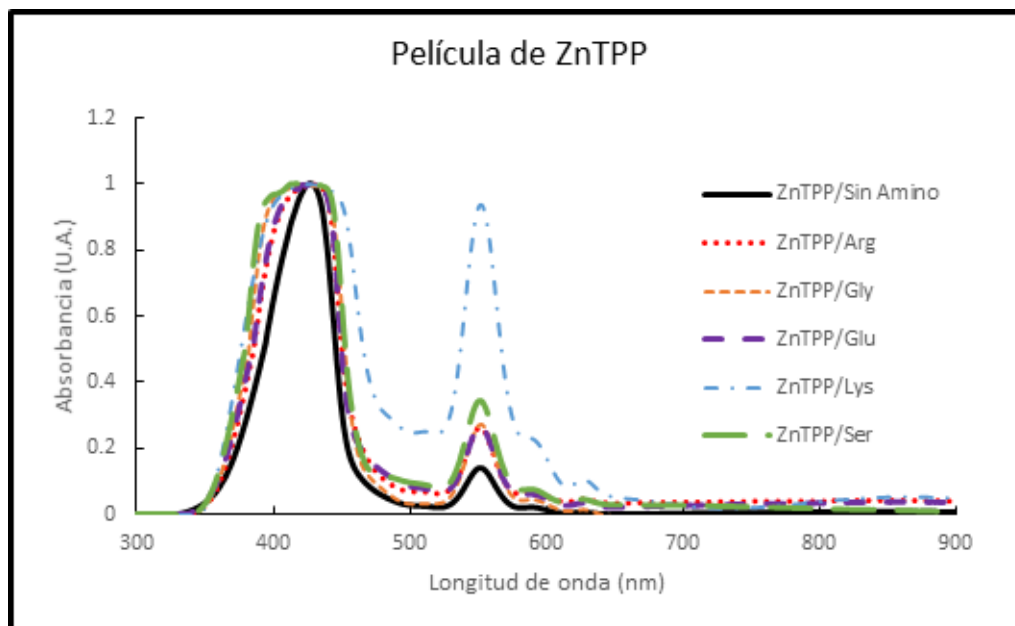


Figura 4.13: Espectros UV-Vis de la película de ZnTPP antes y después de interaccionar con los aminoácidos

Finalmente, los espectros UV-Vis de la película de ZnTPP pura y modificada con los diferentes aminoácidos se muestran en la figura 4.13. La posición de la banda de Soret exhibe un corrimiento hipsocrómico entre 1 y 9 nm después de las interacciones con los aminoácidos. Cabe destacar que el mayor desplazamiento hipsocrómico de la banda de Soret correspondió a la lisina. En los espectros, también se observa un ensanchamiento de las bandas de Soret después de la exposición a los aminoácidos, lo que sugeriría un cambio en el estado de deslocalización electrónica del macrociclo, debido a una posible coordinación entre los aminoácidos con el metal.

En el caso del $Zn(II)$, ya ha sido reportado que cuando se encuentra coordinado a una porfirina, puede combinarse con otro ligando para formar un complejo pentacoordinado con estructura de

pirámide de base cuadrada [10].

Por otro lado, en la película pura la banda Q consta principalmente de dos picos, siendo el pico cercano a los 500 nm (α) el más predominante. De acuerdo a la literatura, si el pico α domina la región de las bandas Q, es indicativo de que el metal forma un arreglo cuadrado plano estable con el macrociclo [10].

Después de la exposición a los aminoácidos, se observaron cambios en la intensidad de la banda Q, así como la formación de un pequeño pico después de los 600 nm que podría deberse a cambios en la orientación de los anillos aromáticos laterales del macrociclo. Es interesante notar que la banda Q de la película que estuvo en contacto con la lisina tuvo un aumento significativo de su intensidad que, según Giovanetti et. al. [10], podría deberse a la interacción entre la lisina y los grupos periféricos de la porfirina.

Otro aspecto a resaltar, es que las posiciones de las bandas Q discernibles permanecen exactamente en las mismas longitudes de onda (553 nm, 590 nm, 629 nm) independientemente de las características de los aminoácidos.

En la tabla 4.2, se muestran las posiciones de los picos de absorción máximos resumidas para las películas antes y después de las interacciones con los aminoácidos. A partir de estos valores, está claro que los picos en el sistema de cobre no mostraron un cambio importante para ambas bandas. Para el sistema H₂TPP, el pico Soret exhibió pequeños cambios hipsocrómicos sólo para lisina y serina, mientras que las bandas Q muestran corrimientos hipsocrómicos en todos los casos. En cuanto a la película de ZnTPP, la mayoría de los picos de Soret exhibieron corrimientos hipsocrómicos, mientras que las bandas Q no mostraron alguna diferencia en su posición después de la interacción con los aminoácidos.

Película de Porfirina	Banda	Longitud de onda (nm)					
		Sin AA	Arg	Glu	Gli	Lis	Ser
CuTPP	Soret	424	424	424	424	424	424
	Q	544	543	544	545	544	545
H ₂ TPP	Soret	434	433	434	433	429	429
	Q	525	523	522	522	519	521
		563	560	560	558	553	557
		601	598	598	597	595	597
		658	656	656	654	652	654
ZnTPP	Soret	428	428	427	427	426	417
	Q	553	553	553	553	553	553
		590	590	590	590	590	590
			628	628	628	628	628

Tabla 4.2: Posiciones de las bandas de Soret y bandas Q de las películas de porfirina antes y después de estar en contacto con las disoluciones de aminoácidos.

4.5. Cuantificación de aminoácidos

Para obtener la cantidad de aminoácido adsorbido para cada película de porfirina, se empleo la reacción colorimetrica de aminoácido con ninhidrina para obtener el púrpura de Ruhemann [24].

4.5.1. Curvas de calibración

Para poder cuantificar la cantidad de aminoácido adsorbido por las películas de porfirina, fue necesario construir las curvas de calibración para cada aminoácido. Esto se logra midiendo la absorbancia a diferentes concentraciones conocidas de aminoácido. En la figura 4.14 a), se muestran los espectros obtenidos para diferentes concentraciones de arginina. Tomando el valor de la absorbancia a 570 nm de todos los espectros se hace un análisis de mínimos cuadrados 4.14 b), en donde se obtiene la ecuación de una recta que describe la relación entre la absorbancia y la concentración de la arginina como función de la concentración.

Como ya se mencionó, este método se empleó para construir la curva de calibración de todos los aminoácidos cuyos parámetros obtenidos del ajuste lineal se muestran en la tabla 4.3. Con estos valores fue posible calcular de manera indirecta la cantidad de aminoácido absorbido por cada película.

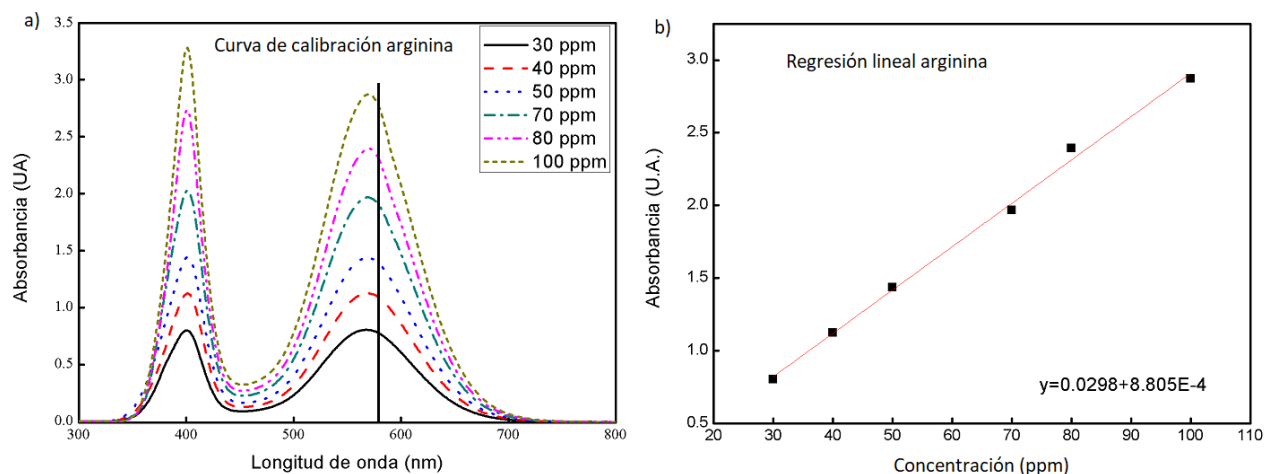


Figura 4.14: Ejemplo de la curva de calibración realizada para la arginina

	m	b	R ²
Arginina	0.029	8.80E-4	0.99
Glicina	0.008	2.63E-4	0.99
Glutamato	0.004	1.63E-4	0.99
Lisina	0.018	4.96E-4	0.99
Serina	0.009	1.56E-4	0.99

Tabla 4.3: Resumen de los parámetros obtenidos del ajuste lineal a los datos de absorbancia y concentración de los aminoácidos utilizados

4.5.2. Cuantificación del aminoácido residual y adsorbido

Para los experimentos de adsorción, las películas de porfirina fueron evaporadas sobre sustratos de vidrio o cuarzo, pero para corroborar que el sustrato no interfiriera con el proceso de adsorción se hizo un experimento en donde se sumergió un sustrato de vidrio limpio en una disolución a pH = 7 de concentración conocida de glicina. Después de 2 hora se retiró el sustrato y la disolución fue analizada para obtener los espectros de absorción de las disoluciones remanentes (figura 4.15).

Como se puede observar de la figura anterior, los espectros antes y después de la inmersión coinciden perfectamente figura (4.15). Para corroborar este resultado, el experimento se realizó por triplicado y a partir de los espectros obtenidos, se tomó el valor de la absorbancia a 570 nm. Utilizando la ecuación de calibración obtenida para la glicina, se pudo obtener la concentración de

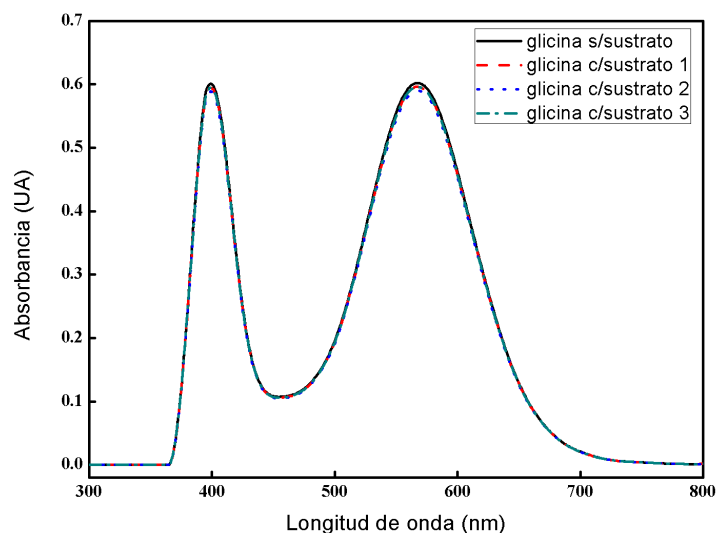


Figura 4.15: Espectros de absorción obtenidos de la interacción de un sustrato de vidrio con una disolución de glicina

la glicina residual en los tres casos como se muestra en la tabla 4.4. De estos datos, se puede ver que las concentraciones obtenidas para las diversas interacciones de la glicina con y sin sustrato de vidrio son iguales para fines prácticos.

Con base en los resultados mostrados, se puede afirmar que la presencia el sustrato no afecta la interacción entre los aminoácidos con las películas de porfirina, ni adsorbe material por la parte no recubierta que pudieras alterar las mediciones de cuantificación.

	Absorbancia	Concentración (ppm)
Sin sustrato	0.60208	69.76
Sustrato 1	0.59606	69.06
Sustrato 2	0.59604	69.06
Sustrato 3	0.59607	69.07

Tabla 4.4: Resumen de los datos obtenidos de diferentes experimentos de la interacción de glicina con sustratos de vidrio

Una vez que se determinó que el sustrato no contribuye a la adsorción de los aminoácidos, se cuantifico la cantidad de aminoácido residual en las disoluciones que estuvieron en contacto con las

películas de porfirina.

Por ejemplo, a una disolución de arginina de 20 mL a $\text{pH} = 7$ que estuvo en contacto con una película de tetrafenilporfirina de cobre (CuTPP), se le agregaron 3.25 mL de ninhidrina 0.1 M y se aforó a 25 mL con buffer de fosfato. Una vez que apareció el púrpura de Ruhemann, se tomó una alícuota de 0.5 mL, aforándose a 5 mL con buffer de fosfato, a la cual se le midió su espectro de absorbancia (figura 4.16).

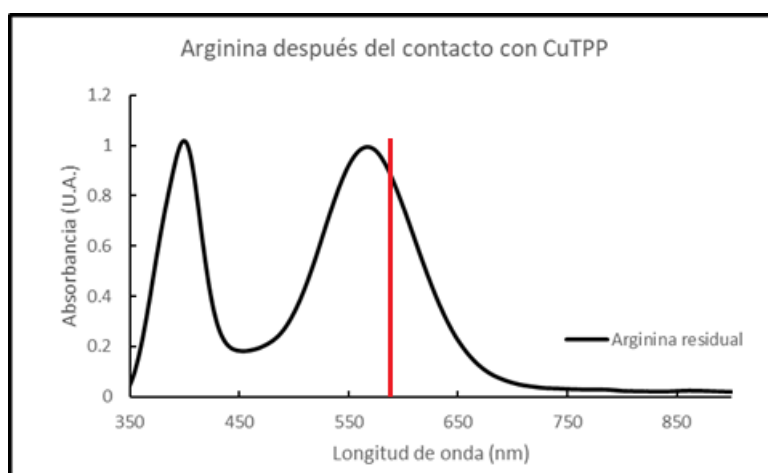


Figura 4.16: Espectro de absorción del púrpura de Ruhemann obtenido de la arginina residual que estuvo en contacto con la película de CuTPP

Con el espectro obtenido, se utilizó el valor de la absorbancia a 570 nm (0.990), y con ayuda de la ecuación de la curva de calibración para la arginina (tabla 4.3), se calculó la concentración de la alícuota proveniente de la interacción.

$$\frac{0.990}{0.0298} = 33.22 \text{ ppm de arginina}$$

A partir del cálculo de la concentración de la alícuota, se obtuvo la concentración de la disolución original.

$$\frac{(33.22 \text{ ppm})(5 \text{ mL})}{0.5 \text{ mL}} = 332.25 \text{ ppm de arginina}$$

Una vez que se conoció la concentración de la disolución remanente, y sabiendo que la concentración

original era de 1000 ppm, tomando la diferencia con este valor, se pudo conocer la concentración de arginina que fue adsorbida por la película de CuTPP.

$$1000 \text{ ppm} - 332.25 \text{ ppm} = 667.75 \text{ ppm de arginina adsorbida en CuTPP}$$

Este análisis se hizo para todas las películas frente a los 5 aminoácidos. El resumen de los resultados obtenidos se muestra en la tabla 4.5.

		Arginina	Glicina	Glutamato	Lisina	Serina
CuTPP	Absorbancia	0.990	0.697	0.391	1.222	0.928
	Residual (ppm)	332.25	834.13	917.50	644.50	981.37
	Absorbido (ppm)	667.75**	165.87	82.50	355.50	18.63*
H ₂ TPP	Absorbancia	2.360	0.705	0.310	0.295	0.845
	Residual (ppm)	792.25	844.25	727.88	155.63	894.25
	Absorbido (ppm)	207.75	155.75	272.12	844.37**	105.75*
ZnTPP	Absorbancia	1.952	0.769	0.185	0.337	0.871
	Residual (ppm)	654.38	919.88	434.38	177.88	921.63
	Absorbido (ppm)	345.62	80.12	565.62	822.12**	78.37*

Tabla 4.5: Resumen de los resultados obtenidos de la absorción de los aminoácidos en las películas de porfirina. * corresponde al aminoácido de mínima adsorción, mientras que ** corresponde al de máxima adsorción para cada película.

Con los datos de la tabla 4.5, se puede determinar que la película de CuTPP presento una secuencia de máxima a mínima adsorción como Arg>Lys>Gly>Glu>Ser. Por otro lado, la película de H₂TPP siguió la secuencia Lys>Glu>Arg>Gly>Ser, y finalmente, el orden para la película de ZnTPP fue Lys>Glu>Arg>Gly>Ser.

Para H₂TPP y ZnTPP, la mayor adsorción fue para la lisina con una captura promedio del 83 %, mientras que la arginina se adsorbió alrededor del 67 % en la película CuTPP. Para las tres pelícu-

las, el aminoácido que registro la menor concentración adsorbida fue la serina.

4.6. Isotermas de adsorción de aminoácido

4.6.1. Isoterma de Langmuir

Los isotermas de Langmuir y Freundlich son los modelos que más se utilizan para la interpretación de datos experimentales de adsorción, es por ello, que se emplearon para conocer la naturaleza de la interacción entre los aminoácidos y las superficies de las películas de porfirina.

En el caso de la película de CuTPP, el aminoácido que más fue adsorbido fue la arginina, mientras el que presento la menor adsorción fue la serina. Para hacer el análisis y poder utilizar las isotermas de adsorción, se obtuvieron los valores de adsorción de los aminoácidos a diferentes concentraciones. En la tabla 4.6 se muestran los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones de arginina y serina, en donde se muestran valores de los parámetros característicos del modelo de Langmuir.

Una vez que se obtenidos los datos de absorción de arginina y serina a diferente concentración, se ajustaron mediante un análisis de mínimos cuadrados con en el modelo de adsorción de Langmuir, como se muestra en la figura 4.17.

Para que el modelo de adsorción de Langmuir explique el comportamiento de la adsorción de los aminoácidos sobre las películas, se necesita que se ajuste a una línea recta. En el caso de la adsorción de arginina sobre CuTPP se obtuvo una $R^2 = 0.01$, mientras que la serina obtuvo una $R^2 = 0.40$. En ninguno de los casos se logro una buena correlación a una linea recta, por lo que el modelo de Langmuir no representa la adsorción de los aminoácidos en la película de CuTPP.

En la película de H₂TPP el aminoácido que más se adsorbio fue la lisina, mientras el que presento la menor adsorción fue la serina. En la tabla 4.7 se muestran los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones de lisina y serina. Una vez que se tuvieron los datos de la absorción

CuTPP-Arginina					
Arginina (ppm)	750	1000	1500	2000	3000
Absorbancia (570 nm)	0.141	0.264	0.543	0.264	0.149
Arginina en disolución (ppm)	28.45	70.97	218.94	142.18	120.37
Arginina en película (ppm)	721.55	929.03	1281.06	1857.82	2879.63
CuTPP-Serina					
Serina (ppm)	750	1000	1500	2000	3000
Absorbancia (570 nm)	0.481	0.747	0.362	0.713	0.718
Serina en disolución (ppm)	305.54	632.14	460.54	1208.06	1824.94
Serina en película (ppm)	444.46	367.86	1039.46	791.94	1175.06

Tabla 4.6: Adsorción de arginina y serina a diferentes concentraciones sobre la película de CuTPP

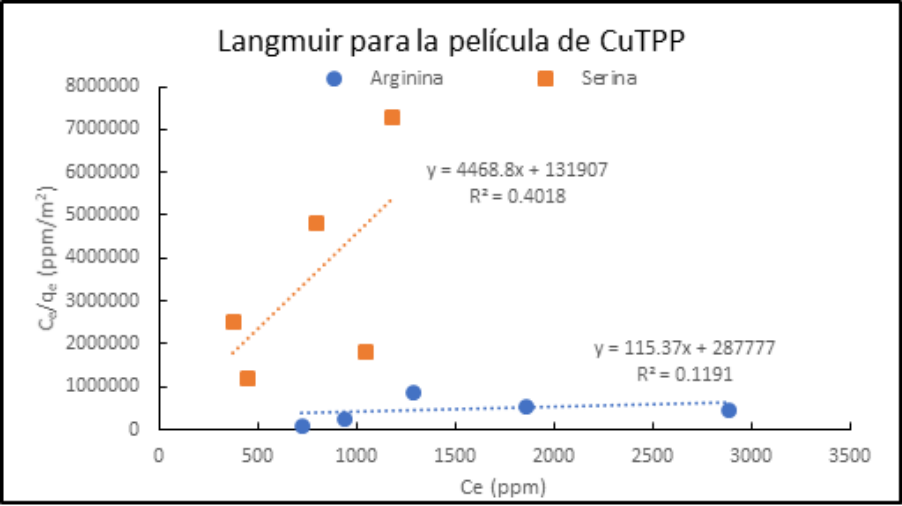


Figura 4.17: Datos de adsorción de arginina y serina sobre CuTPP ajustados al modelo de Langmuir

de lisina y serina a diferente concentración, se ajustaron los datos de ambos aminoácidos con el modelo de adsorción de Langmuir como se muestra en la figura: 4.18.

H ₂ TPP-Lisina					
Lisina (ppm)	750	1000	1500	2000	3000
Absorbancia (570 nm)	0.009	0.038	0.013	0.331	0.840
Lisina en disolución (ppm)	3.05	16.08	8.54	280.34	1064.76
Lisina en película (ppm)	746.95	983.92	1491.46	1719.66	1935.24
H ₂ TPP-Serina					
Serina (ppm)	750	1000	1500	2000	3000
Absorbancia (570 nm)	0.057	0.059	0.937	0.101	0.186
Serina en disolución (ppm)	36.40	49.97	1191.50	172.35	472.97
Serina en película (ppm)	713.60	950.03	308.50	1827.65	2527.03

Tabla 4.7: Adsorción de lisina y serina a diferentes concentraciones sobre la película de H₂TPP

El comportamiento de la adsorción de los aminoácidos sobre las películas no se ajustó al modelo de Langmuir, ya que la adsorción de lisina sobre H₂TPP dio un valor de $R^2 = 0.07$, mientras que la serina obtuvo una correlación de $R^2 = 0.56$. Por lo tanto, en ninguno de los casos se logra un comportamiento lineal, por lo que este modelo tampoco se ajusta al tipo de adsorción de los aminoácidos en la película de H₂TPP.

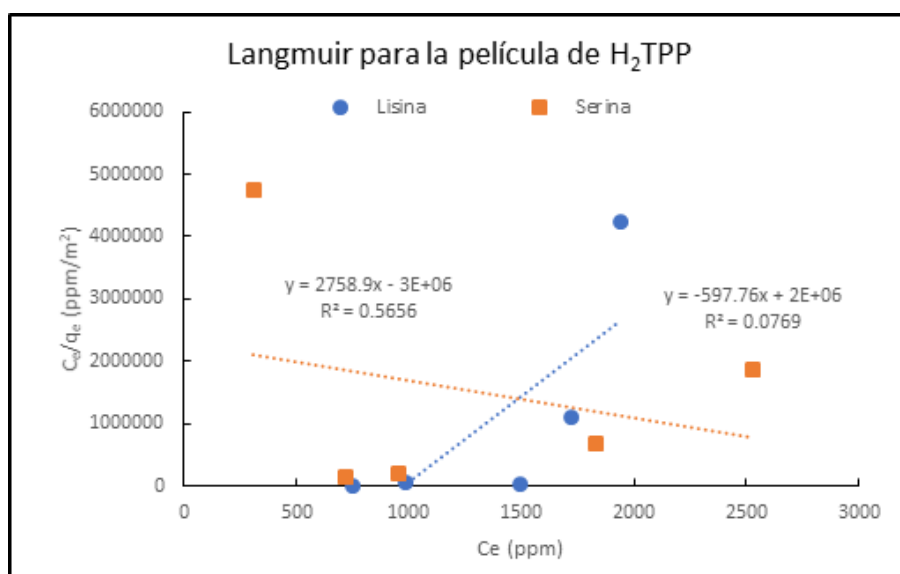


Figura 4.18: Datos de adsorción de lisina y serina sobre H₂TPP ajustados al modelo de Langmuir

Para la película de ZnTPP, el aminoácido que más se adsorbió fue la lisina, mientras el que presentó la menor adsorción fue la serina. En la tabla 4.8 se muestran los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones de lisina y serina. Con estos datos de adsorción a diferentes concentraciones, se ajustaron los datos de ambos aminoácidos al modelo de adsorción de Langmuir como se muestra en la figura: 4.19.

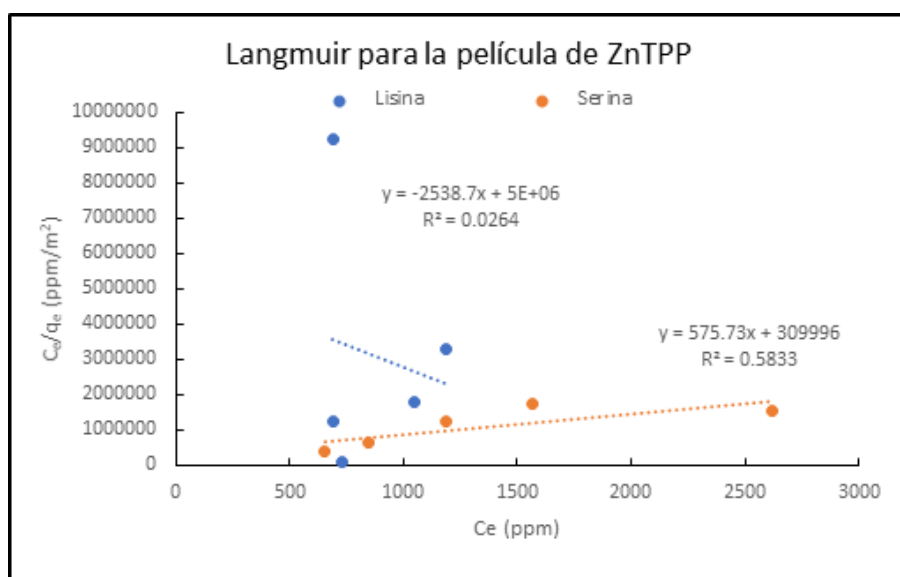


Figura 4.19: Datos de adsorción de lisina y serina sobre ZnTPP ajustados al modelo de Langmuir

ZnTPP-Lisina					
Lisina (ppm)	750	1000	1500	2000	3000
Absorbancia (570 nm)	0.056	0.729	0.711	0.966	1.823
Lisina en disolución (ppm)	17.89	307.63	450.64	816.53	2310.95
Lisina en película (ppm)	732.11	692.37	1049.36	1183.47	689.05
ZnTPP-Serina					
Serina (ppm)	750	1000	1500	2000	3000
Absorbancia (570 nm)	0.148	0.182	0.244	0.258	0.149
Serina en disolución (ppm)	94.43	154.42	310.38	437.86	379.69
Serina en película (ppm)	655.57	845.58	1189.62	1562.14	2620.31

Tabla 4.8: Adsorción de lisina y serina a diferentes concentraciones sobre la película de ZnTPP

Continuando con el análisis de los isoterma, en la figura 4.19 se muestra el ajuste lineal de la adsorción de lisina sobre ZnTPP con una correlación de $R^2 = 0.02$, mientras que la serina obtuvo una $R^2 = 0.58$. Dados los valores obtenidos, en ninguno de los casos se logra una línea recta que permita describir el comportamiento de adsorción de los aminoácidos en la película de ZnTPP.

Cabe recordar que el modelo de Langmuir asume que la adsorción sobre la superficie se lleva a cabo mediante una monocapa. Con el análisis anterior, podemos descartar que la adsorción de los aminoácidos sobre las películas de porfirinas se de mediante una formación de este tipo.

4.6.2. Isoterma de Freundlich

Con los datos de la arginina y serina (tabla 4.6) a diferente concentración, se ajustaron los datos de ambos aminoácidos con el modelo de adsorción de Freundlich como se muestra en la figura 4.20.

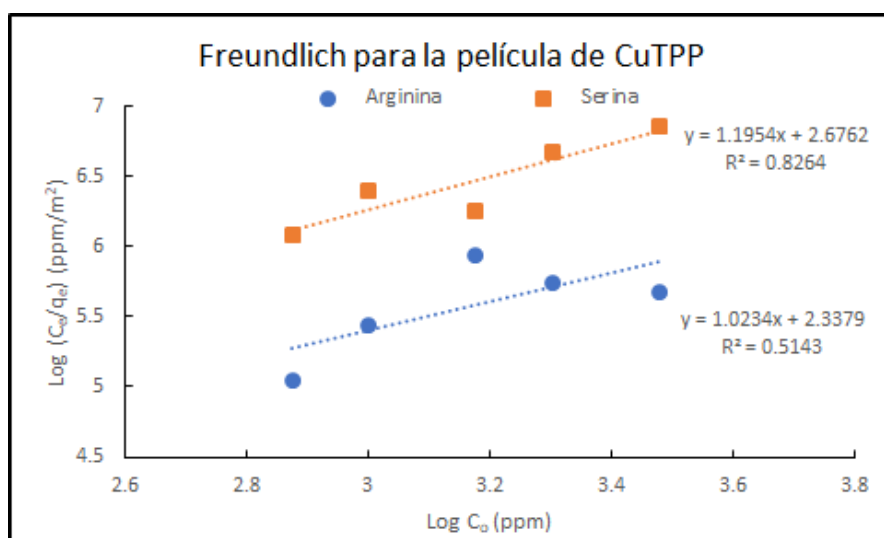


Figura 4.20: Datos de adsorción de arginina y serina sobre CuTPP ajustados al modelo de Freundlich

Para que el modelo de adsorción de Freundlich explique el comportamiento de la adsorción sobre las películas, se necesita que se ajuste a una línea recta, y en el caso de la adsorción de arginina sobre CuTPP, se obtuvo una $R^2 = 0.51$ mientras que la serina dio una $R^2 = 0.82$. Aunque los valores obtenidos no se encuentran cercanos al valor de 1, si son mayores a los obtenidos con el modelo de Langmuir. Por lo tanto, se puede decir que el modelo de Freundlich es el que mejor describe la adsorción de arginina y serina sobre la película de CuTPP.

El modelo de Freundlich sugiere que la adsorción de aminoácidos sobre la película de CuTPP se da en forma de multicapas. Lo anterior, concuerda con lo observado en las imágenes SEM (figuras 4.2 y 4.3) y AFM (figura 4.8), en donde se vio la formación de agregados tridimensionales sobre la película de CuTPP.

Este mismo análisis se realizó para la película de H₂TPP ajustando los datos al modelo de Freundlich (figura 4.21). En el caso de la adsorción de lisina sobre H₂TPP, se obtuvo una $R^2 = 0.8479$, mientras que la serina obtuvo una $R^2 = 0.4969$. Nuevamente, aunque los valores obtenidos como en el caso de la CuTPP no se encuentran cercanos a un comportamiento lineal perfecto, son mayores a los obtenidos en el modelo de Langmuir, por lo que el modelo de Freundlich describe mejor la adsorción de lisina y serina sobre la película de H₂TPP.

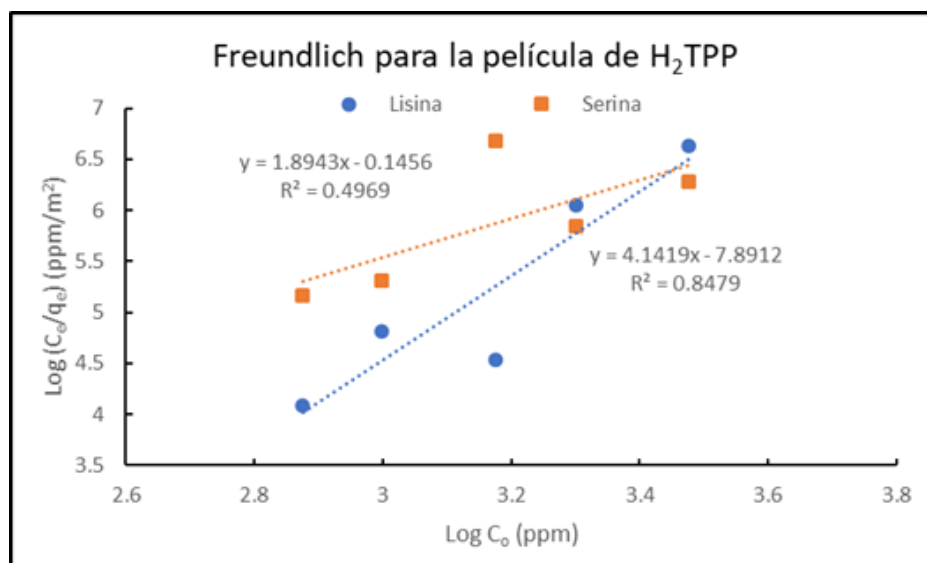


Figura 4.21: Datos de adsorción de lisina y serina sobre H₂TPP ajustados al modelo de Freundlich

Por último, el análisis se realizó para la película de ZnTPP usando los datos experimentales y un ajuste por mínimos cuadrados al modelo de Freundlich (figura 4.22). En el caso de la adsorción de lisina sobre ZnTPP se obtuvo una $R^2 = 0.84$, mientras que la serina obtuvo una $R^2 = 0.84$. Aunque los valores obtenidos como en el caso de la CuTPP y H₂TPP no se encuentran cercanos al valor de 1, son mayores a los obtenidos en el modelo de Langmuir, por lo que el modelo de Freundlich describe mejor la adsorción de lisina y serina sobre la película de ZnTPP.

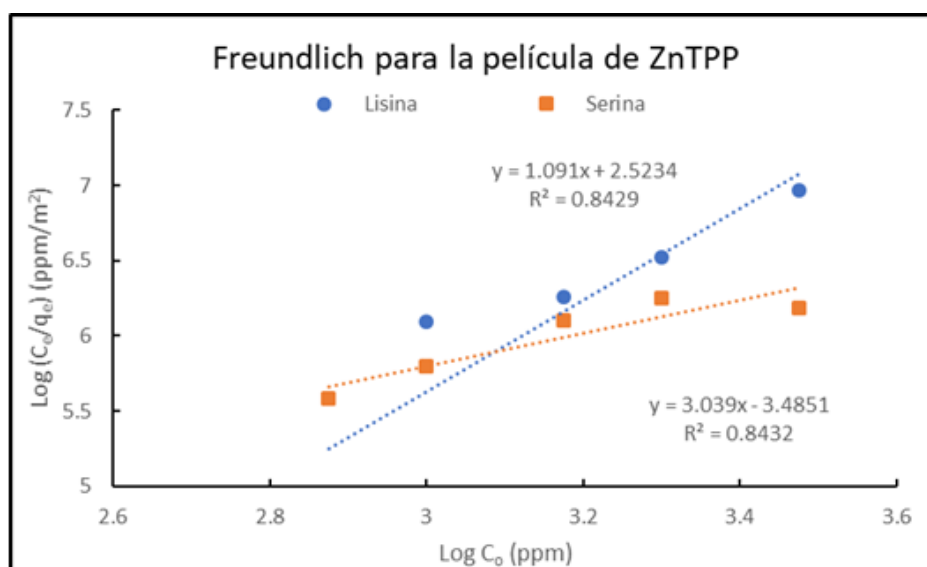


Figura 4.22: Datos de adsorción de lisina y serina sobre ZnTPP ajustados al modelo de Freundlich

Una vez que se tuvieron los resultados del modelo de Freundlich, se reunieron los parámetros isotérmicos en la tabla (4.9) para poder compararlos. Aquí, N es un parámetro empírico relacionado con la intensidad de la adsorción que varía con la heterogeneidad del adsorbente, y para valores de N en el intervalo entre 1.0 y 10.0, la adsorción es favorable [33, 30]. Para todas las películas se observa que la serina es la que posee una mayor intensidad de adsorción. Sin embargo es el aminoácido que tiene una menor adsorción macroscópica en las películas. Teniendo en cuenta que la serina es una molécula polar, es posible que el enlace formado entre la serina y las películas sea de tipo débil, favoreciendo la formación de agregados tridimensionales al interaccionar consigo misma. Por otro lado, K_f es una constante indicativa de la capacidad de adsorción de la película. Analizando los valores de K_f de todas las combinaciones, la película de CuTPP posee una mayor capacidad para adsorber serina (o moléculas de carácter polar), mientras la película de H₂TPP y ZnTPP tiene una mejor capacidad para absorber lisina (o moléculas de carácter catiónico).

	CuTPP /Arginina	CuTPP/Serina	H ₂ TPP/Lisina	H ₂ TPP/Serina	ZnTPP/Lisina	ZnTPP/Serina
N	1.02	1.19	1.89	4.14	1.09	3.03
Log K_f	2.33	2.67	-0.14	-7.89	2.52	-3.48
K_f	217.72	474.46	0.72	1.28E-08	333.73	3.27E-04
R^2	0.51	0.82	0.84	0.49	0.84	0.84

Tabla 4.9: Diferentes parámetros isotérmicos para los mejores y peores aminoácidos adsorbidos en las películas de porfirina utilizando el Modelo de Freundlich.

4.7. Cinética de adsorción de aminoácidos en películas

Para comprender de una mejor forma la adsorción de aminoácidos en las películas de porfirina, se hicieron adicionalmente mediciones de las cinéticas de adsorción. Para ello, las películas de porfirinas fueron sumergidas a diferentes tiempos (30 min, 1 h, 2 h, 3 h y 4 h) en las disoluciones de los aminoácidos que mostraron una mayor y menor afinidad a las películas. En el caso de la CuTPP se sumergieron en arginina y serina, mientras que para las H₂TPP y ZnTPP fueron la lisina y serina, respectivamente.

Posterior al contacto de las películas con las disoluciones de aminoácidos, las películas se retiraron, fueron secadas con aire comprimido y luego almacenadas. Por otro lado, a las disoluciones de los

aminoácidos se les trato con ninhidrina para formar el purpura de Ruhemann. Apoyados con la técnica de UV-Vis, se analizaron las disoluciones para obtener la concentración de aminoácido en las disoluciones remanentes, y por medio de la diferencia, se conoció la concentración de aminoácido adsorbido en las películas de porfirina.

Los modelos de cinética de adsorción se usaron no solo para investigar la velocidad de absorción de los aminoácidos en las películas, sino también, las características y mecanismos de adsorción. Para estudiar la cinética se emplearon modelos cinéticos de adsorción. Como se describe en la literatura [17], las formas lineales de la cinética de pseudo primer orden y pseudo segundo orden se utilizaron para ajustar los datos experimentales, y con ello, obtener las constantes de velocidad de adsorción, k_1 y k_2 , respectivamente. Dichas constantes distinguen el proceso por el cual se lleva a cabo la adsorción. Si $k_1 > k_2$ indicaría que la adsorción se da vía fisisorción. Por otro lado, si $k_2 > k_1$ mostraría que la adsorción se da a través de una quimisorción [30, 17].

4.7.1. Análisis cinético de la película de CuTPP

	CuTPP-Arginina				
Tiempo (s)	1800	3600	7200	10800	14400
Absorbancia (570nm)	0.874	1.297	0.588	1.115	0.489
Arg en disolución (ppm)	234.46	347.77	157.84	299.14	131.32
Arg en película (ppm)	765.54	652.23	842.16	700.86	868.68
$\ln(q_t - q_e)$	5.46	5.85	5.06	5.70	4.88
t/q_t	0.0005	0.0013	0.0021	0.0038	0.0041

Tabla 4.10: Resumen de los datos obtenidos a partir del estudio cinético de la CuTPP con arginina

En la tabla 4.10 se muestran los resultados obtenidos para la interacción de la película de CuTPP con arginina. Con ayuda de estos datos, se construyeron las gráficas para comparar los pseudo ordenes de reacción, y así, conocer cuál es el que mejor describe la adsorción de la arginina sobre la película de CuTPP.

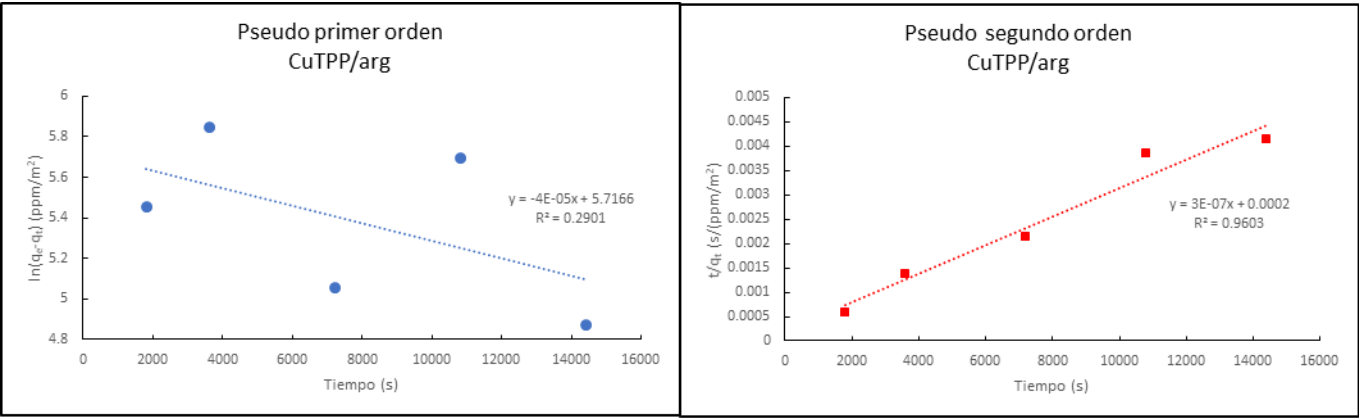


Figura 4.23: Gráficas de los pseudo ordenes de adsorción para la interacción de arginina con CuTPP

	CuTPP/serina				
Tiempo (s)	1800	3600	7200	10800	14400
Absorbancia (570 nm)	0.196	0.595	0.652	0.912	0.935
Serina en disolución (ppm)	166.05	503.64	551.86	771.68	791.12
Serina en película (ppm)	833.95	496.36	448.14	228.32	208.88
$\ln(q_e - q_t)$	5.11	6.22	6.31	6.65	6.67
t/q_t	0.0005	0.0018	0.0040	0.0118	0.0172

Tabla 4.11: Resumen de los datos obtenidos a partir del estudio cinético de la CuTPP con serina

Las gráficas de la figura 4.23, muestran que la adsorción de la arginina en la película de CuTPP usando el modelo de pseudo primer orden, dio una R^2 de 0.29. Como se puede ver, estos datos son muy dispersos y por tanto no siguen una tendencia lineal, descartando así un fenómeno asociado de fisisorción. Por otro lado, el análisis del modelo de pseudo segundo orden muestra que la adsorción de la arginina en la película de CuTPP sigue una tendencia lineal (R^2 de 0.96), indicando que la adsorción de la arginina en CuTPP esta asociada a una quimisorción.

En la tabla 4.11 se muestran los resultados obtenidos para la interacción de la película de CuTPP con serina. A partir de estos datos se van a comparar los pseudo ordenes de reacción, para así, conocer cuál es el que mejor describe la adsorción de la serina sobre la película de CuTPP.

Las gráficas de la figura 4.24 muestran que la adsorción de la serina en la película de CuTPP,

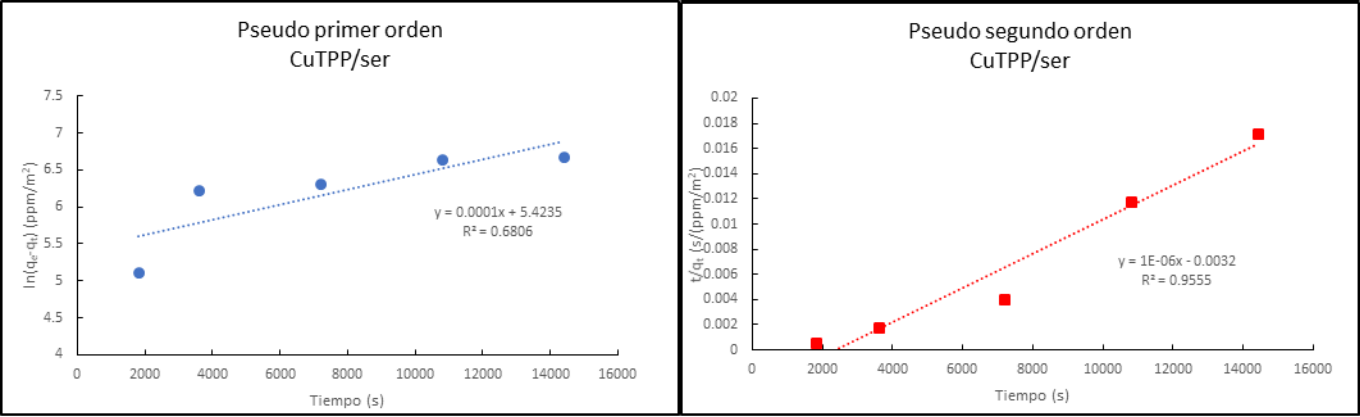


Figura 4.24: Gráficas de los pseudo ordenes de adsorción para la interacción de serina con CuTPP

	H ₂ TPP/Lisina				
Tiempo (s)	1800	3600	7200	10800	14400
Absorbancia (570 nm)	0.918	1.172	0.617	1.132	0.955
Lisina en disolución (ppm)	387.56	494.26	260.57	477.43	402.76
Lisina en película (ppm)	612.44	505.74	739.43	522.57	597.24
$\ln(q_e - q_t)$	5.96	6.20	5.56	6.17	6.00
t/q_t	0.34	0.14	0.10	0.05	0.04

Tabla 4.12: Resumen de los datos obtenidos a partir del estudio cinético de la H₂TPP con lisina usando el modelo de pseudo primer orden, dan una R² de 0.68, la cual no sigue una tendencia lineal. Por otro lado, el análisis del modelo de pseudo segundo orden si sigue una tendencia lineal (R² de 0.95), indicando que la adsorción de la serina en la película de CuTPP se da mediante una quimisorción.

4.7.2. Análisis cinético de la película de H₂TPP

En la tabla 4.12 se muestran los resultados obtenidos para la interacción de la película de H₂TPP con lisina. Con ayuda de estos datos, se construyeron las gráficas para comparar los pseudo ordenes de reacción, y así, conocer cuál es el que mejor describe la adsorción de la lisina sobre la película de H₂TPP.

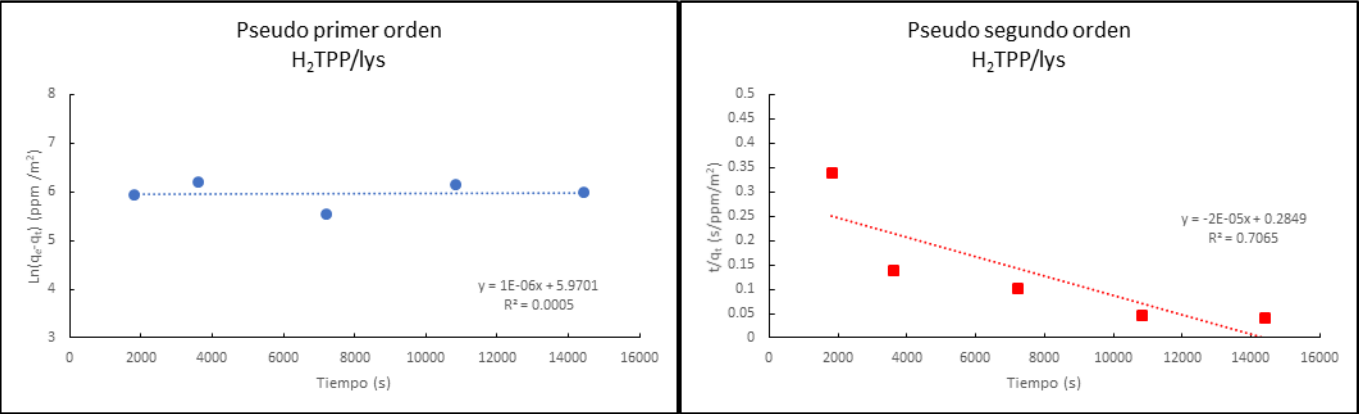


Figura 4.25: Gráficas de los pseudo ordenes de adsorción para la interacción de lisina con H₂TPP

En las gráficas de la figura 4.25 se muestran los datos de adsorción de la lisina en película de H₂TPP, la cual muestra que no se ajustan al modelo de pseudo primer orden al obtener una R² de 0.0005. Por otro lado, el modelo de pseudo segundo orden dió una R² de 0.70, indicando así que la adsorción de lisina en H₂TPP se da vía quimisorción.

	H ₂ TPP/Serina				
Tiempo (s)	1800	3600	7200	10800	14400
Absorbancia (570 nm)	0.428	1.009	0.215	0.790	0.237
Serina en disolución (ppm)	362.20	853.54	182.47	668.20	200.86
Serina en película (ppm)	637.80	146.46	817.53	331.80	799.14
ln(q _e -q _t)	5.89	6.75	5.21	6.50	5.30
t/q _t	0.0007	0.0061	0.0022	0.0081	0.0045

Tabla 4.13: Resumen de los datos obtenidos a partir del estudio cinético de la H₂TPP con serina

En la tabla 4.13 se muestran los resultados obtenidos para la interacción de la película de H₂TPP con serina. Usando estos datos, se construyeron las gráficas para comparar los pseudo ordenes de reacción.

En las gráficas de la figura 4.26 se muestran los datos de adsorción de la serina con película de

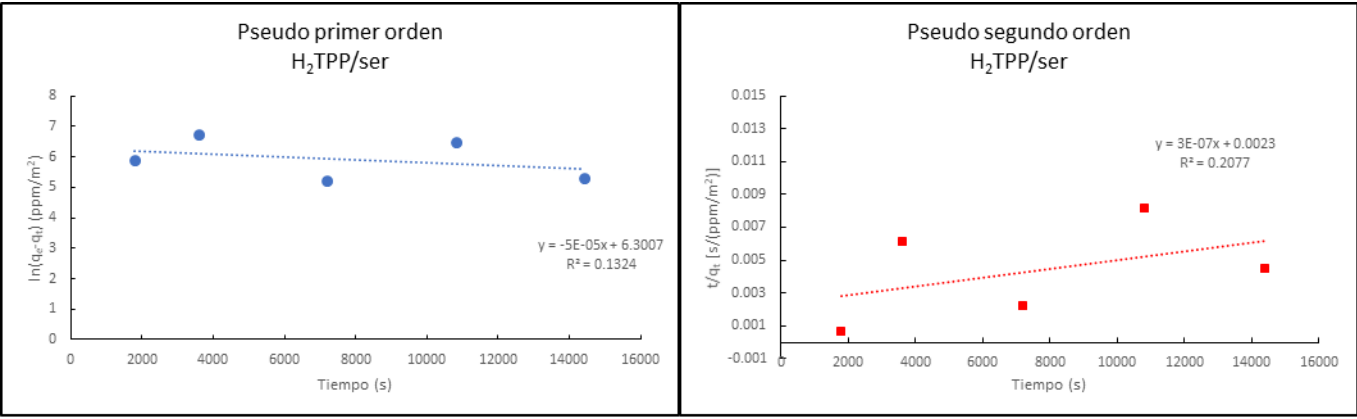


Figura 4.26: Gráficas de los pseudo ordenes de adsorción para la interacción de serina con H₂TPP

H₂TPP, la cual muestra que no se ajustan al modelo de pseudo primer orden al tener una R^2 de 0.13. Por otro lado, el modelo de pseudo segundo orden dió una R^2 de 0.20. Dados los valores tan bajos obtenidos en ambos casos, parecería que la adsorción de la serina en H₂TPP no esta favorecida cinéticamente, lo cual concuerda con lo observado en los experimentos previos.

4.7.3. Análisis cinético de la película de ZnTPP

En la tabla 4.14 se muestran los resultados obtenidos para la interacción de la película de ZnTPP con lisina, los cuales permitieron construir las gráficas para comparar los pseudo ordenes de reacción.

	ZnTPP/lisina				
Tiempo (s)	1800	3600	7200	10800	14400
Absorbancia (570 nm)	0.701	0.433	0.499	0.617	0.679
Lisina en disolución (ppm)	295.73	182.97	210.53	260.30	286.49
Lisina en película (ppm)	704.27	817.03	789.47	739.70	713.51
$\ln(q_e - q_t)$	3.61	3.13	3.27	3.48	3.58
t/q_t	0.0006	0.0011	0.0022	0.0036	0.0050

Tabla 4.14: Resumen de los datos obtenidos a partir del estudio cinético de la ZnTPP con lisina

En las gráficas de la figura 4.27 se muestran los datos de adsorción de la lisina con película de

ZnTPP, la cual muestra que no se ajustan al modelo de pseudo primer orden al tener una R^2 de 0.10. Por otro lado, el modelo de pseudo segundo orden dio una R^2 de 0.99, indicando así, que la adsorción de lisina en ZnTPP se da vía quimisorción.

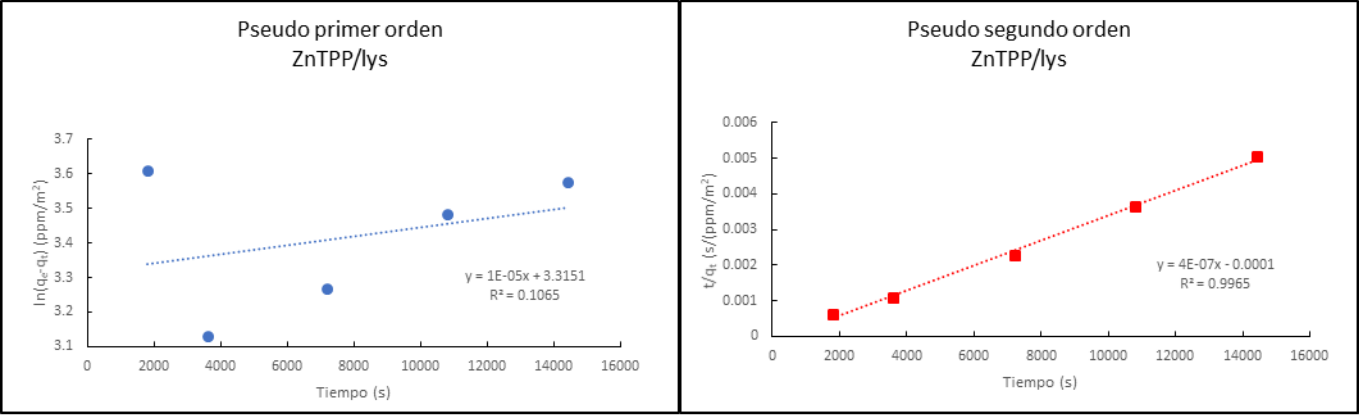


Figura 4.27: Gráficas de los pseudo ordenes de adsorción para la interacción de lisina con ZnTPP

En la tabla 4.15 se muestran los resultados obtenidos para la interacción de la película de ZnTPP con serina. Estos datos permitieron construir las gráficas para comparar los pseudo ordenes de reacción.

	ZnTPP/Serina				
Tiempo (s)	1800	3600	7200	10800	14400
Absorbancia (570 nm)	0.761	0.609	0.551	0.629	0.784
Serina en disolución (ppm)	644.19	515.30	465.95	532.35	663.72
Serina en película (ppm)	355.81	484.70	534.05	467.65	336.23
$\ln(q_e - q_t)$	6.47	6.24	6.14	6.28	6.50
t/q_t	0.0013	0.0019	0.0034	0.0058	0.0107

Tabla 4.15: Resumen de los datos obtenidos a partir del estudio cinético de la ZnTPP con serina

En las gráficas de la figura 4.28 se muestran los datos de adsorción de la serina en la película de ZnTPP. Aquí, se observa que el comportamiento no se ajusta al modelo de pseudo primer orden al obtener una R^2 de 0.03. Por otro lado, el modelo de pseudo segundo orden dió una R^2 de 0.92,

indicando que la adsorción de serina en ZnTPP se da vía quimisorción.

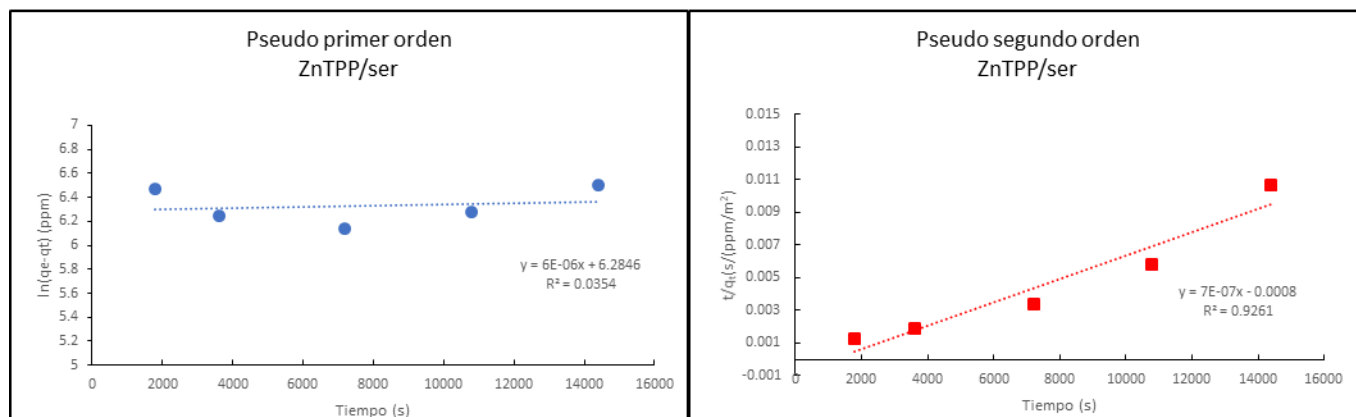


Figura 4.28: Gráficas de los pseudo ordenes de adsorción para la interacción de serina con ZnTPP

Una vez ajustados los modelos y analizando los datos obtenidos (4.16), se puede ver que de manera general, las constantes cinéticas del modelo de pseudo primer orden en el caso de arginina y lisina (aminoácidos que tuvieron una mayor tasa de adsorción sobre las películas), muestran valores de R^2 menores a 0.3, mientras que el pseudo segundo orden tiene valores de R^2 superiores a 0.7. Por otro lado, el modelo de pseudo primer orden en la serina muestra valores de R^2 por debajo de 0.2 para las películas de H_2 TPP y ZnTPP, pero un valor de R^2 de 0.68 para la película de CuTPP. Por otro lado, con el modelo de pseudo segundo orden la R^2 mostró valores por arriba de 0.9 para las películas de CuTPP y ZnTPP, pero de R^2 de 0.2 para H_2 TPP.

Estos resultados sugieren que el modelo de pseudo-segundo orden fue en general más adecuado para describir el proceso de adsorción en términos de una sorción química o quimisorción. Un aspecto interesante de estos resultados está relacionado con la pobre respuesta en términos de adsorción de la serina. Esto, corrobora la baja afinidad de esta molécula por las películas de tetrafenil porfirina. En el proceso de quimisorción, las fuerzas de valencia o el intercambio de partículas cargadas entre los aminoácidos y las moléculas de porfirina pueden posiblemente dominar las interacciones de unión.

A partir de estos resultados, notamos que el centro metálico de la porfirina desempeña un papel importante en la tasa de adsorción. Aunque los valores de R^2 revelan un ajuste deficiente de

	Pseudo primer orden			Pseudo segundo orden		
	$\ln(q_e - q_t)$	k_1 (1/s)	R^2	t/q_t [s/(ppm/m ²)]	k_2 [m ² /(ppm/s)]	R^2
CuTPP/Arg	5.7166	-0.0004	0.2901	0.0002	3.0E-7	0.9603
H2TPP/Lys	5.9701	1.0E-6	0.0005	0.2845	-2.5E-5	0.7065
ZnTPP/Lys	3.3151	1.0E-5	0.1065	0.0001	4.0E-7	0.9965
CuTPP/Ser	5.4235	0.0001	0.6806	-0.0032	1.0E-6	0.9555
H2TPP/Ser	6.3007	-5.5E-5	0.1324	0.0023	3.0E-7	0.2077
ZnTPP/Ser	6.2846	6.0E-6	0.0354	0.0008	7.0E-7	0.9261

Tabla 4.16: Resumen de las constantes cinéticas para las interacciones de las películas de pofirina con arginina, lisina y serina

pseudo primer orden para los aminoácidos cargados positivamente, el valor de la constante k_1 de la tasa de adsorción más alta a más baja mostró una tendencia $Zn > H_2 > Cu$. La constante de pseudo segundo orden k_2 exhibió una tendencia $Zn > Cu > H_2$. El orden para las constantes de velocidad se atribuyó a la presencia del centro metálico. Por otro lado, dado que la serina es el aminoácido menos adsorbido en las tres superficies, la tendencia de adsorción fue la misma para los modelos de pseudo primer orden (k_1) y pseudo segundo orden (k_2), esto es, $Cu > Zn > H_2$. Por lo tanto, la presencia del centro metálico favorece la quimisorción de segundo orden en todos los casos.

4.8. Microbalanza de cuarzo

Gracias a la gran sensibilidad que presenta como respuesta a cambios de masa del orden de nanogramos, la técnica de la microbalanza de cuarzo sirve para seguir la evolución en el tiempo del fenómeno de adsorción. En este caso, se utilizaron los aminoácidos que mostraron la mayor y la menor adsorción en las películas, siendo la arginina y serina para la CuTPP, mientras que para la H₂TPP y ZnTPP fueron la lisina y serina en ambos casos.

4.8.1. Evolución temporal de la adsorción en la película de CuTPP

A partir de los datos obtenidos con la microbalanza, se construyó la gráfica 4.29, en donde se muestra la absorción del buffer, arginina y serina en función del tiempo sobre la película de CuTPP

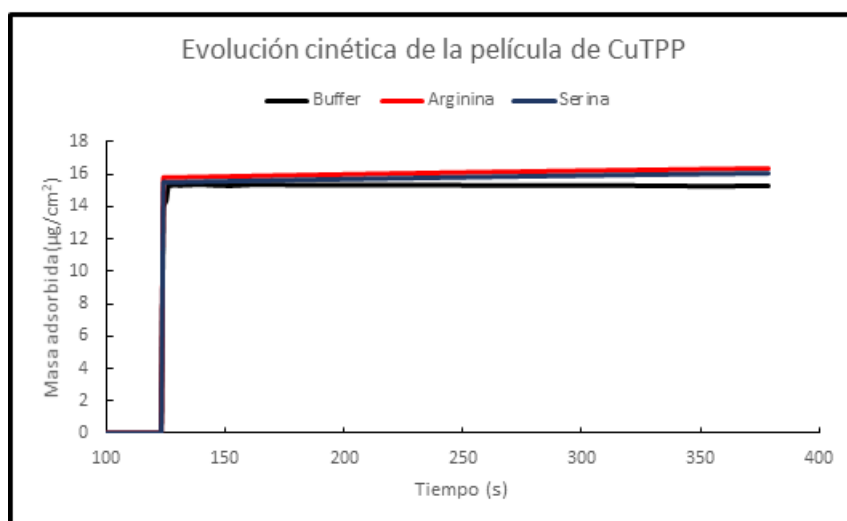


Figura 4.29: Gráfica que presenta el comportamiento de la adsorción de arginina y serina en la película de CuTPP

en un intervalo de 0 a 3600 s. Como se puede ver en la gráfica, la región lineal entre 0 y 120 s correspondió al tiempo de estabilización de la oscilación de sensor. Justo a las 120 s, se observa un aumento significativo de masa que corresponde al momento de la inyección de la disolución buffer sola y con el aminoácido en la cavidad de medición. Es por ello, que en la gráfica 4.29 sólo se analizan los primeros 400 segundos de la interacción. Después de este tiempo, la respuesta que se observa corresponde a los cambios de masa sobre el sensor debido a la adsorción de las moléculas. Es interesante notar que la masa del buffer sobre el sensor no cambia con el tiempo, lo que asegura que no hay una contribución en masa de esta solución que modifique los cambios debidos a la adsorción de los aminoácidos.

Así entonces, si se elimina de la gráfica el tiempo de estabilización y se hace un análisis por mínimos cuadrados sólo al comportamiento de la adsorción sobre la superficie, se obtiene la gráfica 4.30. Aquí, se puede observar y se confirma que la arginina es el aminoácido que más se adsorbe en la película. Además, la adsorción que presenta tiene un comportamiento lineal creciente durante los primeros 400 s. Por otro lado, la serina mostró la misma tendencia lineal pero a menores valores de masa, como se puede ver en la tabla 4.17.

Para tener una mejor idea del comportamiento de la adsorción de los aminoácidos en la película de CuTPP, los datos se graficaron en forma de barras como se ve en la figura 4.31. En esta re-

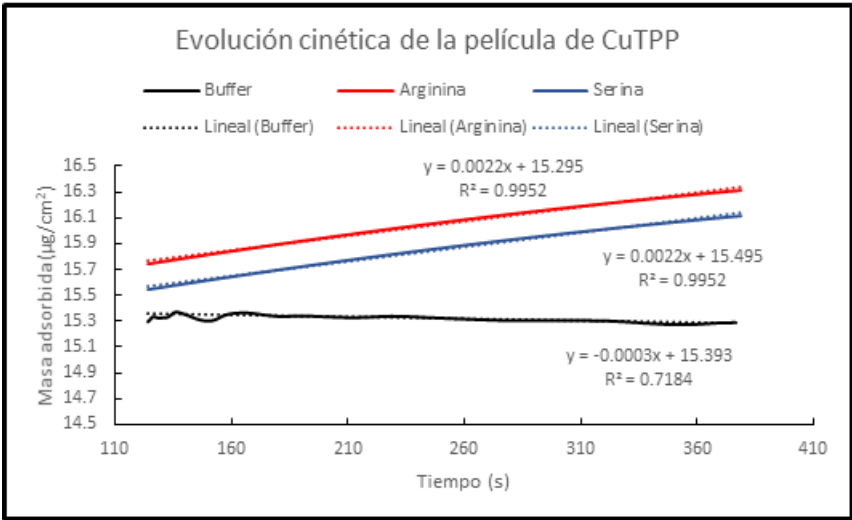


Figura 4.30: Gráfica con los cambios en masa absorbida de las disoluciones de arginina y serina en la película de CuTPP

CuTPP	m	R ²
Buffer	-0.0003	0.72
Arginina	0.0022	0.99
Serina	0.0022	0.99

Tabla 4.17: Resumen del análisis de mínimos cuadrados para los primeros 400 s de la adsorción de los aminoácidos en la película de CuTPP

presentación, el tiempo se cambio a minutos, y se hicieron intervalos cada 5 minutos para poder observar el comportamiento a lo largo de una hora.

Observando el comportamiento de la adsorción de los aminoácidos al minuto 25, se llega a un primer máximo de adsorción para ambos aminoácidos. A partir de ese momento, comienza un fenómeno de adsorción y desorción que oscila entre los 16.4 y 16.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, indicando que se llego al equilibrio cinético después de los primeros 25 minutos de haber comenzado el experimento.

Para finalizar el análisis, en la Tabla 4.18 se muestra el dato la masa adsorbida a los 2000 s considerando la estabilidad de los sistemas a ese tiempo. Se hizo la diferencia entre estos valores y el valor en masa del buffer, lo que dió como resultado un exceso de masa de 1.35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la arginina y uno de 1.15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la serina. Lo anterior, confirma que se adsorbe en mayor cantidad la arginina frente a la serina en el caso de la película de CuTPP.

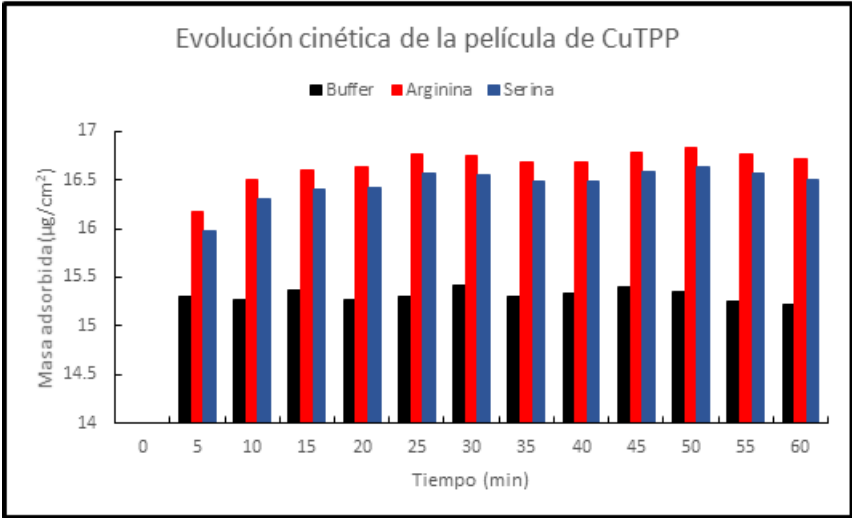


Figura 4.31: Gráfica con la evolución temporal de la adsorción de aminoácidos sobre la película de CuTPP

CuTPP	T= 2000 s µg/cm ²	Dif (µg /cm ²)
Buffer	15.36	N/A
Arginina	16.71	1.35
Serina	16.51	1.15

Tabla 4.18: Cambio en masa que presentan las disoluciones de buffer, arginina y serina al ponerse en contacto con la película de CuTPP a los 2000 s de interacción

4.8.2. Evolución temporal de la adsorción en la película de H₂TPP

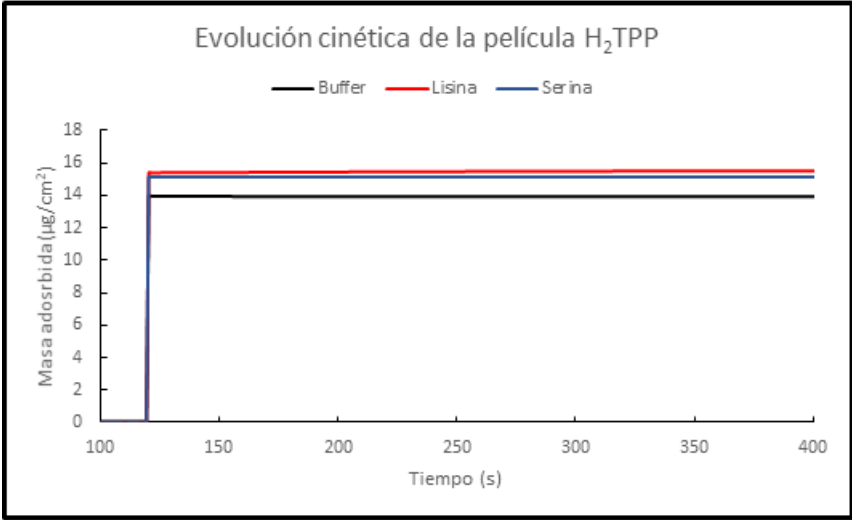


Figura 4.32: Comportamiento de la adsorción de lisina y serina en la película de H₂TPP

Siguiendo el mismo procedimiento que en el caso de la película de cobre, partir de los datos obte-

nidos con la microbalanza se construyó la gráfica 4.32. Aquí, se muestra la absorción de lisina y serina en función del tiempo sobre la película de H₂TPP. El seguimiento total se hizo por 3600 s, sin embargo, en la gráfica 4.32 sólo se analizan los primeros 400 segundos, en donde los primeros 120 s se emplearon para estabilizar el sistema. Justo a los 120 s, se inyectaron las disoluciones buffer y el buffer con aminoácidos. Después de este punto es más fácil distinguir que el mayor aumento pertenece a la disolución con lisina, seguido por la serina, dejando como valor de referencia el buffer ya que no cambia su masa adsorbida con el tiempo.

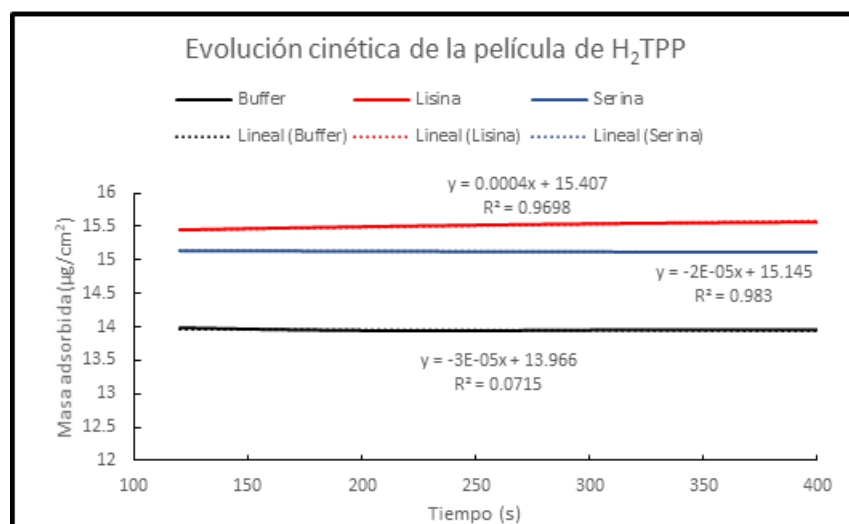


Figura 4.33: Cambios de masa adsorbida de las disoluciones de lisina y serina en la película de H₂TPP

Si se elimina de la gráfica el tiempo de estabilización, se hace un análisis por mínimos cuadrados y se pone atención en el comportamiento de la adsorción sobre la superficie, se obtiene la gráfica 4.33. En ésta, se puede observar y confirmar que la lisina es el aminoácido que más se adsorbe en la película. Además, la adsorción tiene un comportamiento lineal durante los primeros 400 s. Por otro lado, la serina mostró la misma tendencia lineal, pero con una menor pendiente y una menor cantidad de masa. Estos datos están resumidos en la tabla 4.19.

Para tener una mejor idea del comportamiento de la adsorción de los aminoácidos en la película de H₂TPP, se realizó la gráfica 4.34 en forma de barras, cuyo período temporal se tomó cada 5 minutos para poder observar el comportamiento a lo largo de una hora.

H ₂ TPP	m	R ²
Buffer	-0.00005	0.07
Lisina	0.0004	0.97
Serina	-0.00002	0.98

Tabla 4.19: Resumen del análisis de mínimos cuadrados para los primeros 400 s de la adsorción de los aminoácidos en la película de H₂TPP

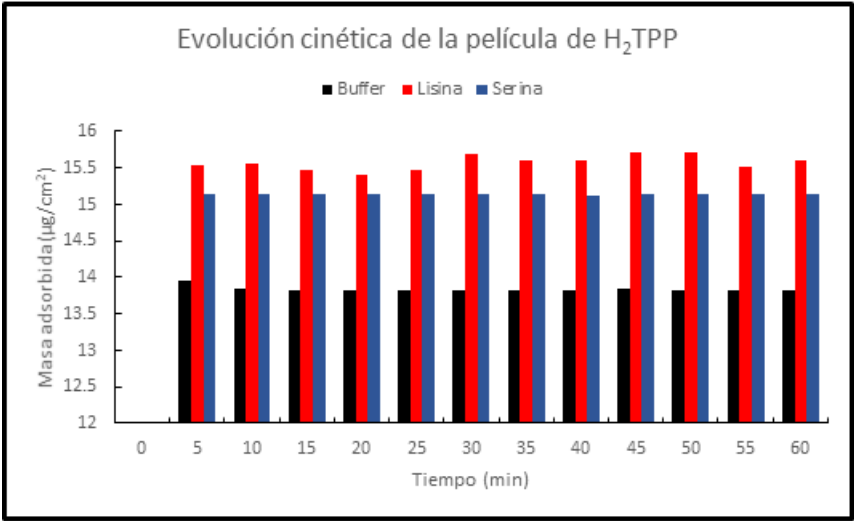


Figura 4.34: Evolución temporal de la adsorción de la lisina y serina sobre la película de H₂TPP

Observando el comportamiento de la adsorción de los aminoácidos al minuto 30, se llega a un primer máximo de adsorción para la lisina. A partir de ese momento, comienza un fenómeno de adsorción y desorción que oscila alrededor de los $15.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, indicando que se llegó a un equilibrio cinético. Por otro lado, la serina llega a un valor de $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ desde el principio y se mantiene constante, mostrando así que llegó más rápido al equilibrio cinético. Ya que la adsorción completa se dio en los primeros minutos de interacción, después ya no hubo un aumento significativo en la adsorción a lo largo del tiempo. Por otro lado, el comportamiento del buffer a lo largo del experimento indica una falta de adsorción en la superficie como en el caso anterior.

H ₂ TPP	T= 2000 s $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Dif ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
Buffer	13.83	N/A
Lisina	15.61	1.78
Serina	15.12	1.29

Tabla 4.20: Cambio en masa que presentan las disoluciones de buffer, lisina y serina al ponerse en contacto con la película de H₂TPP a los 2000 s de interacción.

Para finalizar el análisis, en la tabla 4.20 se muestra el dato de la masa adsorbida a los 2000 s. Tomando el valor de masa de los datos y restando el valor en masa del buffer, se tiene un exceso de masa de $1.78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la lisina y de $1.29 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la serina. Lo anterior, confirma que se adsorbe en mayor cantidad la lisina frente a la serina en el caso de la película de H_2TPP .

4.8.3. Evolución temporal de la adsorción en la película de ZnTPP

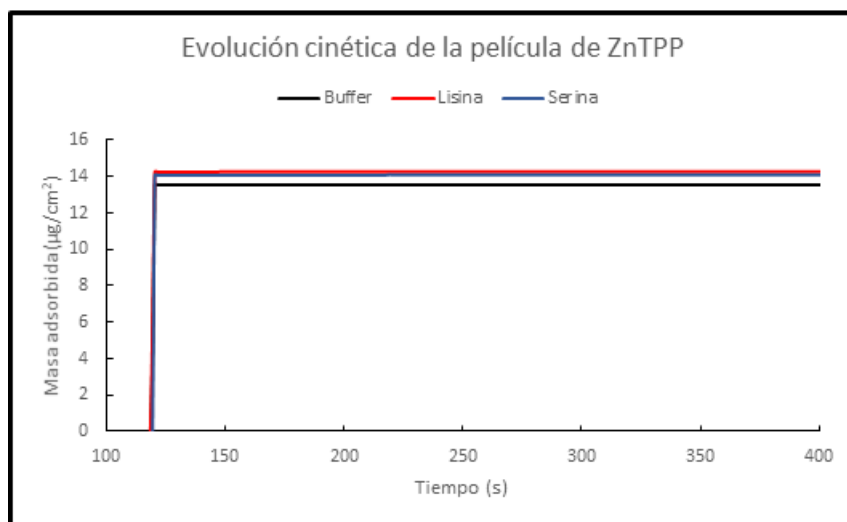


Figura 4.35: Comportamiento de la adsorción de lisina y serina en la película de ZnTPP

Siguiendo los mismos procedimientos que en los dos casos anteriores, a partir de los datos obtenidos con la microbalanza se construyó la gráfica 4.35. Aquí, se muestra la absorción de lisina y serina en función del tiempo sobre la película de ZnTPP a lo largo de 3600 s. Sin embargo, en la gráfica 4.35, sólo se analizan los primeros 400 segundos, en donde los primeros 120 s, se emplearon para estabilizar el sistema. Justo a los 120 s, se inyectaron las disoluciones buffer y el buffer con aminoácidos. Después de este punto es más fácil distinguir que el mayor aumento pertenece a la disolución de lisina, seguido por la serina, dejando como valor de referencia el buffer, que como en los casos anteriores, no presenta adsorción y su respuesta es constante en el tiempo.

Después de eliminar de la gráfica el tiempo de estabilización, se repitió el análisis por mínimos cuadrados y se puso atención en el comportamiento de la adsorción sobre la superficie. En la gráfica 4.36, se puede observar y confirmar que la lisina es el aminoácido que más se adsorbe en la película seguido de la serina y luego el buffer, que permanece constante a lo largo del experimento. Cabe señalar que el análisis por mínimos cuadrados muestra que el comportamiento de adsorción no

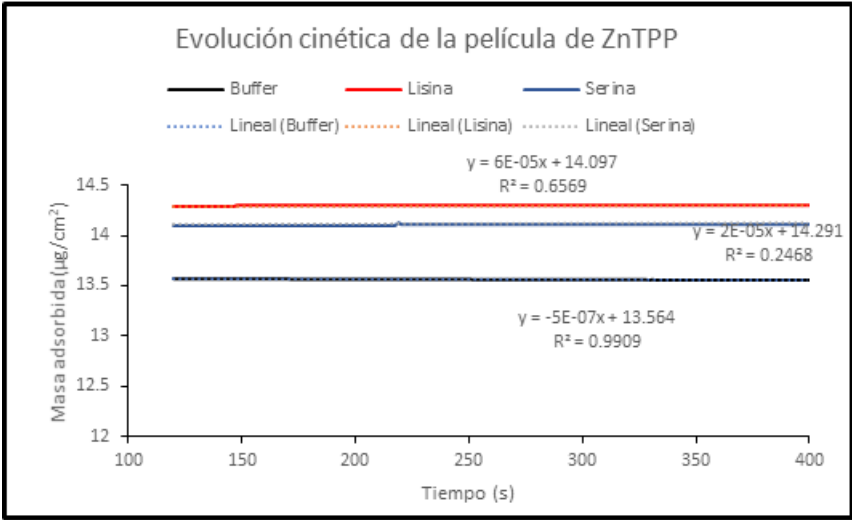


Figura 4.36: Cambios de masa adsorbida de las disoluciones de lisina y serina en la película de ZnTPP

sigue un proceso lineal durante los primeros 400 s. Estos datos están resumidos en la tabla 4.21.

H ₂ TPP	m	R ²
Buffer	-5.0E-07	0.99
Lisina	6.0E-05	0.66
Serina	2.0E-05	0.25

Tabla 4.21: Resumen del análisis de mínimos cuadrados para los primeros 400 s de la adsorción de los aminoácidos en la película de ZnTPP

Para tener una mejor idea del comportamiento de la adsorción de los aminoácidos en la película de ZnTPP se construyó la gráfica 4.37 en forma de barras, en donde el tiempo se cambió a intervalos de 5 minutos para poder observar el comportamiento a lo largo de una hora.

Observando el comportamiento de la adsorción de los aminoácidos después de que se inyectaron en el sistema de medición, tanto la lisina como la serina se nota que alcanzaron un equilibrio cinético quedando en $14.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en masa adsorbida para la lisina y $14.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la serina. Ambos valores se mantienen constantes a lo largo del experimento.

Para finalizar el análisis, en la tabla 4.22, se calculó el dato de la masa adsorbida por aminoácido a los 2000 s tomando el valor de masa de los datos y restando el valor de la masa del buffer. De esta diferencia, se tienen $0.72 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la lisina y $0.54 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la serina, confirmando que

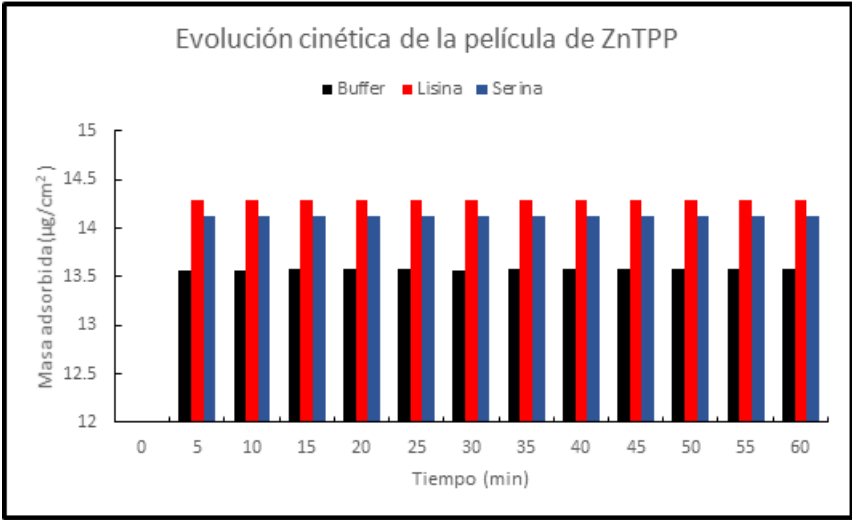


Figura 4.37: Evolución temporal de la adsorción de lisina y serina sobre la película de ZnTPP

ZnTPP	T= 2000 s µg/cm ²	Dif (µg /cm ²)
Buffer	13.58	N/A
Lisina	14.30	0.72
Serina	14.12	0.54

Tabla 4.22: Cambio en masa que presentan las disoluciones de buffer, lisina y serina al ponerse en contacto con la película de ZnTPP a 2000 s de interacción.

se adsorbe en mayor cantidad la lisina frente a la serina en el caso de la película de ZnTPP.

Gracias a los datos obtenidos con estos experimentos se confirmó que la lisina y la arginina son los aminoácidos que más se adsorben en las películas, mientras que la serina es el que menos de adsorbe en todos los casos. Por otro lado, se pudo observar que la película de CuTPP tarda 25 minutos para que se llegue a un equilibrio cinético tanto para la lisina, como para la serina. En el caso de la película de H₂TPP, a la lisina le toma 30 minutos llegar al equilibrio cinético, mientras que la serina llega al equilibrio prácticamente después de que se inyectó la muestra. Por último, para la película ZnTPP, ambos aminoácidos llegan al equilibrio prácticamente después de estar en contacto con la película.

Cabe aclarar que la metodología de este experimento se basa en la inyección de alícuotas de 1 mL de disolución que era la capacidad máxima de volumen de la celda de fluidos de la microbalanza.

Lo anterior, pudo dar lugar a los cambios pequeños de masa obtenidos en los experimentos. Otro aspecto a considerar es que las mediciones se hicieron en un medio estático, lo que ocasiona que las gráficas muestren comportamientos de equilibrio a ciertos tiempos después de la inyección de las soluciones. Adicionalmente, hay que tomar en cuenta que el área efectiva de adsorción fue 0.78 cm^2 , que es el área activa del sensor que ocupa un círculo de 1 cm de diámetro en el centro de la celda. Así entonces, aunque los valores de adsorción parecen pequeños debidos a los bajos volúmenes y áreas de trabajo del experimento, los cambios observados muestran una clara tendencia de adsorción que va acorde a los experimentos previos de este trabajo.

4.9. Ángulo de contacto

En este experimento, no sólo se estudió el mojado de las soluciones de aminoácido en las superficies, sino también, el ángulo de contacto del buffer de fosfatos, para poder comparar la influencia del aminoácido en el comportamiento del ángulo de contacto con las diversas superficies.

Ángulos de contacto para la CuTPP

Derivado del análisis de la figura 4.38, de manera general, se puede decir que todos los ángulos de contacto son menores de 90° . Lo anterior, indica que hay un comportamiento hidrofílico en la interacción de los aminoácidos con la película. Sin embargo, al comparar los valores de los ángulos de los aminoácidos entre sí y con el del buffer, se puede ver que la presencia de los aminoácidos aumenta la hidrofobicidad de la interacción con la superficie. Además, estos ángulos se mantuvieron constantes durante el tiempo que duro el experimento (60 s). En la figura 4.38, se muestran los ángulos de contacto obtenidos para la superficie de CuTPP. El ángulo de contacto inicial para el buffer fue de 67° , mientras que los ángulos para arginina, glicina, glutamato, lisina y serina fueron 85° , 76° , 82° , 83° y 72° , respectivamente.

De la figura 4.38, la arginina mostró el mayor ángulo de contacto, lo que sugiere que la solución con arginina tiene características más hidrófobas. Por otro lado, la serina exhibió el ángulo de contacto más bajo, indicando una mayor afinidad con la superficie. El ángulo de contacto de los otros aminoácidos permaneció en el intervalo de $67\text{--}85^\circ$.

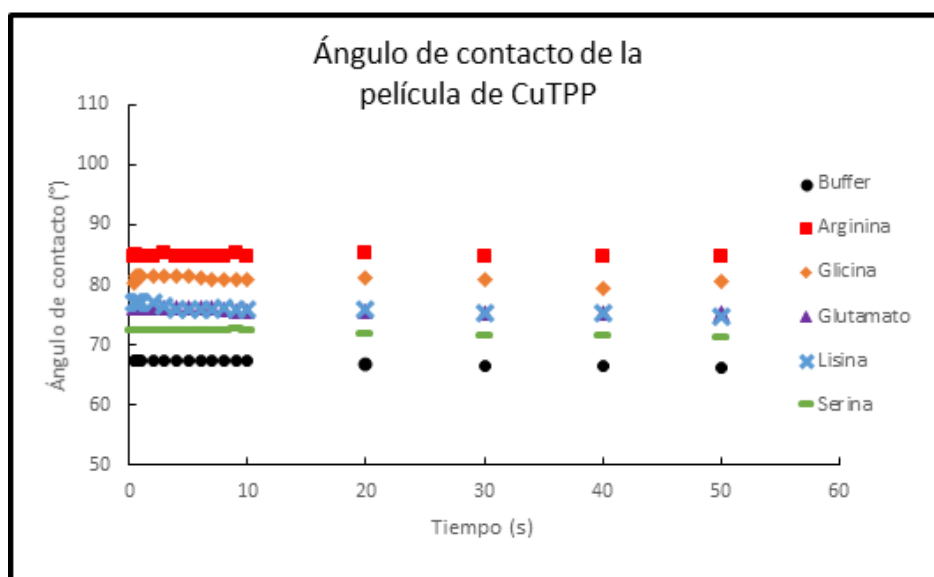


Figura 4.38: Gráfica de los ángulos de contacto sobre la película de CuTPP

Ángulos de contacto para la H₂TPP

Los ángulos de las disoluciones de aminoácidos obtenidos sobre la película de H₂TPP se muestran en la figura 4.39. Aquí, todas las interacciones presentan decaimientos de tipo exponencial. En general, sin tomar en cuenta el buffer, el mayor ángulo de contacto es para la serina y el más bajo para lisina a tiempos más largos. Sin embargo, para tener una mejor idea del comportamiento de los ángulos de contacto se hizo un ajuste a los datos experimentales.

El ajuste exponencial a los ángulos de ángulo de contacto sobre la superficie libre de metal se observa en la figura 4.40. Se ajustó una ecuación de la forma:

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t}$$

en donde A_t corresponde al ángulo de contacto en el tiempo t , A_0 es el valor del ángulo al $t = 0$ y λ es la constante de decaimiento. Los parámetros de los ajustes encontrados para cada aminoácido se muestran en la tabla 4.23, En el caso del buffer, se obtuvo un ángulo de contacto inicial de 74 °, mientras que los ángulos para arginina, glicina, glutamato, lisina y serina fueron 63 °, 72 °, 69 °, 68 ° y 71 °, respectivamente. Además, se muestra la constante λ , la cual indica la velocidad con

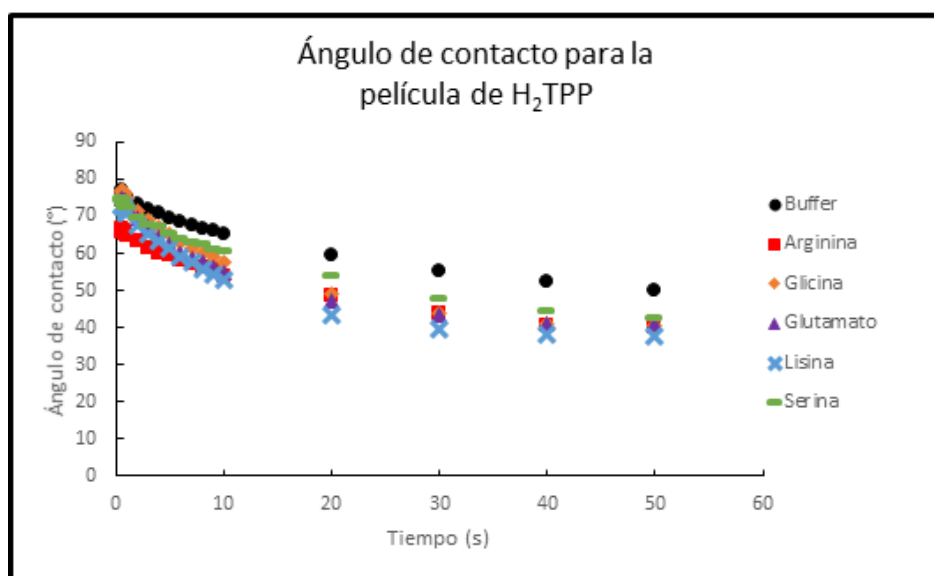


Figura 4.39: Gráfica de los ángulos de contacto sobre la película de H₂TPP

la que decae el ángulo de contacto con respecto al tiempo.

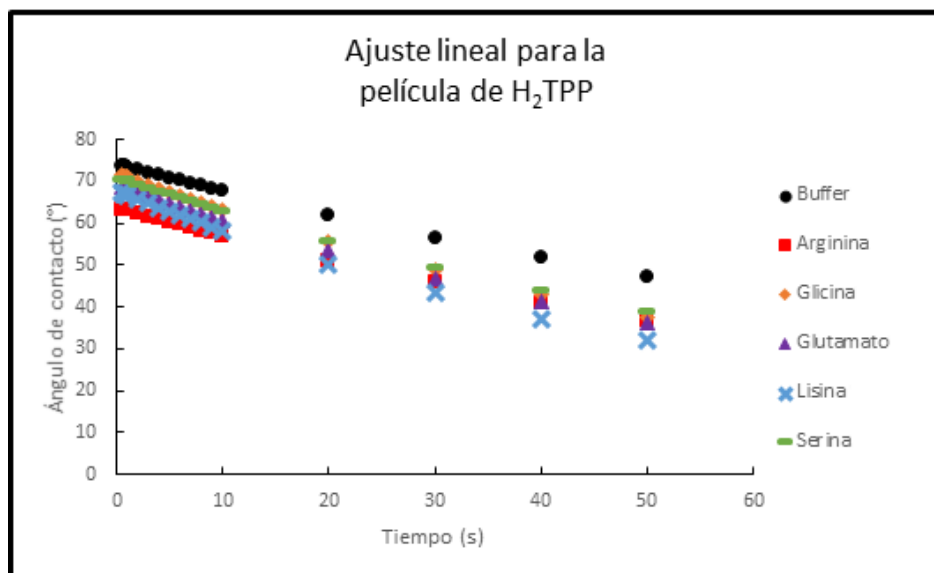


Figura 4.40: Gráfica del ajuste exponencial para los ángulos de contacto sobre la película H₂TPP

De la figura 4.40, lo primero que resalta es que a diferencia del comportamiento que tuvo la película de CuTPP, todas las disoluciones tienen un ángulo menor al mostrado por el buffer, indicando que la presencia de los aminoácidos abate la energía superficial, haciendo que la interacción con la película de H₂TPP sea más hidrofílica en presencia de los aminoácidos. Por otro lado, la lisina mostró el mayor ángulo de contacto, lo que sugiere que la adsorción de la lisina provocó el menor cambio en la energía superficial, mientras que la serina exhibió el ángulo de contacto más bajo,

indicando que es más a fin a la superficie libre de metal.

	H ₂ TPP		
	A ₀ (°)	λ	R ²
Buffer	74	0.009	0.94
Arginina	63	0.011	0.93
Glicina	72	0.014	0.89
Glutamato	69	0.013	0.85
Lisina	68	0.015	0.87
Serina	71	0.012	0.94

Tabla 4.23: Resumen del análisis lineal de los ángulos de contacto sobre la película de H₂TPP

Ángulos de contacto para la ZnTPP

Los ángulos de las disoluciones de aminoácidos obtenidos para la película de ZnTPP, se muestran en la figura 4.41. Aquí, todos los sistemas presentan un decaimiento tipo exponencial. En general, sin tomar en cuenta el buffer, el mayor ángulo de contacto es para la lisina y el más bajo para la serina a tiempos más largos. Sin embargo, para tener una mejor idea del comportamiento de los ángulos de contacto se hizo un ajuste a los datos experimentales como en el caso anterior.

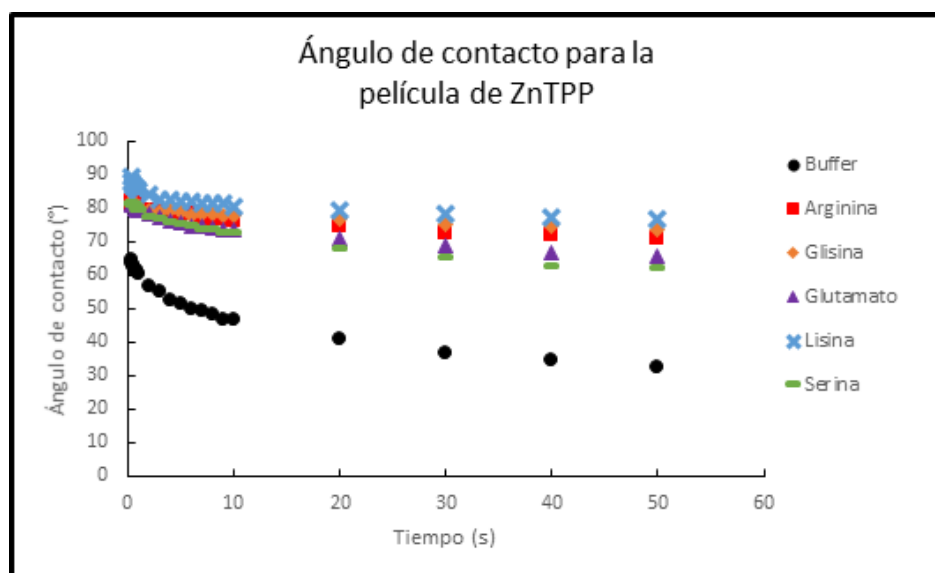


Figura 4.41: Gráfica de los ángulos de contacto sobre la película de ZnTPP

A partir de la gráfica de la figura 4.42, se construyó la tabla 4.24 en dónde se resumen los ángulos de contacto iniciales para todos los sistemas. En el caso del buffer, se obtuvo un ángulo de contacto

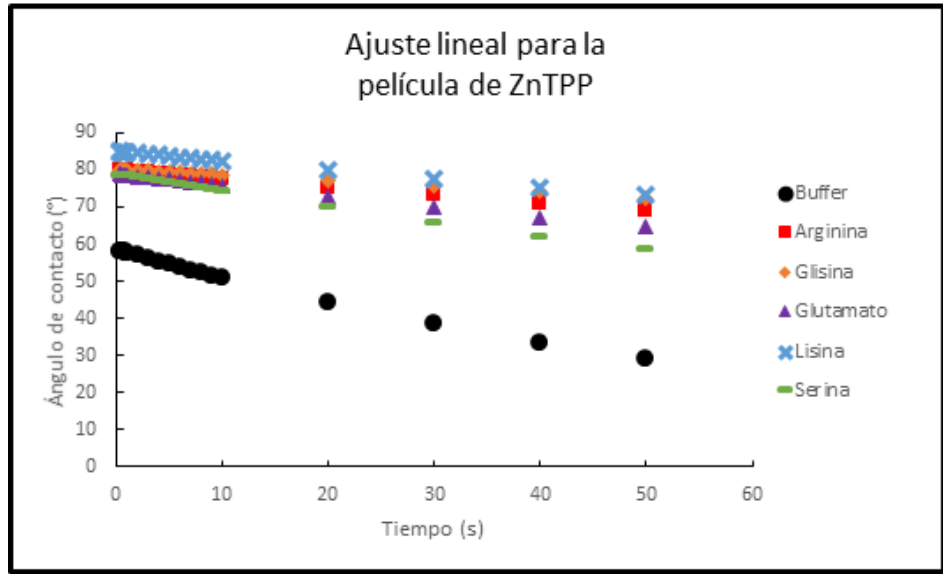


Figura 4.42: Gráfica del ajuste lineal para los ángulos de contacto sobre las películas de ZnTPP

inicial de 59 °, mientras que los ángulos para arginina, glicina, glutamato, lisina y serina fueron 80 °, 80 °, 79 °, 85 ° y 79°, respectivamente. Además, se muestra la constante λ , la cual indica la velocidad con la que decae el ángulo de contacto con respecto al tiempo.

ZnTPP			
	A_0 (°)	λ	R^2
Buffer	59	0.014	0.87
Arginina	80	0.003	0.86
Glicina	80	0.002	0.85
Glutamato	79	0.004	0.86
Lisina	85	0.003	0.72
Serina	79	0.006	0.91

Tabla 4.24: Resumen de los parámetros de la regresión a los datos de los ángulos de contacto sobre la película de ZnTPP

De la figura 4.42, lo primero que resalta es que se repite el comportamiento que tuvo la película de CuTPP, en dónde todos los sistemas tienen un ángulo mayor al mostrado por el buffer. Lo anterior, sugiere que las películas que tienen un centro metálico en presencia de un aminoácido en disolución, exhiben comportamientos más hidrofóbicos. Por ejemplo, la lisina mostró el mayor ángulo de contacto. Por otro lado, la serina exhibió el ángulo de contacto más bajo, indicando una mayor afinidad a la superficie.

4.10. Cálculos usando la teoría de funcionales de la densidad (DFT)

4.10.1. Estudio DFT para el sistema CuTPP

Para comprender los resultados experimentales, se utilizó la teoría de funcional de la densidad para investigar las geometrías optimizadas y energías de enlace para cada Tetrafenil porfirina (Cu, H₂ y Zn) con la molécula de aminoácido más y menos absorbida, respectivamente. Al inicio de las simulaciones, se optimizaron las geometrías de todas las moléculas por separado, y posteriormente, se pusieron a interaccionar entre sí. Las optimizaciones y cálculos de energía se obtuvieron usando el programa Gaussian con el funcional DFT B3LYP/6-31g (d) para todos los sistemas, ya que se ha observado que esta base presenta buenos resultados para moléculas similares de acuerdo con datos experimentales [31].

En todos los casos, se partió de al menos 3 diferentes configuraciones iniciales y se analizaron las geometrías de menor energía. En el arreglo más estable, se determinó la geometría de interacción, la energía de enlace, así como los sitios de adsorción preferenciales. Cabe señalar que para estos estudios, las simulaciones se realizaron en agua, ya que la interacción experimental se dio en presencia del buffer.

En la figura 4.43, se muestra la interacción entre la molécula de CuTPP con la arginina. De la imagen, se puede ver que existen interacciones de hidrógeno entre los nitrógenos del macrociclo con los hidrógenos del grupo guanidinio de la arginina. En el lado opuesto del aminoácido, existe una interacción entre el hidrógeno del carbono alfa y uno de los hidrógenos del grupo lateral fenilo de la CuTPP. Estas interacciones provocan una importante deformación de la molécula de porfirina.

Por otro lado, en la figura 4.44 se observa que la serina exhibe una interacción de enlace de hidrógeno con un átomo de nitrógeno del macrociclo, mientras que uno de los oxígenos del grupo carboxilo interactúa con un hidrógeno del grupo lateral fenilo. Estas interacciones afectan poco la planaridad del macrociclo de la porfirina, así como la posición de los anillos laterales.

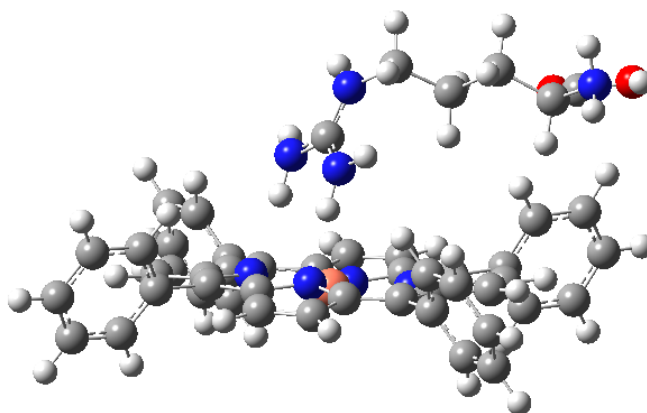


Figura 4.43: Optimización geométrica para la interacción entre una molécula de CuTPP con una molécula de arginina

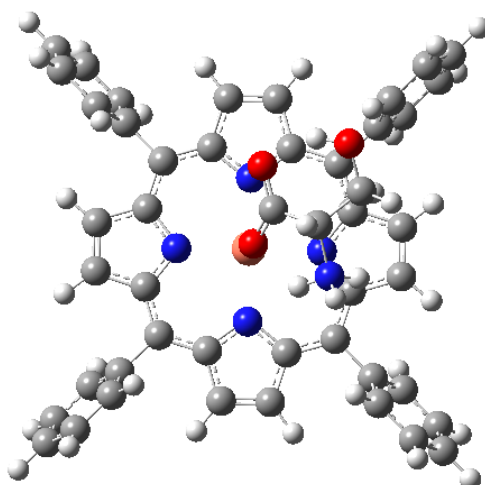


Figura 4.44: Optimización geométrica para la interacción entre una molécula de CuTPP con una molécula de serina

4.10.2. Estudio DFT para la H₂TPP

La geometría de optimización de la tetrafenil porfirina libre de metal con lisina muestra una importante interacción de la cadena lateral del aminoácido con el macrociclo de la porfirina. En la figura 4.45, el grupo -NH^{3+} se desprotona y el átomo de hidrógeno se une a uno de los átomos de nitrógeno solitarios (22 o 24 por la nomenclatura IUPAC) del anillo. Esto hace que el macrociclo de porfirina se alinee con las posiciones N-H del núcleo apuntando hacia abajo, mientras que los lados opuestos apuntan hacia arriba. En esta configuración, los grupos funcionales amina y carboxilo de la lisina apuntan hacia arriba en dirección opuesta a la molécula de porfirina.

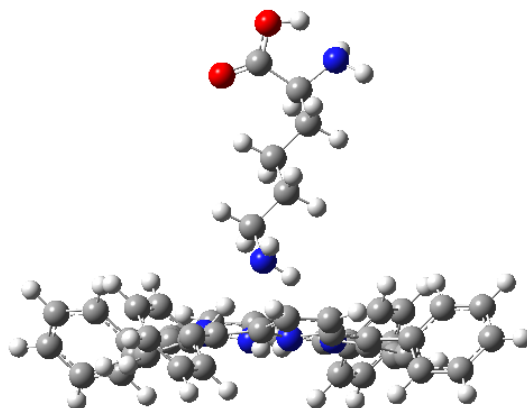


Figura 4.45: Optimización geométrica para la interacción entre una molécula de H_2TPP con una molécula de lisina

Para la interacción de la H_2TPP y serina (figura 4.46), se observó una doble interacción entre los hidrógenos del grupo amina y el carbono alfa del aminoácido con los dos átomos de nitrógeno (posiciones 22 y 24) del núcleo de la porfirina. Por otro lado, el extremo de la cadena lateral exhibe una interacción de enlace de hidrógeno entre el oxígeno del grupo OH del aminoácido y un hidrógeno del grupo lateral fenilo. Debido a estas interacciones, se observa un ligero efecto de ensillado de menos de 0.15 nm entre el centro y el borde del núcleo de la porfirina.

4.10.3. Estudio DFT para la $ZnTPP$

La interacción de la molécula $ZnTPP$ con lisina y serina mostró un desplazamiento del Zn fuera de la configuración plana de la porfirina en menos de 0.04 nm. En ambos casos, la atracción principal es con el átomo de oxígeno desprotonado del grupo carboxílico. Por otro lado, debido a la longitud de la cadena lateral de la lisina, ésta apunta hacia arriba y entre dos grupos laterales de fenilo sin ninguna otra interacción. Así mismo, se observa una configuración diferente para la serina debido a su menor tamaño, ya que el oxígeno del grupo carboxilo interactúa con un átomo de hidrógeno de uno de los grupos laterales fenilo. En ambos casos, aunque los átomos de zinc exhibieron cierto desplazamiento de la configuración plana, el resto de moléculas no presenta ninguna otra modificación aparente de su configuración de mínima energía.

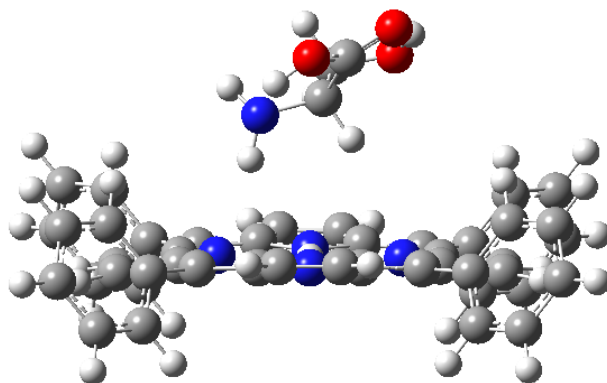


Figura 4.46: Optimización geométrica para la interacción entre una molécula de H_2TPP con una molécula de serina

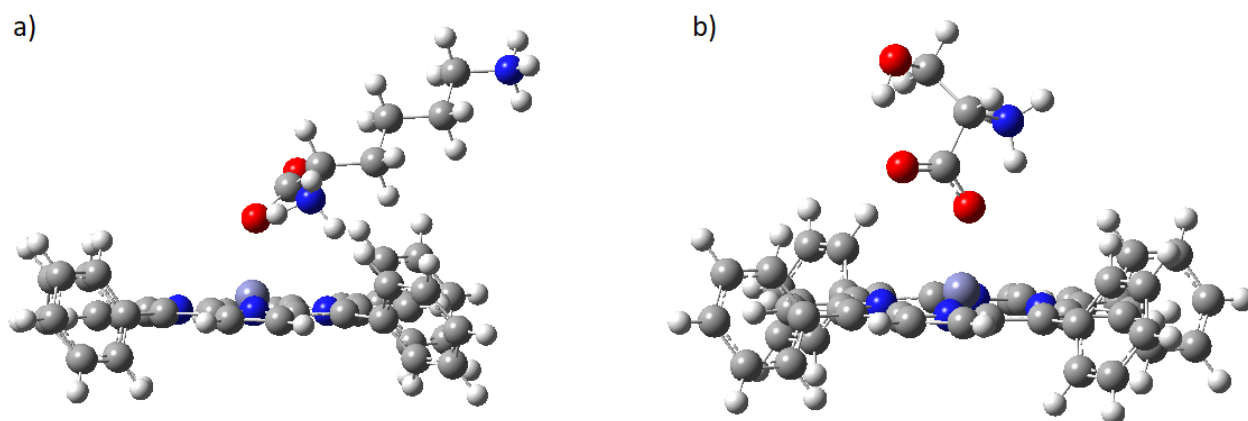


Figura 4.47: Optimizaciones geométricas para la interacción entre una molécula de $ZnTPP$ con a) lisina y b) serina.

En la tabla 4.25, se puede ver que las interacciones más fuertes fueron para el sistema H_2TPP/Lys , seguido de $ZnTPP/lys$ y $CuTPP/Arg$. Por otro lado, en todos los casos, la serina mostró la energía de unión más baja en comparación con los aminoácidos cargados positivamente en todas las superficies. Vale la pena notar que la energía para el sistema $ZnTPP/Ser$ es positiva, y sugiere una interacción inestable, lo que apoya la baja afinidad de esta molécula por las películas de porfirina, en particular, las que están coordinadas a un átomo de zinc.

Sistema de interacción	Energía de enlace kJ/mol
CuTPP/Arg	-93.57
CuTPP/Ser	-16.60
H ₂ TPP/Lys	-458.66
H ₂ TPP/Ser	-251.08
ZnTPP/Lys	-143.80
ZnTPP/Ser	192.90

Tabla 4.25: Energías de enlace calculadas para todos los sistemas utilizando el conjunto de bases B3LYP/ 6-31 (d)

Finalmente, las configuraciones optimizadas de las interacciones exhibieron estados de coordinación con los átomos metálicos, mientras que la molécula de H₂TPP interactúa principalmente a través de los átomos internos del macrociclo de la porfirina. A partir de estos resultados, queda claro que el átomo metálico central de la porfirina influye en la respuesta de interacción de las moléculas de aminoácidos en términos de su cadena lateral o grupos R, y por tanto, son elementos prometedores para la detección de aminoácidos.

Capítulo 5

Conclusiones

Se emplearon películas de tetrafenil porfirina de cobre, zinc y sin centro metálico para investigar la interacción entre sus superficies y diferentes tipos de aminoácidos.

La cuantificación de la cantidad de aminoácido adsorbido sobre las películas se realizó con la técnica del púrpura de Ruhemann. Los resultados mostraron que se favoreció la adsorción de compuestos cargados, en particular aminoácidos catiónicos como la arginina para la película de CuTPP, y la lisina para las de H₂TPP y ZnTPP. Por otro lado, la serina (que es un aminoácido polar), mostró la menor afinidad para ser adsorbido en las tres superficies.

La película que más aminoácidos adsorbió fue la H₂TPP. Este resultado puede ser atribuido a las interacciones electrónicas entre los aminoácidos y la distribución electrónica π del macrociclo. También, pudo deberse a que el anillo presenta más sitios disponibles de unión, lo que favorece su interacción con otras moléculas. Por otro lado, se pudo notar que el metal central no solo favoreció la adsorción de aminoácidos con carga positiva, sino que hizo diferenciación entre ellos (Cu-Arg y Zn-Lys). Por lo tanto, es posible lograr un reconocimiento selectivo de aminoácidos cambiando el centro metálico de la porfirina.

Se determinó que el proceso de adsorción fue favorable a través de isothermas de adsorción de Freundlich, indicando que la adsorción de los aminoácidos sobre las películas se da en forma de multicapas. Además, se analizaron las cinéticas de adsorción y se determinó que los procesos fueron

de pseudo segundo orden basado en los valores R^2 . Con este dato, fue posible considerar que la adsorción en todos los casos se da por la formación de enlaces químicos.

Se analizó la morfología de las películas de porfirina antes y después de la interacción mediante las técnicas de SEM y AFM. De las imágenes obtenidas antes de la interacción, se observaron películas compactas, homogéneas y de baja rugosidad, al no presentar agregados ni defectos. Después de la interacción con los aminoácidos, se observó la formación de agregados tridimensionales de mediano y gran tamaño tanto en las imágenes de SEM como de AFM. En el último caso, se pudo notar que la rugosidad aumentó en gran medida siendo consistente con las pruebas de adsorción.

Las curvas de absorbancia usando la técnica de UV-Vis, mostraron cambios insignificantes para la película de CuTPP y pequeños cambios hipsocrómicos en las películas de H_2 TPP y ZnTPP para las bandas de Soret y bandas Q. Los desplazamientos hipsocrómicos más grandes correspondieron a los aminoácidos catiónicos (arginina y lisina).

Los resultados del ángulo de contacto dinámico mostraron interacciones de tipo hidrofílico en todos los casos. Las películas que poseen un centro metálico mostraron comportamientos más hidrofílicos para la solución buffer y más hidrofóbicos para las soluciones con aminoácidos. En el caso de la película de H_2 TPP se observó un comportamiento opuesto. Además, fue posible distinguir que los aminoácidos catiónicos fueron los que presentaron mayor hidrofobicidad y la serina mayor hidrofiliidad sobre todas las películas.

Los resultados de la microbalanza de cuarzo (QCM) exhibieron diferentes respuestas de interacción. En la película de CuTPP, se confirmó que el aminoácido que más se adsorbió fue la arginina, y el que menos fue la serina, aunque ambos aminoácidos muestran la misma velocidad de adsorción. La respuesta en la película de H_2 TPP, muestra una adsorción rápida para la serina y un incremento lineal en masa para la lisina. Finalmente, en la película de ZnTPP se observa el mismo comportamiento de adsorción, aunque la lisina muestra mayor masa depositada que la serina. En todos los casos, la solución buffer no afectó la adsorción sobre ninguna película.

A partir de las simulaciones DFT, se observó que la interacción entre las películas y las moléculas de arginina y lisina mostraron las energías de enlace más altas, mientras que la serina las más bajas. Así mismo, los valores de energía de enlace más altos para el aminoácido más y menos adsorbido fueron para la película sin centro metálico, y los más bajos para la película de CuTPP.

De los resultados cinéticos y QCM, inferimos que la serina exhibe un comportamiento de adsorción / desorción en las interfaces, que es compatible con los resultados DFT. Las configuraciones optimizadas de las interacciones exhibieron estados de coordinación con los átomos metálicos, mientras que la molécula H₂TPP, interactúa principalmente mediante los átomos internos del macrociclo de la porfirina.

Considerando todos los resultados obtenidos en este estudio, se puede decir que las porfirinas son elementos prometedores para la detección de aminoácidos. Por parte de la porfirina, el centro metálico jugó un papel crucial en los estados de coordinación. En el caso de los aminoácidos, la cadena lateral influyó en la adsorción en las superficies. Dada la naturaleza de la deslocalización electrónica de los macrociclos de las porfirinas, los aminoácidos catiónicos fueron los más afines a depositarse en sus superficies. Sin embargo, el tipo de átomo central también influyó en la selectividad de la adsorción, ya que para la molécula CuTPP la adsorción preferencial fue para la arginina, mientras que para la ZnTPP fue la lisina.

Así entonces, se puede concluir que las películas de porfirina no sólo son buenas candidatas para la fabricación de elementos de detección de aminoácidos, sino también, pueden ser selectivas de acuerdo al tipo de centro metálico.

Bibliografía

- [1] M. Cano. *Diseño y aplicación de sensores electroquímicos basados en moléculas orgánicas conductoras*. PhD thesis, Universidad de Córdoba, España, 2008.
- [2] T. Balaji, M. Sasidharan, and H. Matsunaga. Optical sensor for the visual detection of mercury using mesoporous silica anchoring porphyrin moiety. *Analyst*, 130:1162–1167, 2005.
- [3] O. Worsfold, C.M. Dooling, T.H. Richardson, M.O. Vysotsky, R. Tregonning, C.A. Hunter, and C. Malins. Nitrogen dioxide sensing characteristics at elevated temperature of sol-gel glass thin films containing substituted porphyrin dyes. *J. Mater. Chem*, 11:399–403, 2001.
- [4] H. Zhang, Y. Sun, K. Ye, P. Zhang, and Y. Wang. Oxygen sensing materials based on mesoporous silica mcm-41 and pt(ii)-porphyrin complexes. *J. Mater. Chem*, 15:3181–3186, 2005.
- [5] L. Feng, C.J. Musto, J.W. Kemling, S.H. Lim, W. Zhong, and K.S. Suslick. Colorimetric sensor array for determination and identification of toxic industrial chemicals. *Anal. Chem.*, 82:9433–9440, 2010.
- [6] M. Horrillo. *Estudio y realización de sensores para CO basados en la modulación de la conductividad eléctrica del semiconductor SnO_2* . PhD thesis, Universidad Complutense de Madrid, España, 1992.
- [7] T. Richardson, C. Dooling, Jones L., and R. Brook. Development and optimization of porphyrin gas sensing lb films. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 116:81–96, 2005.
- [8] M. Coahuila. *Síntesis y caracterización de macrociclos orgánicos enlazados covalentemente a la red de óxido de silicio por el método sol-gel*. PhD thesis, UAM-Iztapalapa, México, 2011.
- [9] T. Alpuche. *Formación y Caracterización de Películas Delgadas Organometálicas*. PhD thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
- [10] R. Giovannetti. The use of spectrophotometry uv-vis for the study of porphyrins. *Macro to nano spectroscopy*, 2012.
- [11] J. McMurry. *Química Orgánica*. Cengage Learning, 2008.
- [12] M. E. Martínez-Klimov, U. Organista-Mateos, A. Borja-Miranda, M. Rivera, O. Amelines-Sarria, and M. Martínez-García. Electrical properties of multi-pyrene/porphyrin-dendrimers. *Molecules*, 20:17533–17543, 2015.

- [13] F. Behboodi-Sadabad, V. Trouillet, A. Welle, B. Messersmith, and A. Levkin. Surface functionalization and patterning by multifunctional resorcinarenes. *ACS Appl Mater Interfaces.*, 10(45):39268–39278, 2018.
- [14] R. Gerber. *La Curación Vibracional*. Robinbook, 2001.
- [15] C. Natale, A. Macagno, G. Repole, and G. Saggio. The exploitation of metalloporphyrins as chemically interactive material in chemical sensors. *Mater. Sci. Eng. C*, C5:209–215, 1998.
- [16] D. Cox, M. and Nelson. *Lehninger Principios de Bioquímica*. Omega, 2008.
- [17] J.F. Van Staden and R.I. Stefan-Van Staden. Application of porphyrins in flow-injection analysis: A review. *Talanta*, 80:1598–1605, 2010.
- [18] S. Xu, J. Nilles, and K. Bown. Zwitterion formation in hydrated amino acid, dipole bound anions: How many water molecules are required? *J. Chem. Phys.*, 119:10696–10701, 2003.
- [19] W. M. Hassen, C. Martelet, F. Davis, S. P. J. Higson, A. Abdelghani, and S. Helali. Calix[4]arene based molecules for amino-acid detection. *Sens. Actuators B Chem.*, 124(1):38–45, 2007.
- [20] E. M. Evans and E. J. Wood. Metabolic pathways. *Biochem. Educ.*, 4(2):88–88, 1986.
- [21] E. Aliu, S. Kanungo, and G. L. Arnold. Amino acid disorders. *Ann. Transl. Med.*, 6(24):471–471, 2018.
- [22] J. F. Hilton, K. E. Christensen, D. Watkins, B. A. Raby, Y. Renaud, S. De la Luna, and D. S. Rosenblatt. The molecular basis of glutamate formiminotransferase deficiency. *Hum. Mutat.*, 22(1):67–73, 2003.
- [23] S. M. Houten, H. T. Brinke, S. Denis, J. P. N. Ruiter, A. C. Knegt, J. B. C. De Klerk, and M. Duran. Genetic basis of hyperlysinemia. *Orphanet J. Rare Dis.*, 8(1):1–8, 2013.
- [24] M. Friedman. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *J. Agric. Food Chem.*, 52:385–406, 2004.
- [25] N. Angelini, N. Micali, P. Mineo, V. Scamporrino, E. Villari, and D. Vitalini. Uncharged water-soluble co(ii)-porphyrin: A receptor for aromatic α -amino acids. *J. Phys. Chem. B*, 109:18645–18651, 2005.
- [26] X. Peng, J. Huang, T. Li, and L. Ji. Molecular recognition of amino acid esters by porphyrinato zinc(ii): Observation of a new binding mode. *Inorganica Chim. Acta*, 305:111–117, 2000.
- [27] M.A. Awawdeh, J.A. Legako, and H. Harmon. Solid-state optical detection of amino acids. *Sens. Actuators B Chem.*, 91:227–230, 2003.
- [28] T. Mayer, A. Marianov, and D. Inglis. Comparing fusion bonding methods for glass substrates. *Mater. Res. Express*, 085201:1–5, 2015.
- [29] E. Brunelle, C. Huynh, A. Le, L. Halámková, J. Agudelo, and J. Halánek. New horizons for ninhydrin: Colorimetric determination of gender from fingerprints. *Anal. Chem.*, 88, 4:2413–2420, 2016.
- [30] J. He, R. Lin, Long H., Liang Y., and Y. Chen. Adsorption characteristics of amino acids on to calcium oxalate. *J. Colloid Interface Sci.*, 454:144–151, 2015.

- [31] C. Ngaojampa, S. Namuangruk, Y. Surakhot, V. Promarak, S. Jungsuttiwong, and N. Kungwan. Theoretical investigation of the charge-transfer properties in different meso-linked zinc porphyrins for highly efficient dye-sensitized solar cells. *Comp. Theo. Chem*, 1062:1–10, 2015.
- [32] I. Horcas, R. Fernández, J.M. Gomez-Rodriguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero, and A. Baró. Wsxn: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev. Sci. Instrum.*, 78:013705, 02 2007.
- [33] C. Rivas, O. Núñez, F. Longoria, and L. Gonzalez. Langmuir and freundlich isotherms as model for the adsorption of nucleic acid components on wo_3 . *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*, 26, 1:43–49, 2014.
- [34] H.F. Coronel-Brizio, A.R. Hernandez-Montoya, and A.R. Jimenez-Montaño. Una prueba empírica de generadores de números pseudoaleatorios mediante un proceso de decaimiento exponencial. *Rev. Mex. Fis.*, 53, 5:350–357, 2007.
- [35] V. M. Mecea. Is quartz crystal microbalance really a mass sensor? *Sens. Actuator A Phys.*, 128(2):270–277, 2006.
- [36] X. Zhou, S. Ng, H. Chan, and S. Li. Detection of organic amines in liquid with chemically coated quartz crystal microbalance devices. *Sens. Actuators B Chem.*, 42(2):137–144, 1997.
- [37] R. M. Martin. Electronic structure: basic theory and practical methods, 2004.
- [38] A. Alassi, M. Benammar, and D. Brett. Quartz crystal microbalance electronic interfacing systems: A review. *Sensors*, 17:2799–2841, 2017.
- [39] Inc. Stanford Research Systems. *QCM 200 Quartz Crystal Microbalance Digital Controller*. Stanford Research Systems, Inc, 2018.
- [40] B. Ramos. *Estudio de la mojabilidad y ángulo de contacto en sistemas crudo/sólido/fluido*. PhD thesis, Universidad Central de Venezuela, Venezuela, 2003.
- [41] L. Xiaoquan and D. Samrat. *Phthalocyanines and Some Current Applications*. IntechOpen, 2017.
- [42] D.L. Akins, H.R. Zhu, and C. Guo. Aggregation of tetraaryl-substituted porphyrins in homogeneous solution. *J. Phys. Chem.*, 100:5420–5425, 1996.
- [43] A. D. F. Dunbar, S. Brittle, T. H. Richardson, J. Hutchinson, and C. A. Hunter. Detection of volatile organic compounds using porphyrin derivatives. *J. Phys. Chem. B*, 114:11697–11702, 2010.
- [44] M. A. García-Sánchez, F. Rojas-González, E.C. Menchaca-Campos, S.R. Tello-Solís, R. I. Y. Quiroz-Segoviano, L. A. Diaz-Alejo, Salas-Bañales E., and A. Campero. Crossed and linked histories of tetrapyrrolic macrocycles and their use for engineering pores within sol-gel matrices. *Molecules*, 18:588–653, 2013.
- [45] T. Nagahara, K. Imura, H. Okamoto, A. Oguro, and H. Imahori. Morphological and spectroscopic properties of thin films of self-assembling amphiphilic porphyrins on a hydrophilic surface as revealed by scanning near-field optical microscopy. *J. Phys. Chem. B*, 109:19839–19844, 2005.

- [46] K. Siskova, B. Vlckova, and P. Mojzes. Spectral detection of j-aggregates of cationic porphyrin and investigation of conditions of their formation. *J. Mol. Struct.*, 744:265–272, 2005.
- [47] L.M. Scolaro, A. Romeo, Castricianoa M.A., and Micali N. Unusual optical properties of porphyrin fractal j-aggregates. *Chem. Commun.*, pages 3018–3020, 2005.
- [48] L. Lindoy. *The Chemistry of Macrocyclic Ligand Complexes*. Cambridge University Press, 1989.
- [49] G.A. Melson. *Coordination Chemistry of Macrocyclic Compounds*. New York: Plenum Press, 1979.
- [50] K.M. Smith. *Porphyrins and Metalloporphyrins*. Elsevier Scientific Publishing Co: Amsterdam, The Netherlands, 1976.
- [51] D. Dolphin. *The Porphyrins, Physical Chemistry, Part A and B*. Academic Press: New York, NY, USA, 1979.
- [52] K. Kadish, K.M. Smith, and R Guillard. *The Porphyrin Handbook (20 Volumes)*. Academic Press: San Diego, CA, USA, 2003.
- [53] F.H. Moser and A.L. Thomas. *The Phthalocyanines*. CRC, Press Inc: Boca Raton, FL, USA, 1983.
- [54] N.B. McKeown. *Phthalocyanine Materials. In Synthesis, Structure and Function*. Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1998.
- [55] N.C. Maiti, S. Mazumdar, and N. Periasamy. J- and h-aggregates of porphyrins with surfactants: Fluorescence, stopped flow and electron microscopy studies. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, 2:369–376, 1998.
- [56] S.K. Lee and I. Okura. Optical sensor for oxygen using a porphyrin-doped sol-gel glass. *Analyst*, 122:81–84, 1997.
- [57] X. Li, S. Shen, Q. Zhou, H. Xu, D. Jiang, and Lu. A. The gas response behavior of spin-coated phthalocyanine films to no₂. *Thin Solid Films*, 324:274–276, 1998.
- [58] V. De la Luz. *Porfirinas como Agentes de Ahormado en Materiales Híbridos Porosos*. PhD thesis, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F., 2009.
- [59] M.A. García-Sánchez. *Síntesis y Caracterización de Complejos Macrocíclicos Mixtos Lantanoides*. PhD thesis, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F., 1993.
- [60] M.A. García-Sánchez, V. de la Luz, M.I. Coahuila-Hernández, F. Rojas-González, S.R. Tello-Solís, and Campero A. Effects of the structure of entrapped substituted porphyrins on the textural characteristics of silica network. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 223:172–181, 2011.
- [61] B.M. Rambo and J.L. Sessler. Oligopyrrole macrocycles: Receptors and chemosensors for potentially hazardous materials. *Chem. Eur. J.*, 17:4946–4959, 2011.
- [62] M. Muranaka, A. and Yonehara and M. Uchiyama. Azulenocyanine: A new family of phthalocyanines with intense near-ir absorption. *J. Am. Che. Soc.*, 132:7845–7845, 2010.

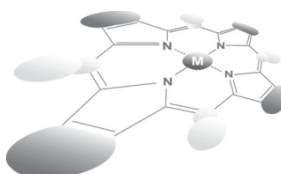
- [63] N.K.S. Davis, A.L. Thompson, and H.L. Anderson. A porphyrin fused to four anthracenes. *J. Am. Chem. Soc.*, 133:30–31, 2011.
- [64] M.K. Islyaikin and E.A. Danilova. Structural analogs of tetrapyrrole macrocycles and their biological properties. *Russ. Chem. Bull. Int.*, 56:689–706, 2007.
- [65] H.H. He, X.X. Zhu, and K.W. Cheah. Reactivity of aqua coordinated monoporphyrinate lanthanide complexes: Synthetic, structure and photoluminescence studies of lanthanide porphyrinate dimer. *Dalton Trans*, 23:4064–5003, 2004.
- [66] M. Calvete, G.Y. Yang, and M. Hanack. Porphyrins and phthalocyanines as materials for optical limiting. *Synth. Met.*, 141:231–243, 2004.
- [67] A. Lavi, H. Weitman, R.T. Holmes, K.M. Smith, and B. Ehrenberg. The depth of porphyrin in a membrane and the membrane’s physical properties affect the photosensitizing efficiency. *Biophys. J.*, 82:2101–2110, 2002.
- [68] Y. Tanamura, T. Uchida, N. Teramae, M. Kikuchi, K. Kusaba, and Y. Onodera. Ship-in-a-bottle synthesis of copper phthalocyanine molecules within mesoporous channels of mcm-41 by a chemical vapor deposition method. *Nano Lett.*, 1:387–389, 2001.
- [69] M. Goutterman. Study of the effects of substitution on the absorption spectra of porphyrin. *J. Chem. Phys.*, 30:1139–1161, 1959.
- [70] S.A. Borisenkova, E.P. Denisova, E.A. Batanova, E.G. Girenko, O.L. Kaliya, E.A. Lukyanets, and G.N. Vorozhtsov. Kinetics and mechanism of destruction of cobalt phthalocyanine derivatives in aqueous solutions. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, 4:684–688, 2000.

Apéndice

.1. Artículos

Journal of Porphyrins and Phthalocyanines
J. Porphyrins Phthalocyanines 2020; **24**: 577–588
 DOI: 10.1142/S1088424620500108

Published at <https://www.worldscinet.com/jpp/>



Amino acid adsorption on tetraphenyl porphyrin films

Jesus M. Rivera and Margarita Rivera*

*Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000,
 Ciudad de México, 04510, México*

Received 29 November, 2019

Accepted 13 February, 2020

ABSTRACT: In this work, metal free, zinc and copper tetraphenyl porphyrin thin films were employed as substrates to study their interaction with glycine, serine, glutamate, lysine and arginine amino acids in order to investigate the effect of the metallic center and the amino acid characteristics in the adsorption phenomena. The amount of amino acid adsorbed on the films was quantified by using the Ruhemann method. Adsorption isotherms were obtained and analyzed in order to predict the adsorption mechanism for each case. In addition, the morphology of the films was investigated before and after the amino acid immersion by using scanning electron and atomic force microscopies. On the other hand, dynamic contact angle measurements were performed to monitor the spreading phenomena and changes in the hydrophobic nature of the surfaces after the amino acid interaction. From the results, it was observed that the largest deposited amino acid on all three surfaces corresponded to the positively charged compounds, while serine was the lowest adsorbed amino acid in all cases. These results can be attributed to electronic interactions between the amino acids' lateral chains and the electronic π distribution of the porphyrin macrocycle ring, and they provide important information regarding the amino acid selectivity of adsorption on tetraphenyl porphyrin films.

KEYWORDS: amino acids, tetraphenyl porphyrins, adsorption, thin films, contact angle, SEM, AFM.

INTRODUCTION

It is well known that porphyrins can be found in various biological compounds, playing an important role in the metabolism of different living organisms [1]. In addition, porphyrin-based molecules exhibit important optical and electron transfer properties which have been employed in several applications such as molecular electronics, energy converters, chemosensors, catalytic reactors, drug delivery agents, single cell imaging, elements for cancer treatment and MRI techniques, among many others [2–5].

Porphyrins have a macrocycle ring with an extensive system of delocalized π electrons which possess special absorption, emission and charge transfer properties as a result of its conjugated double bond structure. Because of these characteristics, the typical porphyrin UV-vis spectrum shows intense bands in the 380–500 nm and

500–750 nm intervals called Soret and Q, respectively [6]. The intensity, position and shift of these bands provide important information regarding the kinetic, complexation, equilibrium and aggregation of the porphyrin system [3, 7]. When the porphyrin macrocycle is coordinated to a central metal ion, the metallic ion characteristics have a substantial impact on the chemical, electrical, magnetic and optical properties of the molecule, and therefore, on its selectivity and applications [8].

On the other hand, amino acids are essential molecules with a fundamental role as building blocks of proteins. Amino acids have two functional groups: one amino ($-\text{NH}_2$) and one carboxylic ($-\text{COOH}$) attached to the same carbon atom. When amino acids are in aqueous solutions, the $-\text{NH}_2$ group is the stronger base, and so it picks up H^+ from the $-\text{COOH}$ group to leave a zwitterion. Zwitterion amino acids, although electrically neutral, act as polar species with one positive and one negative side, where the amino acts as a base (proton acceptor) while the carboxylic as an acid (proton donor). These systems

*Correspondence to: Margarita Rivera, Instituto de Física, UNAM, tel.: +52(55)56225007, email: mrivera@fisica.unam.mx.

exhibit large dipole moments, high melting and boiling points, and are water soluble, which is convenient since the hydration of biological molecules is a major issue for living systems [9].

Because amino acids can be found in many industrial products, foods and human fluids which can be released to the environment, it becomes necessary to detect and quantify them in order to find the best method for their optimal identification and removal. There are few works in the literature where the interaction between amino acids and porphyrins have been studied, despite the versatility of porphyrins as molecular sensors [10]. Angelini *et al.* studied the interaction of a soluble Co(II)-porphyrin with aromatic alpha-amino acids in aqueous solution. By using NMR and UV-vis absorption, they found that the binding mechanism is pH dependent, and also, that the Co–N coordination was not the main mechanism for the complex formation but was possible due to hydrophobic interactions when working at pH 7. In addition, UV-vis results showed that both Soret and Q bands were affected by the type of metal inserted into the porphyrin core. In particular, the Soret bands showed changes in the position, shape and intensity of the signals [11]. Peng *et al.* studied the interaction between different amino acids and a modified zinc porphyrin molecule in aqueous solution. In this case, the coordination was achieved through the metallic center in addition to an interaction between the amino acid and one carboxyl group in one radial position of the macrocycle [7]. Finally, the only attempt to investigate the amino acid–porphyrin interaction in a solid state was performed by Awawdeh *et al.* [12]. In that work, TPPS porphyrins were affixed to a cellulose membrane and were allowed to interact with various L-amino acids in aqueous solution in order to investigate their absorption capabilities. By using the UV-vis technique, the authors observed not only changes in the peak intensities but also a shift of the Soret peaks. A careful analysis of the absorbance plots in terms of the pH showed that the interaction between the porphyrin and the amino acids is active-functional-group dependent, and therefore can be used to quantify different amino acids in solution [12].

Therefore, in this work, we investigated the ability of various metal and metal-free tetraphenyl porphyrin molecules assembled in a solid state (thin films) to function as amino acid receptors. The analysis was performed in terms of the central metal ion and the type of amino acid employed. The surface characterization was performed with scanning and atomic force microscopy before and after the interaction. Contact angles were measured for each porphyrin film with the different amino acid solutions, and finally, the adsorption was quantified by using the ninhydrin method, which is one of the most traditional methods for amino acid identification [13]. This method relies on the production of the Ruhemann's purple as a result of the chemical reaction between the ninhydrin compound and the amino acids. By using the

UV-vis technique, the intensity of the absorbance signal can be associated to the amount of amino acid in solution, and therefore, the amount adsorbed at the film surface [14]. Finally, equilibrium isotherms at room temperature for the highest and lowest adsorbed amino acids for each tetraphenyl porphyrin film were obtained, in order to provide some insight into both the adsorption mechanism and the affinity of the amino acids towards the porphyrin chemical structure.

EXPERIMENTAL

The porphyrins employed in this work were 5,10,15,20-tetraphenyl-21H,23H-porphine (H₂TPP) from Stream Chemicals, 5,10,15,20-tetraphenyl-21H,23H-porphine zinc (ZnTPP) from TCI and 5,10,15,20-tetraphenyl-21H,23H-porphine copper (CuTPP) from Sigma–Aldrich $\geq 95\%$. The amino acids were L-glycine, L-serine, L-arginine, L-glutamine and L-lysine from Sigma–Aldrich in order to investigate the adsorption in terms of the amino acid group. In addition, ninhydrin ACS reagent was purchased from Sigma–Aldrich. All compounds were used as received.

The porphyrin films were deposited by using the physical vapor deposition technique with a NORM Vacuum VCM 600 V3 system. The substrates were 2.5×1.0 cm glass slides previously cleaned with piranha solution and ultra-pure water ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) from a Millipore purification system [15]. Then they were air dried and vacuum stored before each experiment. The amino acids were prepared at 1000 ppm, pH 7.0, in a phosphate buffer solution [16]. The porphyrin films were immersed in 20 mL vials of each amino acid (1000 ppm) solution for 2 h. Then they were removed, air dried and stored under vacuum prior to the characterizations.

The films' adsorption quantification was achieved by analyzing the remnant solutions after film withdrawal. In order to determine the unknown amount of amino acid adsorbed for each surface, an amino acid calibration curve for each molecule was obtained following the Brunelle *et al.* methodology [14]. Here, the remaining amino acid in solution was left to interact with 0.1 M of ninhydrine to produce a blue-purple color (Ruhemann's purple). It is well known that the intensity of the color is proportional to the amount of amino acid in the sample, and therefore, this is an excellent method to determine unknown quantities of amino acid after a proper calibration. In this case, the calibration was achieved by using the absorbance value for the 575 nm wavelength for various amino acid concentrations between 5 ppm to 100 ppm. With this data, a graph of absorbance vs. concentration was plotted and the data fitting equation allowed us to obtain the unknown values of concentration required.

The thickness and morphological characterization of the films before and after the amino acid interaction

was achieved by using a field emission scanning electron microscope (Jeol JSM-7800F) in the gentle beam mode at 5,000x magnification, and atomic force microscopy (Jeol JPSM4210) at $20 \times 20 \mu\text{m}$ in the tapping mode to avoid damage to the films. Adsorption isotherms were obtained for the lowest and highest adsorbed amino acids, and various models were employed to predict the adsorption mechanism for the different systems. Finally, time-dependent contact angle measurements were performed with a pocket goniometer under ambient conditions for the highest and lowest adsorbed amino acids for each pure porphyrin surface. In this study, the drop shape was followed after a certain time to investigate the affinity and surface coverage evolution between them. Drop volumes were $20 \mu\text{l}$ in all cases.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows SEM images of the H_2TPP films before and after the amino acid interactions. From these images, it is clear that there is an important difference regarding the surface morphology of the adsorbed films in terms of the amino acid characteristics. In Fig. 1a, the bare porphyrin film before the amino acid interaction is shown, exhibiting a very flat and smooth surface. After amino acid immersion, in all cases, the exposed surface showed a completed surface coverage with no evident pores or film defects, suggesting a good interaction between the H_2TPP porphyrin film and the amino acid. In addition, the structures at the interface show 3D growth in all cases. For instance, Figs 1c, 1d and 1f corresponding to

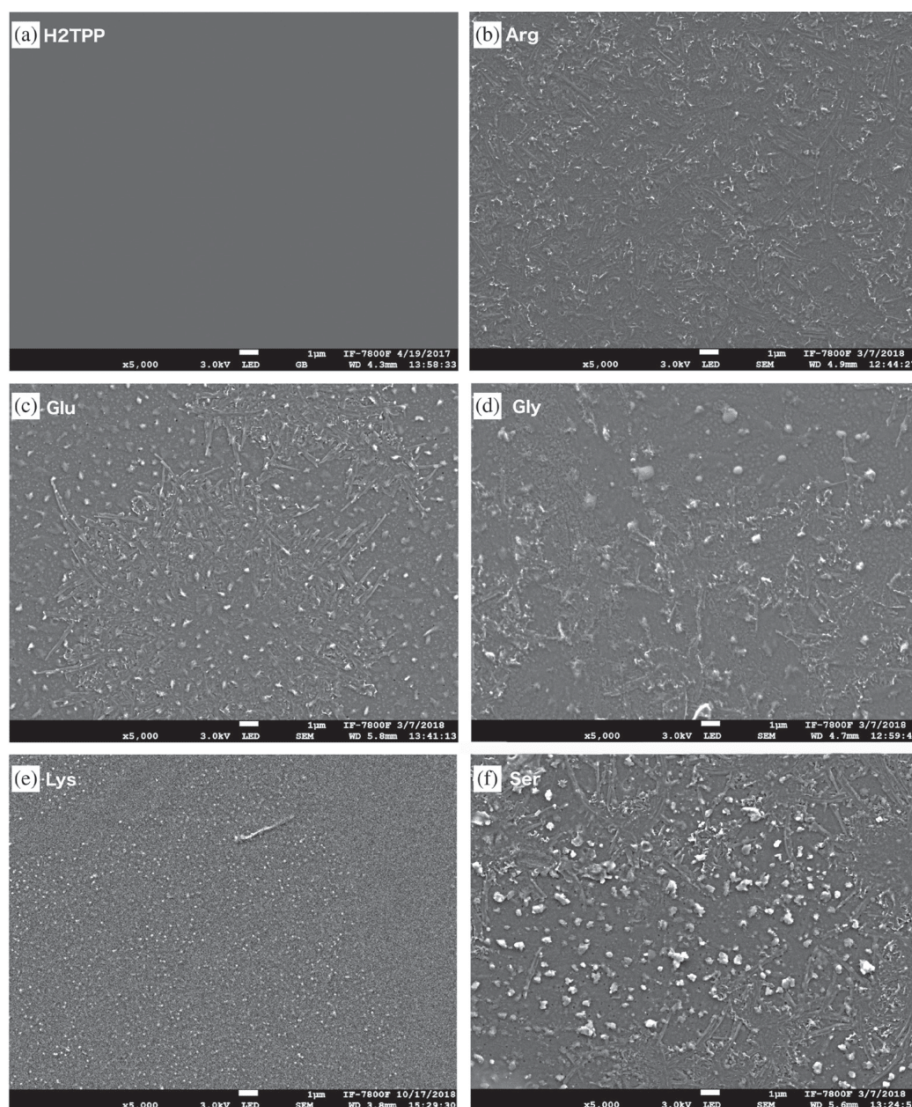


Fig. 1. SEM images of the (a) as-deposited H_2TPP surface, and after (b) Arg, (c) Glu, (d) Gly, (e) Lys and (f) Ser adsorption. Images magnification 5,000x.

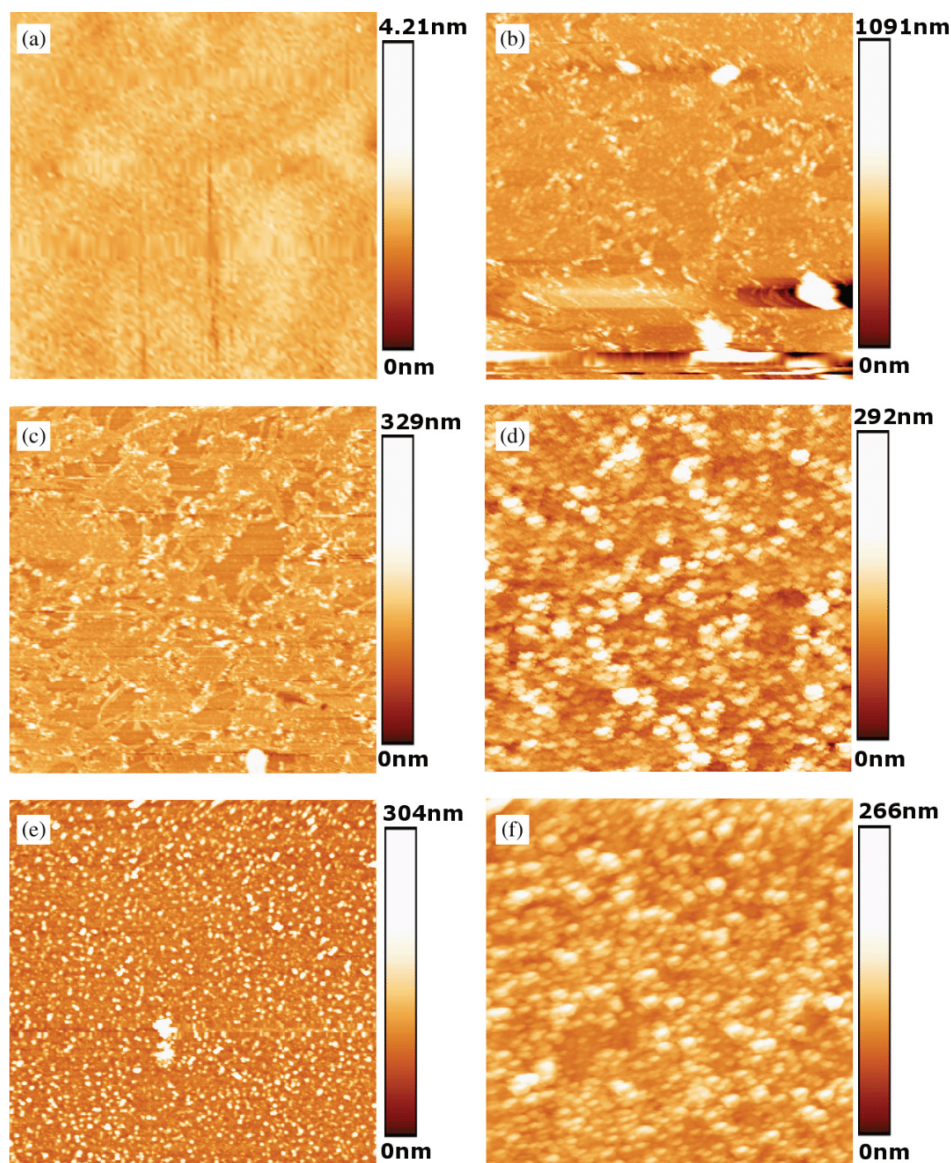


Fig. 2. AFM images of the (a) as-deposited H₂TPP surface, and after (b) Arg, (c) Glu, (d) Gly, (e) Lys and (f) Ser adsorption. Images size 20 × 20 μm

Glu, Gly and Ser, respectively, exhibited large aggregates at the interface, with the Gly amino acid being the one with the largest (2.5 μm) aggregate like structures. On the other hand, Figs 1b and 1e, corresponding to the Arg and Lys amino acids, respectively, both positively charged at neutral pH values, showed the most structured even surfaces. The Lys interface has a small granular aspect, while the Arg surface shows a compact 2D fiber-like appearance.

In Fig. 2, AFM results of the same H₂TPP samples can be seen. As expected, the H₂TPP as-deposited film exhibits a very flat and close-packed homogenous surface. It is interesting that all other interfaces show

different characteristics. For instance, the modified-Gly surface (Fig. 2d) shows an irregular film with aggregates of various sizes on different regions of the substrate. The Ser sample (Fig. 2f) shows a granular-like film with regions of high- and low-density aggregates. Figs 2b and 2c present a similar aspect that resembles an incomplete film and aggregates of different diameters. Finally, Fig. 2e, has a flat surface covered with nuclei of small diameter (around 200 nm) and scarce aggregates of larger sizes.

SEM images of the copper systems can be seen in Fig. 3. The aspect of the bare copper tetraphenyl porphyrin film is shown in Fig. 3a, where a smooth and flat surface can be observed. On the top left corner of

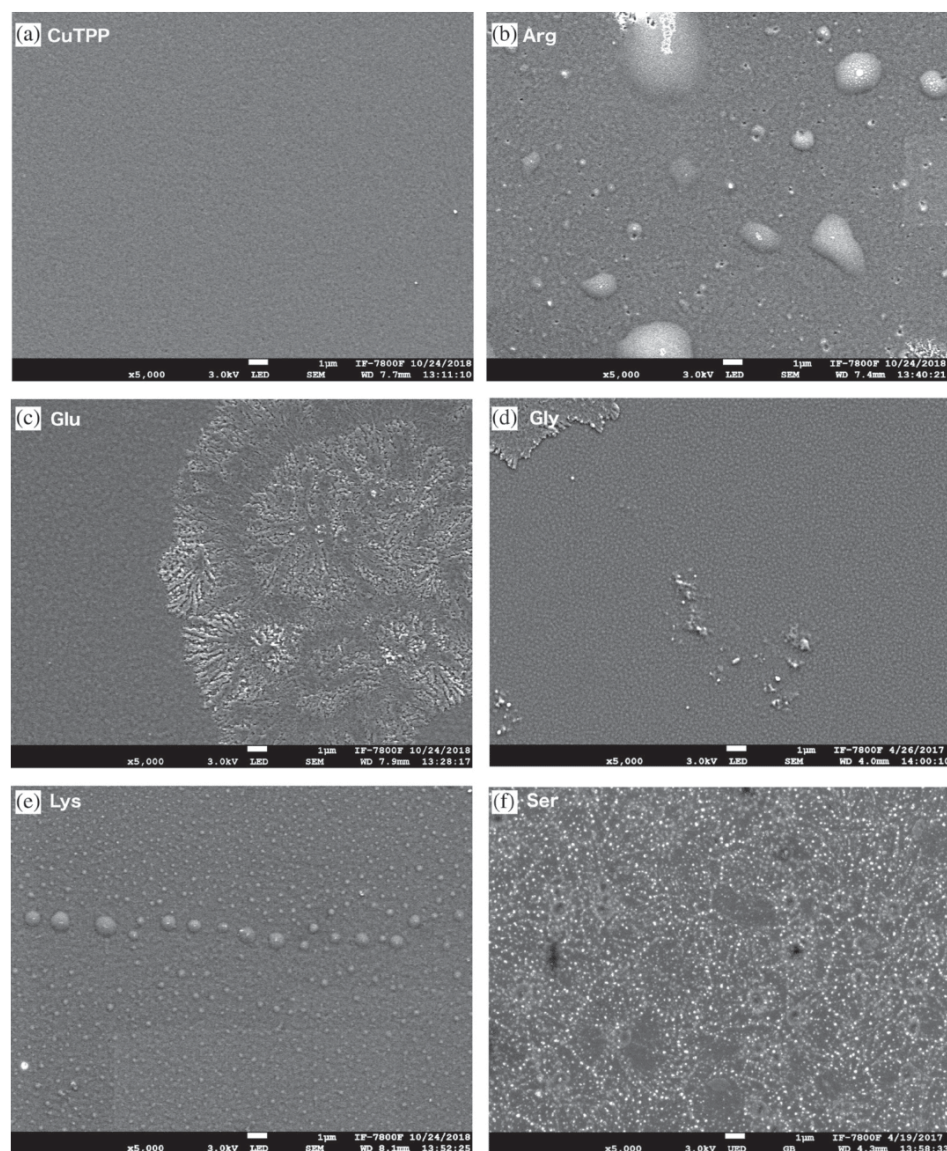


Fig. 3. SEM images of the (a) as-deposited CuTPP surface, and after (b) Arg, (c) Glu, (d) Gly, (e) Lys and (f) Ser adsorption. Images magnification 5,000 $\times$.

image Fig. 3d, a compact layer seems to be growing on top of the porphyrin surface. The Ser sample (Fig. 3f) exhibits a granular interface, where the grains are randomly distributed forming zones with low- and high-density aggregates. In addition, the new film shows some defects where the absence of grains is clearly observed. In Fig. 3b, corresponding to the Arg interaction, a compact film with some pores is seen in addition to globular features of different shapes and dimensions, being the largest around 3 μm in diameter. Since the texture of the globular structures is similar to the film interface, it is possible that they were formed with the same material, in his case, the Arg amino acid. In Fig. 3c, which corresponds to the glutamate amino acid, the formation

of a branched-like film spreading along the porphyrin surface is observed. The bright and dark regions on this image suggest the presence of zones with different thicknesses being the thicker structures the ones at the edge of the film. Finally, in Fig. 3e, again, a compact film is observed with granular features of various dimensions at the interface.

From AFM images of the same copper samples, a very smooth surface with few aggregates with dimensions between 0.2 and 2 μm can be seen in Figs 4d and 4e. In all other cases, the surfaces show the presence of small and large grains irregular distributed on the CuTPP interface. Finally, high magnification images of the Arg-modified surface exhibits, in addition to the aggregates,

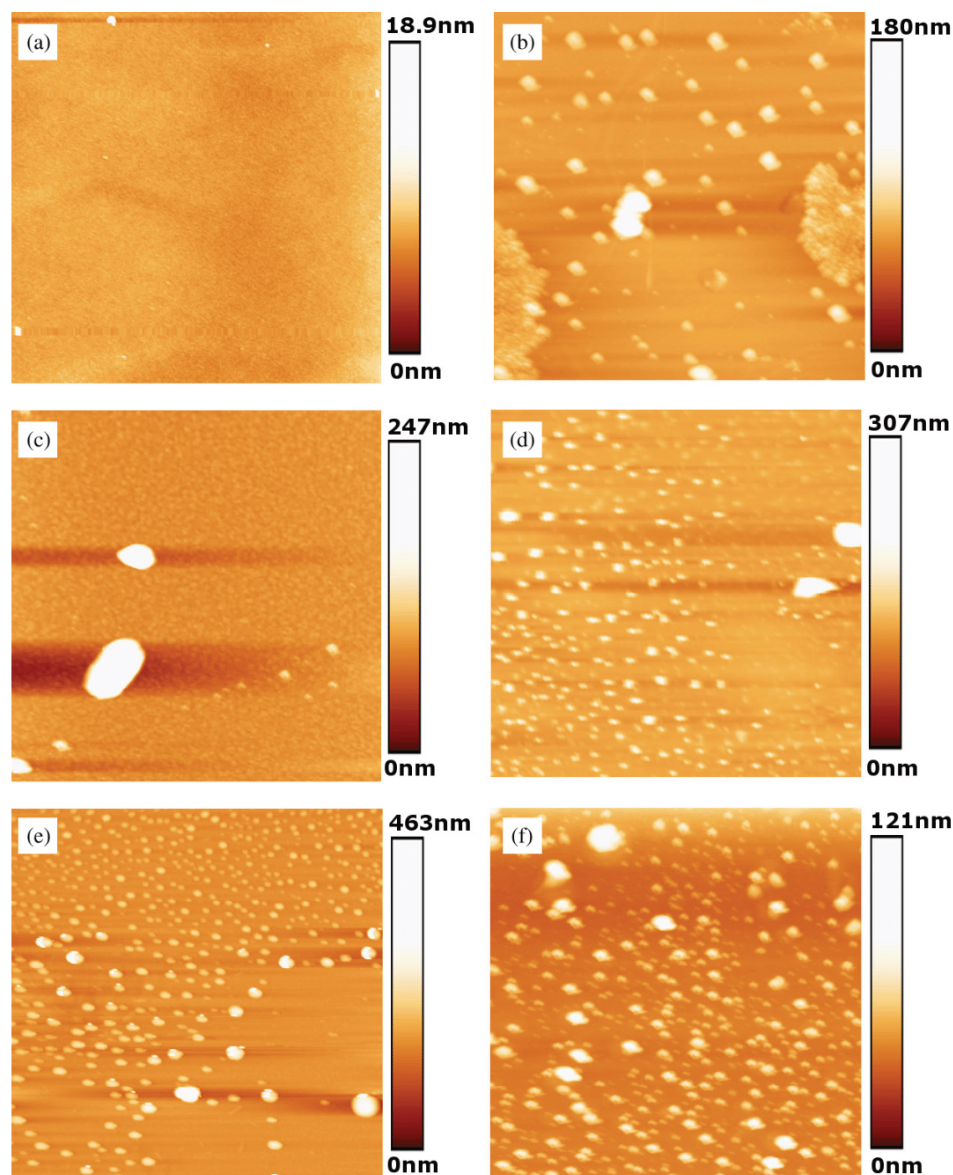


Fig. 4. AFM images of the (a) as-deposited CuTPP surface, and after (b) Arg, (c) Glu, (d) Gly, (e) Lys and (f) Ser adsorption. Images size $20 \times 20 \mu\text{m}$

two regions of a branched-like film growing in different zones at the interface. This feature is similar to image Fig. 3c of the Glu-modified surface as seen with SEM.

On the other hand, SEM images of the ZnTPP surfaces before and after amino acid interaction are shown in Fig. 5. The bare porphyrin surface shows a very flat and smooth interface (see Fig. 5a). On the other hand, the Gly-modified surface exhibits a compact film with small aggregates randomly scattered at the interface. The Ser surface shows many nuclei of similar dimensions and spherical like-shapes, suggesting the formation of aggregates due to hydrophobic interactions. It is worth noticing that the Ser texture is different from the Gly

interface. The Lys surface as seen in Fig. 5e shows flat circular aggregates of similar dimensions between 0.2 and 0.5 μm . Finally, a similar aspect can be observed for Figs 5b and 5c. In this case, in addition to irregular globular features between 0.1 and 1 μm at the interface, elongated aggregates as large as 4 μm in length can be observed.

The complementary AFM images can be seen in Fig. 6. Here, the bare zinc porphyrin film (Fig. 6a) exhibits a granular surface in contrast with the plain H_2TPP and CuTPP surfaces. This is confirmed with the height and roughness of the ZnTPP film. These lower-magnification AFM images showed similar

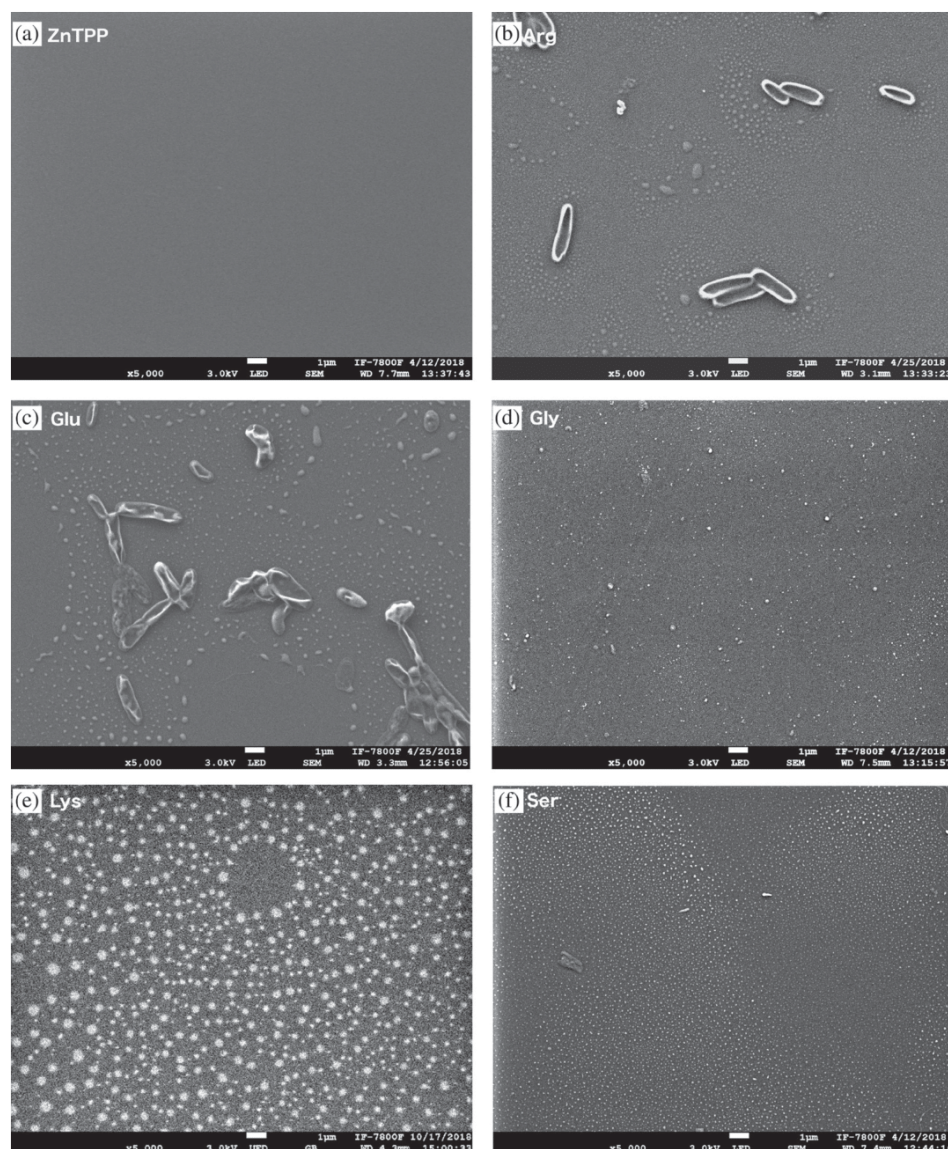


Fig. 5. SEM images of the (a) as-deposited ZnTPP surface, and after (b) Arg, (c) Glu, (d) Gly, (e) Lys and (f) Ser adsorption. Images magnification 5,000 $\times$.

characteristics to their SEM counterparts, where the surface features suggested hydrophobic-like interactions between the porphyrin film and the amino acids.

In Table 1, a summary of the roughness values for each porphyrin film before and after amino acid interaction is shown. As expected, the RMS roughness increased after amino acid adsorption. On the other hand, the initial thickness of the porphyrin films was 275 nm in average.

In order to obtain the amount of amino acid adsorbed for each porphyrin film, the ninhydrin method was employed as a quantitative measurement. After obtaining a calibration plot for each amino acid, the amount of the remaining amino acid in solution after film withdrawal was determined. In Fig. 7a, the absorbance plots for different

glycine amino acid concentrations is shown. Figure 7b shows the absorbance values for each concentration at the 575 nm wavelength, which corresponds to a linear dependence. The calculated linear equation was used to determine the residual concentrations based on the absorbance values of the unknown samples. This method was employed for all amino acids.

In Table 2, a summary of the adsorbed concentration of amino acids for each porphyrin film is shown.

For the H_2 TPP surface, the sequence of maximum to minimum absorbance was Lys > Glu > Arg > Gly > Ser. For the CuTPP film, the sequence is as follows: Arg > Lys > Gly > Glu > Ser, and finally, the order for the maximum to minimum adsorption for the ZnTPP films was Lys >

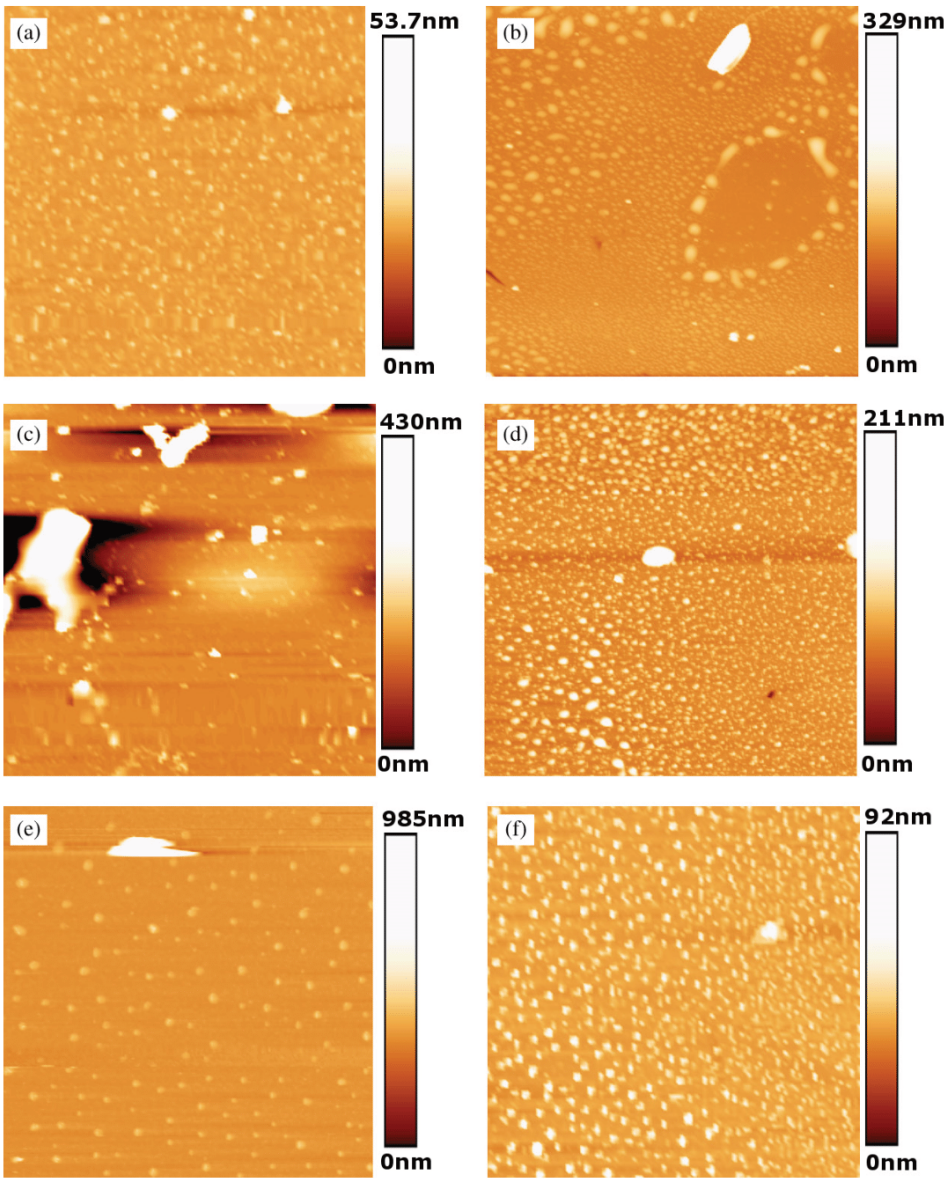


Fig. 6. AFM images of the (a) as-deposited ZnTPP surface, and after (b) Arg, (c) Glu, (d) Gly, (e) Lys and (f) Ser adsorption. Images size 20 × 20 μm

Table 1. RMS roughness values (nm) for each porphyrin film before and after amino acid interaction.

	Bare (nm)	Arginine (nm)	Glycine (nm)	Glutamate (nm)	Lysine (nm)	Serine (nm)
H ₂ TPP	1.39	0.07	32.01	26.41	12.21	28.54
ZnTPP	3.05	16.32	11.49	29.57	0.06	9.06
CuTPP	1.39	12.79	25.01	20.30	20.96	14.48

Glu > Arg > Gly > Ser. For the H₂TPP and ZnTPP, the largest adsorption was for lysine with an average capture of 83%, while arginine was adsorbed around 67% for the CuTPP film. For all three substrates, the lowest registered concentration was for the serine amino acid.

Langmuir and Freundlich isotherms were used to interpret the adsorption experimental data in order to investigate the nature of the interaction between the amino acid molecules and the film surfaces. From the analysis, it was found that the Freundlich approach

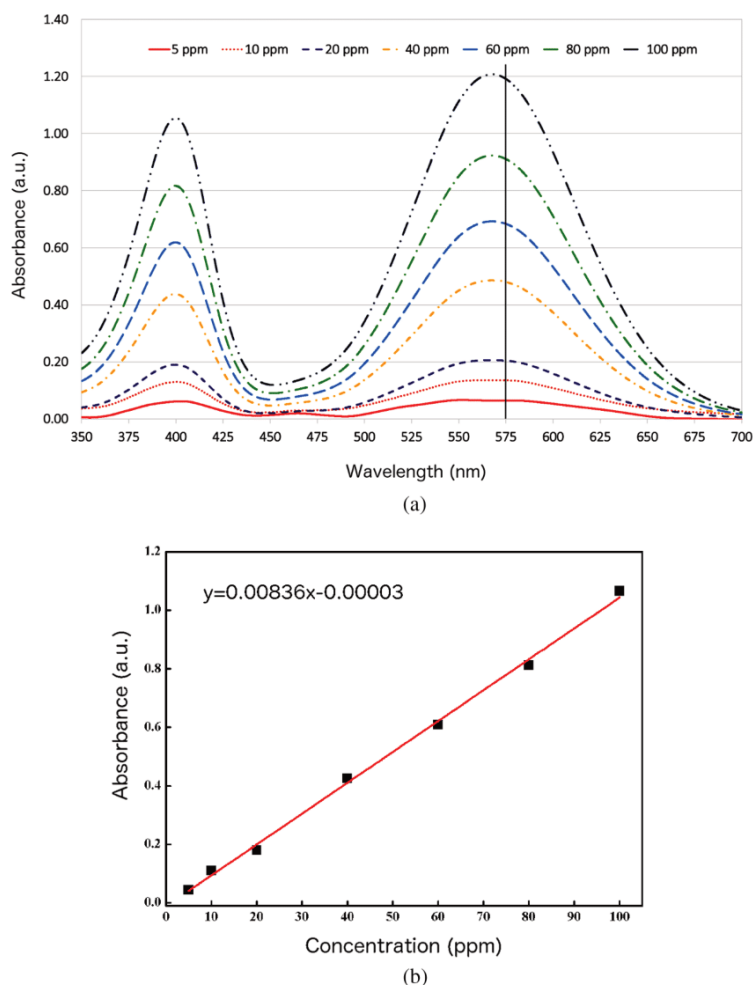


Fig. 7. (a) Calibration of the Arg system with the Ruhemann's purple method obtained with UV-vis. (b) Linear regression by using the 575 nm absorption values.

Table 2. Quantification of the amino acid adsorption for each tetraphenyl porphyrin film. * Corresponds to the lowest and ** to the highest adsorbed amino acid.

Film/amino acid	Arginine (ppm)	Glycine (ppm)	Glutamate (ppm)	Lysine (ppm)	Serine (ppm)
H ₂ TPP	207.12	155.75	272.12	844.37**	105.75*
CuTPP	667.75**	165.87	82.5	355.42	18.63*
ZnTPP	345.62	80.12	565.62	822.12**	78.37*

exhibited the best correlation for the obtained values. In Fig. 8, a graph of the adsorption isotherms for all systems is shown. Table 3 contains the isotherm constants of the Freundlich adsorption isotherm model for each plot.

From Table 3, we can see that the adsorption capacity is much higher for the positively charged amino acids, indicating a greater interaction for these molecules. In addition, the H₂TPP and ZnTPP surfaces exhibit a much better adsorption capacity, which is consistent with the available binding sites on either the

porphyrin macrocycle or the central metal atom. On the other hand, the low K_F values for serine reflected the low affinity of the amino acid to the porphyrin films. In particular, the lowest number was associated to the copper porphyrin film, which also exhibited the lowest adsorbance concentration in agreement with the data in Table 1.

Finally, time-dependent contact angle measurements were also carried out. The contact angle behavior of the buffer was included for comparison. In Figs 9a, 9b,

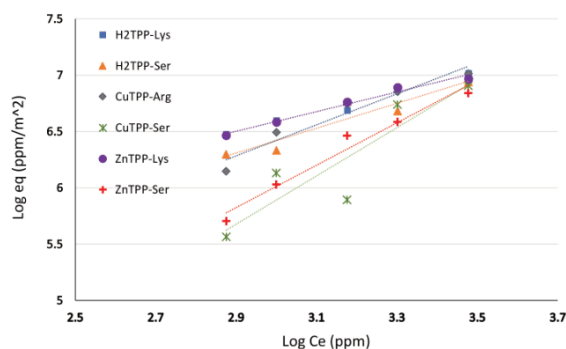


Fig. 8. Adsorption isotherms of the highest and lowest adsorbed amino acids onto the different porphyrin films. The Freundlich model better adjusted to the experimental values.

and 9c, the plots of the CuTPP, H₂TPP and ZnTPP surfaces with all amino acids are shown, respectively. In Fig. 8a the initial contact angle for the buffer was 67°, while the angles for Arg, Glu, Gly, Lys and Ser were 85°, 76°, 82°, 83° and 72°, respectively. Interestingly, the angle of the solutions did not change over time but instead remained constant during the time of the experiment. From the plots, Arg showed the largest contact angle, suggesting a larger hydrophobic interaction with the surface, while Ser exhibited the lowest amino acid contact angle, showing a better affinity between the surface and the Ser solution. The contact angle of all other amino acids remained between these two values in the 67–85° interval range. From this plot, the amino acid solutions exhibited a more hydrophobic nature in comparison with the buffer onto CuTPP.

The angles of the amino acid solutions onto the H₂TPP film are shown in Fig. 9b. Here, all systems had contact angles between 67 and 78 degrees. The initial contact angle of the buffer solution was the highest at 78°, while the amino acid solutions showed a more hydrophilic nature with exponentially decreasing contact angles over the time of the experiment. In general, the largest contact angle was for Ser and the lowest for Lys at longer times, indicating the lowest and highest affinities, respectively, for the H₂TPP surface in agreement with the adsorption values. From this plot, it can be observed that the contact angle spreads easily at this interface.

Finally, the behavior of the contact angle on the ZnTPP surface is shown in Fig. 9c. The initial contact angles were 65°, 82°, 82°, 82°, 82° and 90° for the buffer, Ser, Glu, Arg, Gly and Lys, respectively. In this plot, we can see that the buffer shows the largest affinity for the ZnTPP surface and is fast spreading from 65° to 32° over the time of the experiment. The amino acids Ser, Glu, Arg, Gly started from the same initial contact angle, but their spreading velocities decreased in the same order. Lys, on the other hand, showed the largest hydrophobic response for the ZnTPP surface with a semi-fast spreading within the first 3 s and then a slow spreading rate until the end of the experiment.

From these results, it is clear that polar serine and positively charged lysine exhibited the highest and lowest contact angles for the H₂TPP surface, respectively. On the other hand, serine showed the lowest contact angle on both CuTPP and ZnTPP, while the positively-charged amino acids (Lys and Arg) exhibited the highest contact angles on the metalloporphyrin surfaces. In terms of the rate of change, the H₂TPP surface showed a constant contact angle response, while the other surfaces exhibited a spreading phenomenon, indicating a better affinity between the films and the amino acids.

A possible explanation of these results can be attributed to the nature of the side chain and the electronic structure of the macrocycle through the π -conjugated system. Serine as a polar hydrophilic amino acid is the one with the lowest contact angles onto CuTPP and ZnTPP. The electronegativity difference of this molecule is enough to create a slight separation of charge or polarity. Since like attracts like, these partially charged groups will be attracted to oppositely charged or partially charged groups such as water, or more likely, the electronic π distribution of the metalloporphyrin films. On the other hand, Lys and Arg are basic amino acids containing a nitrogen atom with a lone electron pair capable of attacking a hydrogen atom, and therefore, are more likely to form hydrogen bonds with the macrocycle ring.

From these studies, we observed that the initial contact angle varies depending not only on the type of porphyrin system but also on the characteristics of the amino acid molecules. These differences were expected due not only to the size but also to the geometry and functionalization of both molecules. The time evolution of the curve also

Table 3. Different isotherm parameters for the highest and lowest adsorbed amino acids onto various porphyrin films by using the Freundlich model.

Isotherm parameters	H ₂ TPP/Lysine	H ₂ TPP/Serine	CuTPP/Arginine	CuTPP/Serine	ZnTPP/Lysine	ZnTPP/Serine
N	0.9062	1.1046	1.3809	2.1404	0.8702	1.8750
Log K_f	3.8627	3.1066	2.2777	0.5302	3.9796	0.3887
K_f	4236.42	1278.20	189.57	3.39	9541.13	2.4473
R^2	0.9798	0.8863	0.9495	0.8111	0.9799	0.9700

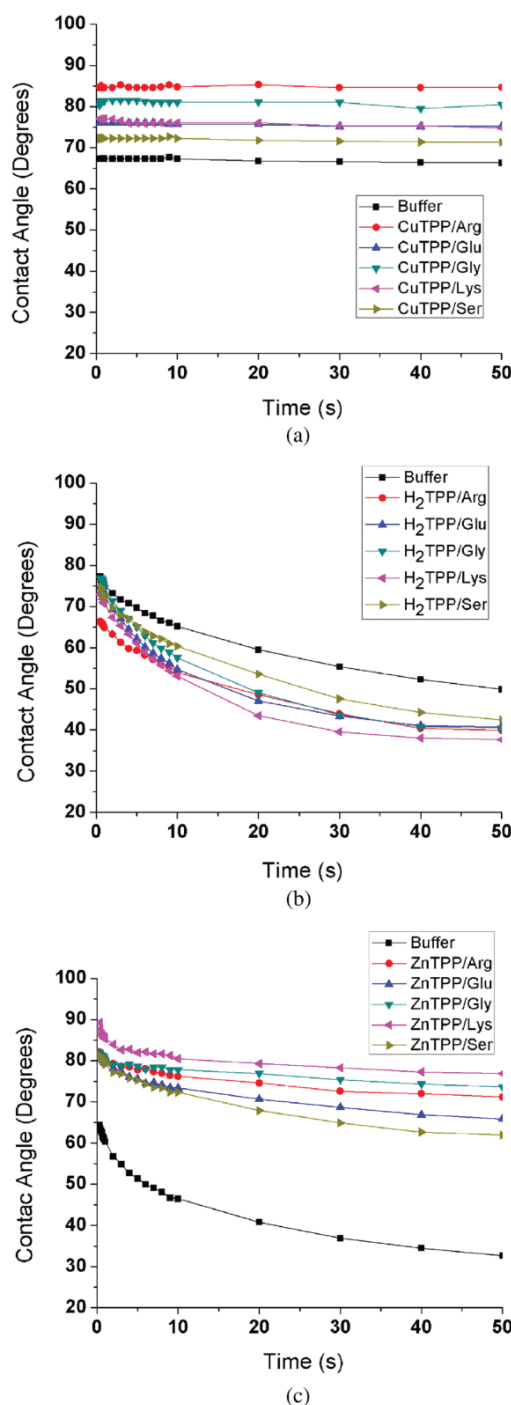


Fig. 9. Dynamic contact angles up to 50 s for the surfaces (a) H_2TPP , (b) $CuTPP$ and (c) $ZnTPP$ interacting with all the amino acids.

provided information about the nature of the interaction after drop contact. A steep drop of the plot, fast spreading, suggests a strong interaction between the porphyrin surface and the amino acid, while a relative gentle slope

of change with time suggests a slow time adsorption evolution. In this case, the formation of the crystallites observed in some SEM images does not affect the contact angle measurements since the crystals were observed after a two-hour immersion interaction, while the contact angle experimental times were obtained during the first 50 s of the experiment. In addition, we observed an interesting contact angle behavior when using the metal-free film in contrast with the metalloporphyrin surfaces, since the drop seems to exhibit a larger affinity for the metal-free interface.

When analyzing the contact angles in terms of the morphologies of the surfaces, a very interesting relationship can be observed. For instance, Ser onto $CuTPP$ and $ZnTPP$ exhibited the lowest contact angle among all amino acids, indicating a better interaction with these surfaces, although the spreading behavior is different in both cases. The surface of these systems showed a completed surface coverage with small aggregates. In the case of $CuTPP$, the size of the aggregates is large in comparison with the clusters on the $ZnTPP$ surface, suggesting that the constant contact angle allowed the growth of clusters over time. In addition, the height on the AFM images showed the lowest height values among all the amino acids, suggesting the formation of a homogenous thin film. On the other hand, the positively charged amino acids which exhibited the largest contact angle on these surfaces, showed not only a completed surface coverage but also deformation of large aggregates that increased the height on the AFM images. The hydrophobic nature of the interactions between the surfaces $CuTPP$ and $ZnTPP$ with Arg and Lys produced large 3D aggregates on the film surfaces, while the hydrophilic nature observed for Ser exhibited a better surface coverage and the formation of small clusters with small heights as seen with AFM. The height of the AFM images showed the largest values for Arg and Lys onto $CuTPP$ and $ZnTPP$, respectively.

CONCLUSIONS

Metal-free, Cu and Zn tetraphenyl porphyrin films were employed to investigate the interaction between the surfaces and different amino acids. The morphology observed by using both, SEM and AFM before and after amino acid interaction was consistent in all cases. The quantitative analysis performed with the Ruhemann technique indicated differences in the amount of amino acid deposited on the film surfaces, favoring the adsorption of charged compounds, in particular for positively charged amino acids. On the other hand, the polar serine showed the lowest amount of amino acid adsorbed on the three surfaces. These results can be attributed to the electronic interactions between the amino acids and the electronic π distribution of the macrocycle ring. Therefore, a selective amino acid recognition can be achieved by changing the metal coordination of the

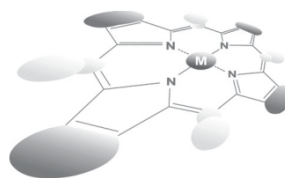
porphyrin molecular film. The adsorption process was found to be favorable through the Freundlich adsorption isotherms and it agreed with the quantitative assessment of the adsorbance on the films, but also with the SEM and AFM images. Finally, contact angle results provided information of the spreading phenomena at short periods of time, which can be associated to the initial interaction between the amino acids and the porphyrin films. Nowadays, various studies are being carried out to further investigate the nature and strength of these amino acid–porphyrin film interactions.

Acknowledgments

J. M. Rivera acknowledges scholarship 283324 from CONACyT México. M. Rivera acknowledges the DGAPA-PAPIIT IN112420 grant. The authors thank the LCM microscopy laboratory at IF-UNAM for the microscopy facilities and Dr. C. Magaña, Dr. S. Tehuacanero C. and Ing. Diego Quiterio for SEM and sample preparation technical support, respectively. Finally, the authors thank Sr. Arturo Martinez for assistance.

REFERENCES

1. Rajora MA, Louac JWH and Zheng G. *Chem. Soc. Rev.* 2017; **46**: 6433–6469.
2. Imran M, Ramzan M, Qureshi AK, Khan MA and Tariq M. *Biosensors* 2018; **95**: 1–17.
3. Richardson TH, Dooling CM, Jones LT and Brook RA. *Adv. Colloid Interf. Sci.* 2005; **116**: 81–96.
4. Rivera M, Rivera JM, Amelines-Sarria O and Martínez-García M. *Bull. Mat. Sci.* 2019; **42**: 1–8.
5. Rivera M, Rivera JM, Amelines-Sarria O and Wang YA. *Adv. Mater. Phys. Chem.* 2018; **8**: 441–457.
6. Giovanetti R. In *Macro to Nano Spectroscopy* (1st edn.), Jamal Uddin (Ed.) IntechOpen: London (ebook). 2012, pp. 87–108.
7. Peng X-B, Huang J-W, Li T and Ji L-N. *Inorg. Chim. Acta* 2000; **305**: 111–117.
8. Cook L, Brewer G and Wong-Ng W. *Crystals* 2017; **7**: 1–22.
9. Xu S, Nilles JM and Bowen KH. *J. Chem. Phys.* 2003; **119**: 10696–10701.
10. Konopińska K, Pietrzak M and Malinowska E. *Anal. Biochem.* 2015; **470**: 41–47.
11. Angelini N, Micali N, Mineo P, Scamporrino E, Villari V and Vitalini D. *J. Phys. Chem B* 2005; **109**: 18645–18651.
12. Awawdeh MA, Andrew LJ and Harmon HJ. *Sens. Actuators B* 2003; **91**: 227–203.
13. Friedman M. *J. Agric. Food Chem.* 2004; **52**: 385–406.
14. Brunelle E, Huynh C, Le AM, Halámková L, Agudelo J and Halámková L. *J. Anal. Chem.* 2016; **88**: 2413–2420.
15. Mayer T, Marianov AN and Inglis DW. *Mater. Res. Express* 2018; **5**: 085201(1–7).
16. van Staden JF and Stefan-van Staden RI. *Talanta* 2010; **80**: 1598–1605.



Tetraphenyl porphyrin films as selective detectors for amino acid molecules

Jesús Miguel Rivera and Margarita Rivera*

Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Ciudad de México, México

Received 27 May 2020

Accepted 17 June 2020

ABSTRACT: The interaction of different amino acids and vacuum evaporated tetraphenyl porphyrin films was investigated by using kinetic isotherms, UV-vis spectroscopy, quartz crystal microbalance and density functional theory techniques. The adsorption process was analyzed by using pseudo-first-order and pseudo-second-order models. From these results, the adsorption order changed depending on the chemical characteristics of the porphyrin film, although most of the interactions were classified as pseudo-second-order at the films interface. From absorbance measurements, red shifts on the Soret peak positions were observed for all amino acids interacting with the metal free and the ZnTPP systems, while the position of the Soret peak barely change for the CuTPP surface, except for a slight bathochromic shift for arginine. On the other hand, the broadening of the Soret peak was more important for the ZnTPP and H₂TPP surfaces, but the interaction with the CuTPP interfaces decreased the width of the peaks in all cases. In addition, a quartz crystal microbalance analysis was employed to investigate the film sensing performance during amino acid exposure. From these results, positively charged amino acids were more easily adsorbed on the films in contrast with the polar (serine) molecule. DFT calculations exhibited important deformations for H₂TPP, the out-of-plane displacement of the Zn atom for ZnTPP, and hydrogen bond interactions with the CuTPP molecule. DFT also showed high binding energies for the positively charged amino acids but low binding energies for serine in agreement with experimental data. From these results, porphyrin films could be used as selective detectors for various L-amino acid molecules.

KEYWORDS: TPP, films, amino acids, QCM, kinetic adsorption, DFT, sensor.

INTRODUCTION

It is well known that amino acids are important elements in the formation of proteins and play a key role for most processes in living organisms. Most amino acids can be found in human fluids and natural and industrial products [1–3]. Because of the different forms of discarded amino acid quantities in everyday life, it is necessary to possess accurate and selective detection methods. Although there are different analytical techniques such as chromatography, electrophoresis, SERS, colorimetry, and NMR, among others, to determine the presence of these compounds [4, 5], unfortunately, most of the techniques require considerable amounts of material,

involve complicated instruments, long preparation times and great expense, among other drawbacks.

A promising technique that employs the adsorption of different molecules onto solid surfaces is a viable alternative for molecular recognition due to its universal nature, sensitivity, easy operation, high removal efficiency, and the possibility of recycling and reusing some of the adsorbents in some cases. In addition, the process is advantageous due to the low-cost operation and easy handling, without generation of secondary pollutants. One of the major difficulties of the surface performance is the sorbent's selectivity, which in many cases requires a pre-treatment processes to improve adsorption capacity and selectivity. For this reason, molecular films can offer enormous advantages for molecular detection, since they are easy to fabricate and provide specific binding sites and selectivity at the interface, depending on the

*Correspondence to: M. Rivera, tel: +52(55)56225007, email: mrivera@fisica.unam.mx.

B J. M. RIVERA AND M. RIVERA

film's molecular structure [6, 7]. On the other hand, it has been shown that small molecules such as porphyrins and metalloporphyrins exhibit important characteristics that allow them to be used as molecular acceptor thin films through their various functional groups, and most importantly, through their cationic central metal atoms [8–10]. So far, porphyrins are well known to exhibit a highly stable macrocycle, coordinate to almost all metals and some semimetals into the porphyrin cavity and exhibit a highly conjugated π system that provides very interesting electronic and redox properties [11].

Recently, the number of studies regarding the use of porphyrin and metalloporphyrins as amino acid detectors have increased, although most of the studies have been performed in solution. For instance, Angelini *et al.* conducted different studies between water-soluble porphyrins and amino acids [12–14] that suggest molecular recognition properties among them. In particular, when a cobalt-soluble porphyrin was mixed with different amino acids in an aqueous environment, they found not only changes in the intensity and red shift of the Soret peak [14], but also splitting of the Soret band under different experimental conditions [13]. Peng *et al.* employed UV-vis and RMN techniques to investigate the amino acid ester interaction with an unsymmetrical carboxylic-functionalized zinc porphyrin molecule in solution. They found that the carbonyl group of the amino acid coordinates to the Zn atom, and the amino group of the amino acid forms hydrogen-bonding with the carboxyl group of the porphyrin, with various responses on the UV-vis spectrum depending on the amount of amino acid esters [15]. In terms of the interaction between amino acids and porphyrin films, Awawdeh *et al.* used a cellulose film to fix a metal-free *meso*-tetra (4-sulphonato-phenyl) porphyrin, which was left to interact with various amino acids in solution. After the membrane was dried, the absorbance spectra were measured, and they found that the Soret peak presents blue shifts after the amino acid interaction, with very low detection levels of the order of nM [16]. In a recent paper from our group, we used three different tetraphenyl porphyrin molecules (H_2 TPP, ZnTPP, CuTPP) as thin films to investigate the adsorbance phenomena of various amino acids with different chemical classifications. In that work, we analyzed the films' morphological changes and performed a formal adsorbance quantification by employing the amino acids reaction with ninhydrine, among other techniques. From that investigation, we observed that positively charged arginine and lysine, were more easily adsorbed in contrast with the polar serine molecule [17].

In this work, in order to further investigate the nature of the interactions between the films and the different amino acids, we used kinetic isotherms, UV-vis spectroscopy, QCM and DFT techniques to determine the behavior and interactions mechanisms, which will provide information regarding the selectivity for amino acid detection. An

important aspect to considerer, is that the QCM method enables us to examine through a frequency shift any interaction between the surface and the molecules in solution. This aspect not only can provide information regarding the dynamics of adsorption, but also, the selectivity between the systems [18].

EXPERIMENTAL

For this work, the amino acids were L-Glycine, L-Serine, L-Arginine, L-Glutamine and L-Lysine from Sigma-Aldrich. In addition, 5,10,15,20-tetraphenyl-21H,23H-porphine (H_2 TPP) from Stream Chemicals, 5,10,15,20-tetraphenyl-21H,23H-porphine zinc (ZnTPP) from TCI and 5,10,15,20-tetraphenyl-21H,23H-porphine copper (CuTPP) from Sigma-Aldrich 95% were employed for the films formation. All compounds were used as received.

The vacuum evaporation technique was employed to produce the porphyrin films with a NORM Vacuum VCM 600 V3 system. Previously cleaned at-cut gold QCM quartz discs and glass slides with piranha solution and ultra-pure water (18 Mohms cm) from a Millipore purification system were employed as substrates [19]. The amino acid solutions were prepared with a phosphate buffer solution at 1000 ppm, pH 7.0 [20]. For the adsorption, the porphyrin films were immersed for 2 h in 20 mL vials with each amino acid solution. Then they were removed, air dried and stored under vacuum prior to the characterizations.

The adsorption kinetics were studied by fitting various kinetic models to the data. In particular, the pseudo-first-order and pseudo-second-order models were employed [21]. The UV-vis absorbance spectra were acquired with a double beam CT-8600 spectrophotometer from E-Chrom Tech Co., Ltd. The study was performed for the bare TPP films and the films after amino acid interaction for comparison. The dynamic of adsorption of the amino acids on the films was followed with a QCM200 quartz crystal microbalance from Stanford Research Systems. For this study, the quartz crystals with a nominal frequency of 5 MHz coated with 245 nm of tetraphenyl porphyrin films (metal-free, Zn and Cu) in average were inserted into the electronic unit. Then, 1 mL of amino acid solution was placed in the QCM crystal cavity and the evolution over time was followed for 2 h.

Finally, to understand the experimental results, density functional theory was used to investigate the optimized geometries for each individual TPP (H_2 , Cu and Zn) and amino acid molecule. In all cases, we started with different initial configurations and we analyzed those with the lowest base energy. Then, the interaction between the porphyrins and the highest and lowest adsorbed amino acid was modeled to investigate the binding energy and preferential adsorption sites. For these studies, the simulations were performed in aqueous solutions since the main interaction was in the presence of the buffer.

For the calculations, the Gaussian program with the DFT B3LYP/6-31g(d) basis sets were employed for all systems, since it has been noted that this base exhibits good results in agreement with experimental data [22].

RESULTS AND DISCUSSION

To investigate not only the uptake rate of the amino acids on the films, but also the adsorption characteristics and mechanisms, adsorption kinetic models were employed. As described elsewhere [20], the linear forms of the kinetic pseudo-first-order and pseudo-second-order were used to fit the experimental data to obtain the adsorption rate constants, k_1 and k_2 , respectively. The calculations were performed for each film, but only the highest and lowest amino acids adsorbed for each surface were analyzed. By using information from a previous work, only Arg (highest) and Ser (lowest) amino acids were investigated for the CuTPP film, and Lys (highest) and Ser (lowest) amino acids for the H₂TPP and ZnTPP surfaces [17].

In Fig. 1, the plots of the pseudo-first and second order models are shown. Figure 1a and 1b, show the pseudo-first-order graphs for the highest and lowest adsorbed amino acids, respectively. In both cases, by analyzing

the R^2 values for each plot, a very poor fitting with R^2 values lower than 0.3 were observed for all amino acids and surfaces. On the other hand, the pseudo-second-order plots showed much better fittings for the highest adsorbed molecules (Arg and Lys) with R^2 values above 0.9. The fittings for the lowest adsorbed amino acid (Ser) on all surfaces, showed R^2 values below 0.2 for the H₂TPP and ZnTPP films, but a R^2 value of 0.85 for the CuTPP film. These results suggest that the pseudo-second-order model was in general more suitable to describe the adsorption process in terms of a chemical sorption or chemisorption. One interesting aspect of these results, it is related to the poor response in terms of adsorption for serine, which corroborate, the low affinity of this molecule for the tetraphenyl porphyrin films. In the chemisorption process, valency forces or exchange of charged particles between the amino acids and the porphyrin molecules can possibly dominate the binding interactions. A summary of all plots with the different models is shown in Fig. 1. The model parameters can be seen in Table 1.

From these results, we noticed that the metallic center of the porphyrin played an important role in the adsorption rate. Although the R^2 values reveal a poor fitting of pseudo-first-order for the positively charged amino acids, the highest to lowest adsorption rate constant k_1 value

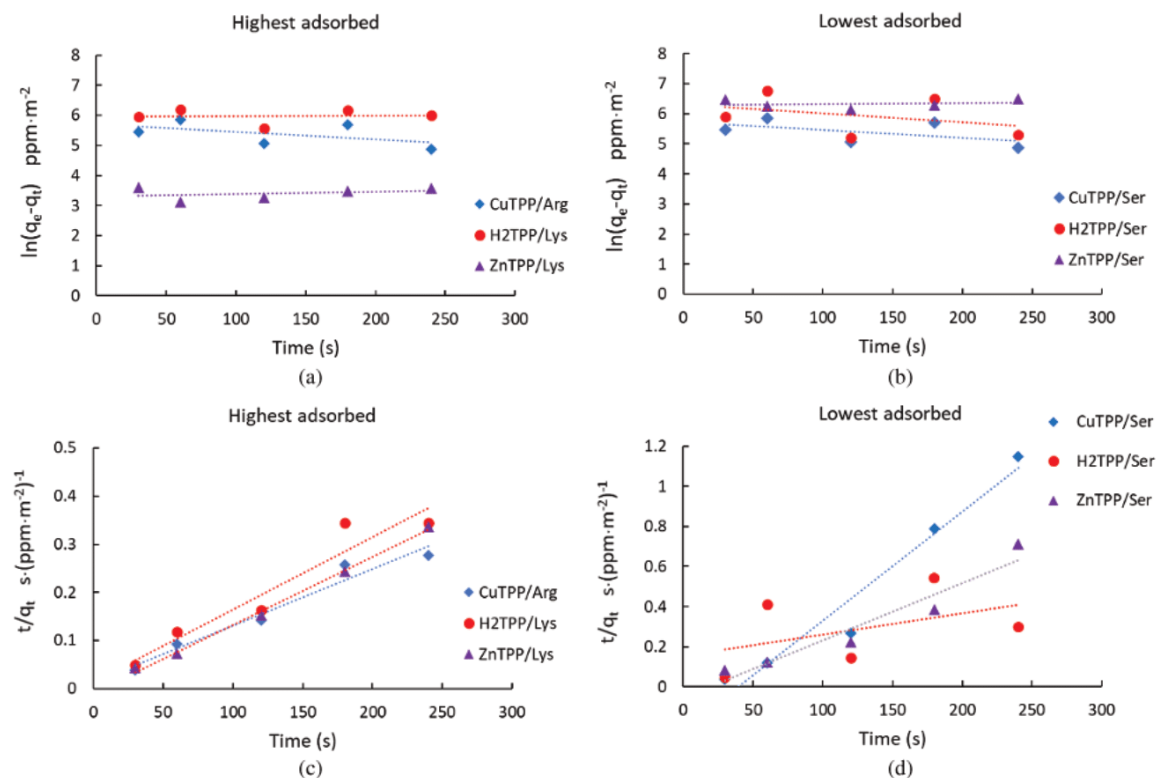


Fig. 1. Pseudo-first (a) and (b) and pseudo-second (c) and (d) order plots for all 3 porphyrin surfaces with the highest (left column) and lowest (right column) adsorbed amino acids.

D J. M. RIVERA AND M. RIVERA

Table 1. Kinetic parameters of the selected amino acids onto each surface by using the pseudo-first-order and pseudo-second-order models.

Film/Amino acid	Pseudo-first-order			Pseudo-second-order		
	$\ln(q_e - q_i)$ ppm m ⁻²	k_1 (s ⁻¹) s ⁻¹	R^2	t/qt , s (ppm m ⁻²) ⁻¹	k_2 , m ² (ppm s ⁻¹) ⁻¹	R^2
CuTPP/Arg	5.7166	0.0026	0.2901	0.0133	0.0012	0.9603
H ₂ TPP/Lys	5.9701	0.0000	0.0005	0.0017	-0.0020	0.9615
ZnTPP/Lys	2.9759	0.0026	0.9817	-0.0082	0.0014	0.9965
CuTPP/Ser	5.4235	0.0061	0.6806	-0.2127	0.0054	0.9555
H ₂ TPP/Ser	6.3007	-0.0029	0.1324	0.1565	0.0011	0.2077
ZnTPP/Ser	6.2846	0.0003	0.0354	-0.0545	0.0029	0.9261

showed a Cu>Zn>H₂ trend. The pseudo-second-order constant k_2 exhibited a Zn>Cu>H₂ trend. The exchange position order of the metals for the rate constants was attributed to the difference of the adsorbed amino acid onto each film, this is, Arg for CuTPP and Lys for ZnTPP and H₂TPP. On the other hand, since serine was the less adsorbed amino acid on all three surfaces, the trend of adsorption was the same for both pseudo-first-order (k_1) and pseudo-second-order (k_2) models, this is, Cu>Zn>H₂. Therefore, the presence of the metallic center favors second-order chemisorption in all cases.

In Fig. 2, the absorbance UV-vis plots for the three films before and after amino acid interactions are shown for all amino acids. In this case, all plots were normalized to remove the influence of the thickness of the films in the absorbance intensity plots.

In Fig. 2a, the UV-vis spectra of the CuTPP film before and after amino acid interaction is depicted. Here, we can see that the position of the Soret (424 nm) and Q (544 nm) peaks do not change although a slight difference in the width of the peaks (FWMH) is observed in all cases in comparison with the bare surface. It can be inferred from these results, that somehow, the amino acid — porphyrin interaction reduces the degrees of freedom of the system, slightly narrowing the peak widths because of a decrease on the electronic delocalization.

On the other hand, the absorbance spectra of the H₂TPP film before and after immersion with the different amino acid solutions is shown Fig. 2b. Here, the characteristic metal-free porphyrin spectrum is observed. The Soret peak of the H₂TPP film located on 434 nm exhibited a blue shift with the Lys and Ser amino acids for 5 nm, while the other amino acids retain the same Soret porphyrin film value. On the other hand, the four Q peaks also exhibited a blue shift between 2 nm and 7 nm, and a slight intensity increase for Gly, Lys and Ser, in comparison with Arg and Glu. These results showed that the band gap energy of the H₂TPP film slightly increased after Lys and Ser interactions.

Finally, the UV-vis spectra of the bare and modified ZnTPP film with the different amino acids is shown in Fig. 2c. The position of the Soret peak exhibits a

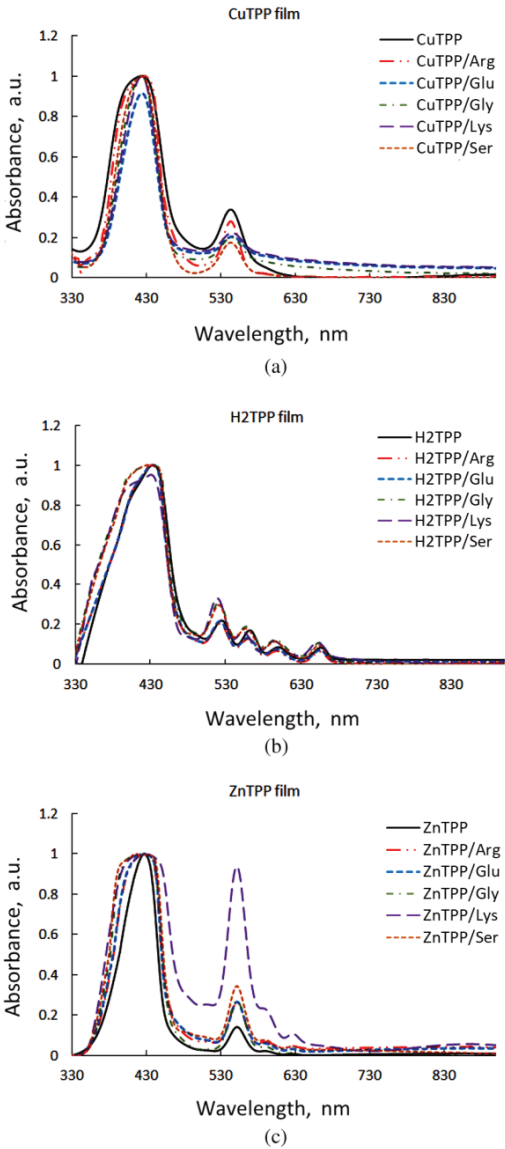


Fig. 2. UV-vis data with all amino acids for the (a) CuTPP, (b) H₂TPP and (c) ZnTPP films.

Table 2. UV-vis absorbance peak positions of the films before and after amino acid interactions.

Porphyrin Film	Peak	Wavelength, nm					
		Bare Film	Arg	Glu	Gly	Lys	Ser
CuTPP	Soret	424	424	424	424	424	424
	Q	544	543	544	545	544	545
H ₂ TPP	Soret	434	433	434	433	429	429
	Q	525	523	522	522	519	521
		563	560	560	558	553	557
		601	598	598	597	595	597
ZnTPP	Soret	658	656	656	654	652	654
		428	428	427	427	426	417
		553	553	553	553	553	553
	Q	590	590	590	590	590	590
		628	628	628	628	628	628

blue shift between 1 and 9 nm after the amino acid's interactions. An interesting detail shows that the largest Soret hypsochromic shift corresponded to serine. On the other hand, the position of the three discernible Q peaks remains exactly at the same wavelengths (553 nm, 590 nm, 629 nm), regardless of the amino acid characteristics.

In Table 2, the summarized peak positions for the films before and after amino acid interactions are shown. From these values, it is clear, that the peaks on the copper system did not show an important change for both bands. For the H₂TPP system, the Soret peak exhibited small hypsochromic shifts only for Lys and Ser, while the Q peaks shows blue shifts in all cases. As for the ZnTPP system, most of the Soret peaks exhibited blue shifts, while neither of the Q peaks showed any difference after amino acid interaction.

The QCM results, exhibited in Fig. 3, showed the real mass change for each system between 120 s and 3000 s. The first 120 s, where employed for the system stabilization. Just at 120 s, the buffer, and the buffer plus amino acid solutions (highest and lowest adsorbed for each film) were injected to the QCM measuring cavity. In order to only investigate the dynamic behavior of the amino acid adsorption, we removed from the plots the stabilization time and the mass increase associated to the 1 mL solution, due to the large differences in scale.

Figure 3a corresponds to the CuTPP film interacting with the pure buffer, Arg plus buffer (highest adsorption) and Ser plus buffer (lowest adsorption) by using identical concentrations as in the previous experiments. Here, an important adsorption takes place at the beginning of the experiment, and then it becomes asymptotic for both amino acids. The reference, or buffer, shows linear behavior and poor adsorption on the film, in contrast with the other solutions. In fact, the largest adsorption

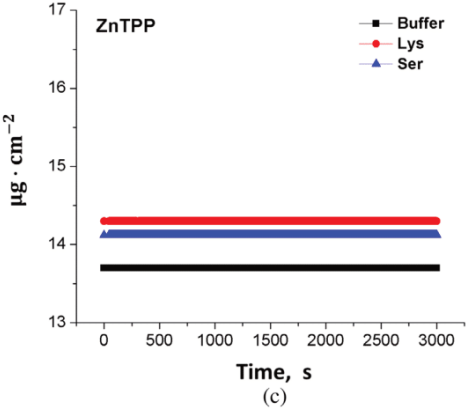
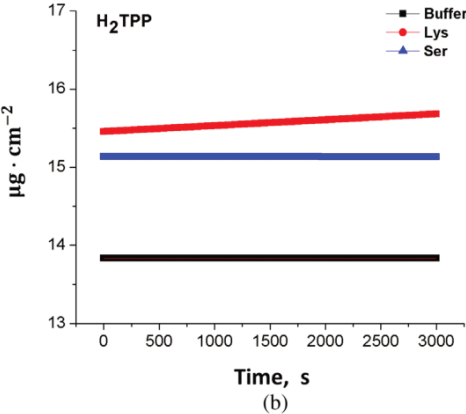
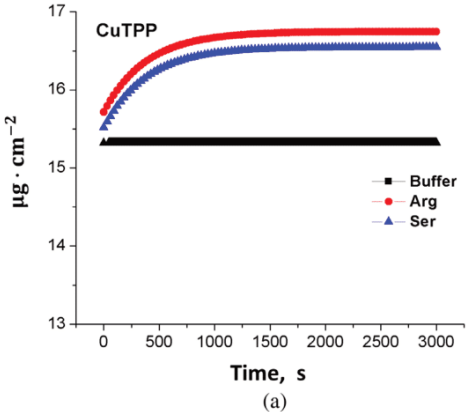


Fig. 3. QCM response for the buffer, highest adsorbed and lowest adsorbed amino acids onto (a) CuTPP, (b) H₂TPP and (c) ZnTPP.

corresponds to Arg, while Ser remains just below it in agreement with previous results [17]. Figure 3b shows the dynamic adsorption of the buffer and the Lys (highest adsorption) and Ser (lowest adsorption) amino acids on the H₂TPP film. The buffer, as expected, exhibits a linear behavior and remains at the bottom of the plot. In contrast, Ser remains constant with higher mass, but Lys

F J. M. RIVERA AND M. RIVERA

Table 3. QCM mass change for each film for the highest and lowest adsorbed amino acid. The mass difference was calculated by using the buffer as reference. An approximate number of adsorbed molecules was obtained considering their molecular weight and the film active area.

	$t = 2000 \text{ s } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	Dif., $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	MW, $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Ave. Adsorbed molecules
CuTPP				
Buffer	15.35026	N/A		
Arginine	16.71275	1.36249	174.2	4.71E15
Serine	16.51275	1.16015	105.09	6.65E15
H₂TPP				
Buffer	13.83334	N/A		
Lysine	15.65116	1.81782	146.19	7.48E15
Serine	15.13031	1.29697	105.09	7.43E15
ZnTPP				
Buffer	13.57262	N/A		
Lysine	14.29863	0.72601	146.19	2.99E15
Serine	14.11848	0.54586	105.09	3.12E15

shows a linear increase that suggests a continuous amino acid adsorption over the time of the experiment.

Finally, Fig. 3c shows the plots of the buffer, Lys (highest adsorption) and Ser (lowest adsorption) amino acids on the ZnTPP film. In this case, there is a linear constant response over the time of the experiment for the buffer. As expected, it showed the lowest adsorption, followed by Ser, and finally Lys, as observed in a previous work [17]. From these plots, the positively charged amino acids were between 1.17 and 1.4 times more selective in contrast with the polar molecule, with the CuTPP film being the most attractive surface for adsorption at short periods of time. For comparison, the mass per square centimeter for all systems was taken at 2000 s, which was further away from the injection point when the reading was stable. One important aspect to consider is that these experiments were performed with static solutions, so the asymptotic tendencies are related to either the slow interaction between the molecules and the surfaces or the depletion of the molecules in solution once most of the molecules were adsorbed on the films.

In Table 3, a summary of the calculated adsorbed mass for each surface is shown considering only the highest and lowest adsorbed amino acid from the QCM results.

From Table 3, it is clear that more serine molecules are adsorbed at the CuTPP and ZnTPP interfaces. However, due to their molecular weight in comparison with arginine and lysine, the total mass adsorbed on the films is lower for the polar molecule. In addition, the QCM data at 2000 s is at equilibrium, and from the kinetic data, the serine adsorption is unfavorable on either surface.

DFT calculations on the interaction between single porphyrin molecules with one amino acid at a time show interesting results. For the CuTPP molecule interacting with Arg, there are hydrogen interactions between the nitrogens of the macrocycle and the double amino end of the arginine. On the opposite side of the amino acid, there is an interaction between the hydrogen of the alpha carbon atom and one of the hydrogens of the phenyl lateral group. These interactions cause an important deformation of the porphyrin molecule. On the other hand, Ser exhibits a hydrogen bond interaction with a nitrogen atom of the macrocycle, while the last oxygen of the lateral chain interacts with a hydrogen of the phenyl lateral group. These forces also induce a slight deformation on the planarity of the porphyrin core.

The optimization geometry of the free-metal tetraphenyl porphyrin with lysine shows an important interaction of the lateral chain of the amino acid with the porphyrin macrocycle. In this case, the ending NH_3^+ group deprotonates and the hydrogen atom binds to one of the lone nitrogen atoms (22 or 24 by IUPAC) of the ring. This causes the porphyrin macrocycle to saddle with the N–H positions of the core pointing downwards, while the opposite sides point upwards. In this configuration, the amine and carboxyl functional groups of lysine point upwards away from the porphyrin molecule. For the H₂TPP and Ser interaction, it was observed a double hydrogen interaction between the hydrogens of the amine group and the alpha carbon of the amino acid with the two nitrogen atoms (22 and 24 positions) of the porphyrin core. On the other hand, the end of the lateral chain exhibits a hydrogen bond interaction between the oxygen of the OH group of the amino acid and one hydrogen of

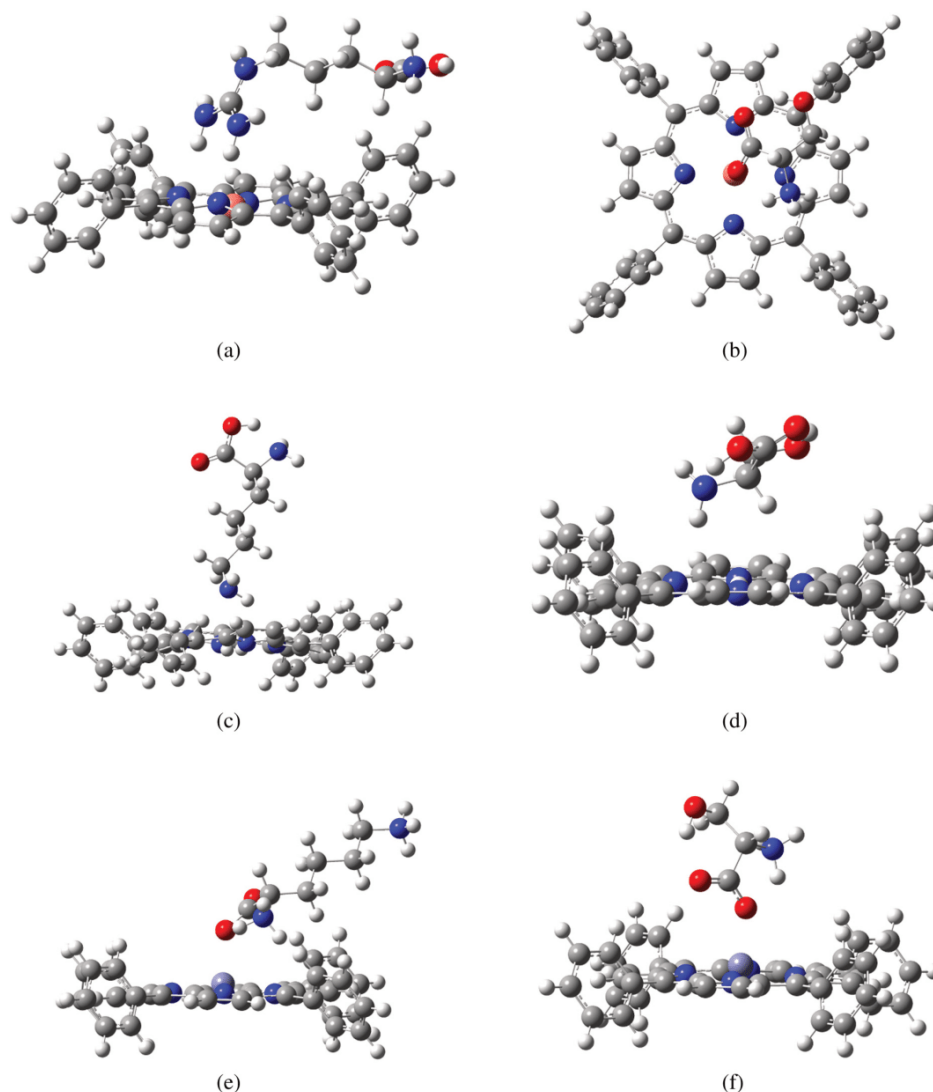


Fig. 4. Optimized geometric arrangements of the (a and b) CuTPP, (c and d) H_2 TPP and (e and f) ZnTPP systems. The highest adsorbed amino acids are in the left column (a) Arg, (c) Lys and (e) Lys), while the lowest adsorbed amino acid (Ser) is in the right column.

the phenyl lateral group. Because of these forces, a slight saddling effect is observed of less than 0.15 nm between the center and the edge of the porphyrin core.

Finally, the ZnTPP interaction with Lys and Ser showed a Zn displacement from the planar porphyrin configuration by less than 0.04 nm. In both cases, the main attraction is with the deprotonated oxygen atom of the carboxylic group. However, because of the length of the lysine lateral chain, it points upwards and between two phenyl lateral groups without any other interaction. A different configuration is observed for serine due to its smaller size, since the oxygen of the OH group interacts with a hydrogen atom from one of the phenyl lateral groups. In both cases, although the zinc atoms exhibited

some displacement from the planar configuration, the rest of the molecules do not present any other modification from their minimum energy configurations.

In Fig. 4, a schematic representation of the different molecular arrangements is shown, while in Table 3 the binding energies for all configurations are presented.

From Table 4, the stronger interactions were for the H_2 TPP/Lys system, followed by ZnTPP/Lys and CuTPP/Arg. In all cases, serine showed the lowest binding energy in comparison with the positively charged amino acids on all surfaces. It is worth noticing that the energy for the ZnTPP/Ser system is positive, suggesting an unstable interaction, which supports the low affinity of this molecule for the porphyrin films.

H J. M. RIVERA AND M. RIVERA

Table 4. Calculated binding energies for all systems by using the B3LYP/6-31(d) basis set.

System (TTP Film/Amino Acid)	Binding Energy kJ·mol ⁻¹
CuTPP/Arg	-93.57
CuTPP/Ser	-16.60
H ₂ TPP/Lys	-458.66
H ₂ TPP/Ser	-251.08
ZnTPP/Lys	-143.80
ZnTPP/Ser	192.90

CONCLUSION

Tetraphenyl porphyrin films were exposed to different amino acids to investigate their adsorption characteristics using multiple techniques. The kinetic adsorption behavior was better described for the pseudo-second-order model based on the R^2 values. This suggests that the adsorption phenomena could be considered a chemical process in all cases, where the presence of the metallic center favors the adsorption interaction at the film interface. UV-vis results showed either negligible changes (CuTPP) or small blue shifts (H₂TPP and ZnTPP) of the Soret and Q peaks. Interestingly, the largest blue shifts corresponded to the positively charged amino acids in all cases. QCM results exhibited different dynamic responses during the first minutes of interaction. In particular, the adsorption on the H₂TPP and ZnTPP surfaces showed linear responses, while the CuTPP film displayed a logarithmic type of plot. On the other hand, the adsorption onto H₂TPP suggests a fast adsorption for Ser, but a continuous increase for Lys. Finally, on the ZnTPP surface, a fast-initial adsorption for both amino acids that remained constant over the time of the experiment was observed. In all cases, the Ser response remained below the positively charged amino acids. Finally, from DFT calculations, the interaction between the films and the Arg and Lys molecules showed the largest, while serine the lowest, binding energies, as expected. From kinetic and QCM results, we infer that serine exhibits an adsorption/desorption behavior at the interfaces, which is supported by DFT calculations. Finally, the optimized configurations of the interactions exhibited coordination states with the metallic atoms, while the H₂TPP molecule mostly interacts through the inner atoms of the porphyrin core. From these results, it is clear that the central metal atom of the porphyrin influences the interaction response of the amino acid molecules in terms of its lateral chain or R groups, suggesting that metallic porphyrins are promising elements for amino acid detection.

Acknowledgments

J. M. Rivera acknowledges scholarship 283324 from CONACyT México. The authors acknowledge DGAPA-PAPIIT IN108017 and IN112420 grants, and LANCAD-UNAM-DGTIC-289 for supercomputer resources. We also thank Dr. Carlos Magaña and Dr. Samuel Tehuacanero Cuapa for SEM technical assistance, M. Sc. Jorge I. Cruz for QCM maintenance aid, and finally, Sr. Arturo Martinez for general support.

REFERENCES

- Kidera A, Konishi Y, Oka M, Ooi T and Scheraga HA. *J. Prot. Chem.* 1985; **4**: 23–55.
- Sadovnikova M and Belikov V. *Russ. Chem. Rev.* 2007; **47**: 199–212.
- Tripathy DB, Mishra A, Clark J and Farmer T. C. *R. Chimie* 2018; **21**: 112–130.
- Ferré S, González-Ruiz V, Guillaume D, Rudaz S. *J. Chromatogr. B* 2019; **1132**: 121819 (1–22).
- Pundir CS, Lata S and Narwal V. *Biosens. Bioelectron.* 2018; **117**: 373–384.
- Lin P and Yan F. *Adv. Mater.* 2012; **24**: 34–51.
- Mabeck JT and Malliaras GG. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006; **384**: 343–353.
- Maximino MD, Martin CS, Pereira MS and Aléssio P. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2019; **91**: 1–14.
- Monti D, Nardis S, Stefanelli M, Paolesse R, Di Natale C and D'Amico A. *J. Sensors* 2009; ID 856053: 1–10.
- Rivera M, Rivera JM, Amelines-Sarria O and Martínez-García M. *Bull. Mat. Sci.* 2019; **42**: 1–8.
- Whitney B, Lindsey S and Mark S. In *Porphyrins: Properties and applications. Handbook of Porphyrins: Chemistry, Properties and Applications* Vol. 1, (Kaibara AQ and Matsumara G, Eds.) Nova Biomedical: UK, 2012; pp. 429–438.
- Villari V, Mineo P, Micali N, Angelini N, Vitalini D and Scamporrino E. *Nanotech.* 2007; **18**: 375503(1–13).
- Angelini N, Micali N, Mineo P, Scamporrino E, Villari V and Vitalini D. *J. Phys. Chem. B* 2005; **109**: 18645–18651.
- Angelini N, Micali N, Villari V, Mineo P, Vitalini D and Scamporrino E. *Phys. Rev. E — Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* 2005; **71**: 021915.
- Peng X-B, Huang J-W, Li T and Ji L-N. *Inorg. Chim. Acta.* 2000; **305**: 111–117.
- Awawdeh MA, Legako JA and Harmon HJ. *Sens. Act. B* 2003; **91**: 227–230.
- Rivera JM and Rivera M. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2020; **24**: 577–588.

18. Sönmezler M, Özgür E, Yavuz H and Denizli A. *Art. Cells Nanomed. Biotech.* 2019; **47**: 221–227.
19. Mayer T, Marianov AN and Inglis DW. *Mater. Res. Express* 2018; **5**: 085201 (1–7).
20. van Staden JF and Stefan-van Staden RI. *Talanta* 2010; **80**: 1598–1605.
21. He J, Lin R, Long H, Liang Y, Chen Y. *J. Colloid. Inter. Sci.* 2015; **454**: 144–151.
22. Ngaojampa C, Namuangruk S, Surakhot Y, Promarak V, Jungsuttiwong S and Kungwan N. *Comp. Theo. Chem.* 2015; **1062**: 1–10.

.2. Técnicas de caracterización

.2.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) es una técnica muy versátil para visualizar y analizar las características micro-estructurales de muestras sólidas debido a la naturaleza de la interacción electrónica del haz con la muestra, su elevada resolución espacial y su gran profundidad de campo. Lo anterior, permite el estudio tanto de la morfología como de la composición química de una muestra. La figura 1 muestra un esquema de un microscopio electrónico de barrido [9].

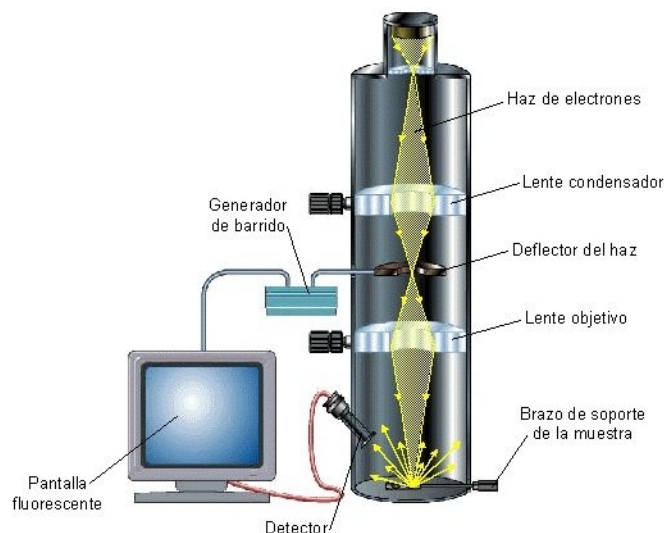


Figura 1: Esquema de un microscopio electrónico de barrido [9]

Las imágenes obtenidas por el SEM se generan por la interacción de un haz de electrones que “barre” por un área determinada sobre la superficie de la muestra. Debido a la interacción entre los electrones y el material bajo estudio, se producen en la superficie de éste último diversos tipos de señales que son captadas con diferentes detectores. Las señales son analizadas y proporcionan información acerca de la naturaleza de la muestra. Básicamente son tres las señales de alta importancia recolectadas por el SEM, a saber, electrones retrodispersados, electrones secundarios y rayos X característicos [1, 8, 9]

La señal de electrones secundarios proporciona una imagen de la morfología superficial de la mues-

tra, es decir, mediante esta señal se obtiene la imagen más nítida de la superficie del material. Se considera un electrón secundario aquel que emerge de la superficie de la muestra con una energía inferior a 50 eV. Dependiendo del haz emergente del filamento del microscopio, se generan choques inelásticos en donde parte de esta energía se colecta en el detector, y otra parte se disipa en el material [1, 9]

Por otro lado, la señal correspondiente a los electrones retrodispersados entrega una imagen cualitativa de zonas en el material con distinto número atómico. Esta señal está compuesta por aquellos electrones que emergen de la muestra con una energía superior a 50 eV (en promedio dependiendo del detector). Estos electrones proceden en su mayoría del haz incidente que rebota en el material, es decir, son producto de choques elásticos, ya que el electrón no disipa energía al material. La intensidad de la señal de retrodispersados para una energía dada del haz, depende del número atómico del material, esto es, a mayor número atómico mayor intensidad[9, 1]. Este hecho permite distinguir fases de un material de diferente composición química. La figura 2 esquematiza la interacción entre el haz de electrones y una muestra sólida.

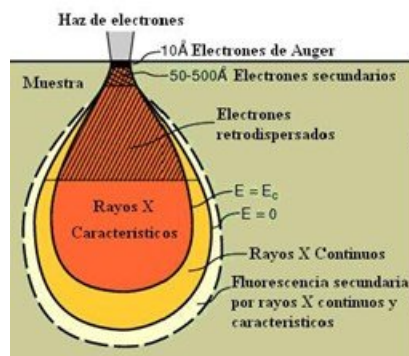


Figura 2: Esquema de la interacción entre un haz de electrones y una muestra sólida [9]

2.2. Microscopia de Fuerza atómica (AFM)

La caracterización por microscopia de fuera atómica es de gran utilidad en la visualización de la morfología o de las propiedades superficiales a escala nanométrica de una superficie. En ocasiones, dependiendo de las condiciones de interacción, se pueden alcanzar resoluciones inferiores a un nanómetro. A diferencia de otros microscopios, se pueden caracterizar muestras en diferentes

medios como vacío, aire, o en líquidos. Una de sus grandes ventajas es que debido a que no existe el uso de lentes, los efectos de difracción e interferencia no influyen en la resolución del equipo. La figura 3 muestra el esquema de un microscopio de fuerza atómica. Adicionalmente, es la única técnica que a la fecha permite obtener el relieve de superficies en tres dimensiones con una muy alta resolución espacial. La información de la altura, se ve reflejada en una escala de colores arbitrarios en donde por convención, zonas claras corresponde a crestas y zonas oscuras a depresiones en la superficie [1, 9].



Figura 3: Esquema de funcionamiento de un microscopio de fuerza atómica [9]

El microscopio de fuerza atómica cuenta con diversos modos de trabajo con los cuales se obtiene información diversa; uno de ellos es el modo intermitente o “tapping” (figura 4). En este modo, la punta oscila perpendicularmente a la muestra en su frecuencia de resonancia con amplitud libre. Cuando la punta se acerca a la superficie de la muestra, la amplitud decrece debido a la interacción entre la punta-muestra. La amplitud puede variar entre los 100 y 200 nm. En este modo de trabajo, la punta golpea intermitentemente la superficie disminuyendo el tiempo de contacto entre ambas partes. Con este modo de barrido, se eliminan las fuerzas laterales y de presión que pueden dañar muestras suaves, y ocasionar una reducción en la resolución de la imagen.

La imagen obtenida mediante el AFM ofrece información de gran relevancia ya que permite la observación clara de los relieves de la muestra, y por tanto, proporciona una excelente estimación de la rugosidad. Esta información es de gran utilidad, ya que muchas propiedades físicas de las superficies están íntimamente ligadas al espesor de las películas y su rugosidad. Por ejemplo, las pruebas eléctricas en donde se busca tener un área regular y bien definida para hacer más efi-

ciente el transporte de carga en la superficie del material, dependen fuertemente de la rugosidad interfacial[1, 9].

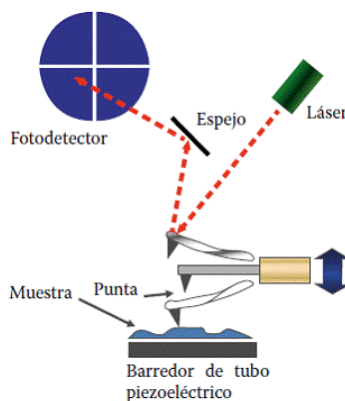


Figura 4: Esquema de la interacción punta-muestra en modo intermitente de un AFM

.2.3. Espectroscopia Ultravioleta-visible

En la caracterización por espectroscopia ultravioleta-visible se usa el espectro electromagnético en el rango de longitudes de onda desde los 290 hasta los 1100 nm; esta técnica es útil para identificar las transiciones electrónicas en diferentes moléculas, y para determinar la cantidad de compuestos orgánicos altamente conjugados presentes en la muestra de estudio. Además, debido a que la espectroscopia UV-Vis mide las transiciones electrónicas de las moléculas cuando están absorbiendo luz tanto en la región ultravioleta como en el visible, esta técnica es de gran utilidad para determinar la energía de activación óptica en ciertas muestras semiconductoras [1].

El espectrofotómetro de UV-Vis opera con dos fuentes que emiten un haz de luz con longitudes de onda entre 190 y 1100 nm. La primera es una lámpara de arco de deuterio que emite para la región ultravioleta (190-380 nm), y la segunda, es una lámpara incandescente para las longitudes de onda en el rango del visible (380-1100). Un monocromador separa las diferentes longitudes de onda contenidas en el haz que permite el paso de sólo un haz con una determinada longitud de onda. Así, el haz incide en la muestra, la cual permitirá que cierta cantidad de haz incidente pase a través de ella o que sea absorbida [1, 9]. Lo anterior, dará lugar a un espectro de absorbancia o transmitancia de la muestra. La figura 5 muestra el esquema básico de un espectrofotómetro

UV-Vis.

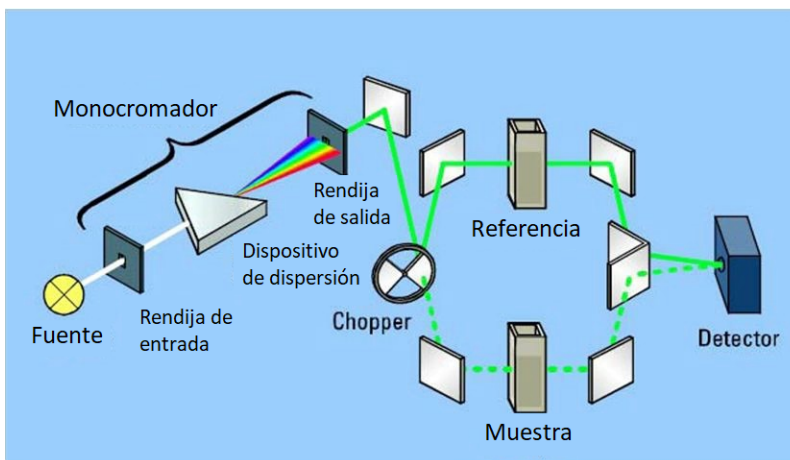


Figura 5: Esquema básico de los componentes y el funcionamiento de un espectrofotómetro UV-Vis [9]

.2.4. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto convencional es una propiedad termodinámica que provee una definición inequívoca de la mojabilidad de una interfase sólido-líquido. La mojabilidad se define como la tendencia de un fluido a esparcirse o adherirse a una superficie sólida. La comprensión del equilibrio del ángulo de contacto es uno de los problemas fundamentales de la ciencia de superficies, ya que afecta a todos los procesos que involucran sistemas trifásicos [40]. Es uno de los más antiguos problemas en la teoría de ciencia de superficies.

Los problemas fundamentales asociados con el equilibrio del ángulo de contacto pueden ser divididos en dos grupos: aquellos relacionados con la estructura y la constitución de la superficie del sólido, y los asociados con las interacciones mutuas de las tres fases en las proximidades de la línea de contacto [40].

De manera simplificada, en la figura 6 se muestran dos gotas cuyo comportamiento sobre la superficie de un material es hidrófobo e hidrófilo, respectivamente. Se dice que la superficie tiene un carácter hidrófobo cuando el líquido no se esparce sobre la superficie, por lo tanto, la superficie no se moja. Además, el ángulo medido es alto, hay una pobre adhesividad y la energía superficial

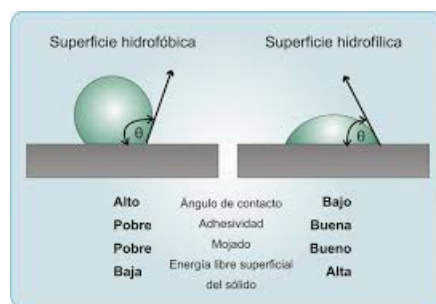


Figura 6: Esquema del comportamiento de un líquido sobre una superficie hidrofóbica e hidrofílica [40]

del sólido es baja. Por otro lado, la superficie tiene un comportamiento hidrófilo si el líquido se esparce sobre la superficie haciendo que la superficie se moje. Aquí, el ángulo de contacto es bajo, haya muy buena adhesividad y la energía superficial del sólido es alta [40].

.2.5. Microbalanza de cuarzo

En 1959, Sauerbrey introdujo un nuevo método para mediciones de masa. En lugar de medir el ángulo de inclinación de una balanza o el desplazamiento en caso de una balanza de resorte, utilizó el cambio en la frecuencia de un resonador de cuarzo. Por lo tanto, le fue posible detectar incluso cambios de 10^{-16} Kg en masa. Su desarrollo generó lo que hoy se conoce como la microbalanza de cuarzo o QCM (Quartz Crystal Microbalance por sus siglas en inglés), demostrando la naturaleza extremadamente sensible de estos dispositivos piezoeléctricos hacia los cambios de masa en la superficie de sus electrodos (figura 7)[39].

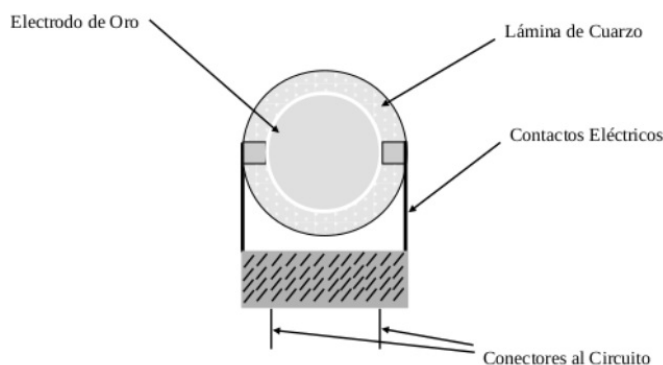


Figura 7: Esquema del cristal de cuarzo en una QCM [39]

Los resultados de su trabajo quedaron incorporados en la ecuación que lleva su nombre, y que

relaciona el cambio de masa por unidad de área en la superficie del electrodo QCM con el cambio observado en la frecuencia de oscilación del cristal [38, 39]:

$$\Delta f = -Cf * \Delta m \quad (1)$$

Donde,

Δf = cambio observado en la frecuencia (en Hz)

Δm = cambio de masa por unidad de área (g/cm^2)

Cf = factor de sensibilidad del cristal ($56.6 \mu\text{g}^{-1}\text{cm}^2$ para un cristal de 5 MHz a temperatura ambiente [39]).

Los cristales de cuarzo se usan debido a sus propiedades mecánicas y piezoeléctricas superiores. También, pueden ser fabricados para dar coeficientes de temperatura cercanos a cero a temperatura ambiente. Esto, permite excluir de las variables a la temperatura, la cual podría influir en la resonancia de la QCM modificando sus parámetros. Los cristales de cuarzo cuentan con electrodos en forma de orificios de llave en ambas caras (la parte trasera además cuenta con dos medias lunas), y están formadas por películas de oro o plata depositadas al vacío de aproximadamente 150 nm de espesor. El área sensible a la masa está situada en la parte central del resonador cubriendo aproximadamente el área donde se superponen los dos electrodos, y siguiendo una distribución gaussiana partiendo del centro [35].

Por muchos años, la QCM fue utilizada sólo para detectar los cambios en masa de sustancias en fase gaseosa. Sin embargo, recientemente su aplicación ha sido extendida desde que los científicos notaran que podía ser operada en contacto con líquidos y materiales viscoelásticos. El desarrollo de sistemas QCM para su uso en fluidos abrió un nuevo mundo de aplicaciones en muchas áreas del conocimiento (figura 8).

El uso de la QCM en contacto con líquidos se ha enfocado en el estudio de los cambios en las propiedades de masa durante los procesos físicos, químicos y electroquímicos de la superficie de la muestra. Cuando el cristal de cuarzo está en contacto con un líquido, la amplitud de vibración y la

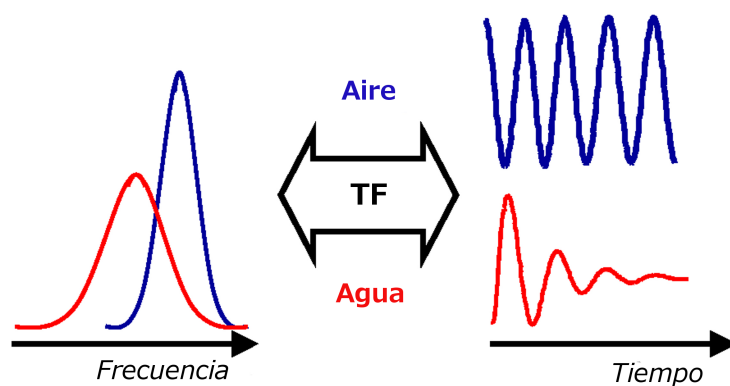


Figura 8: Diferencia de señales de resonancia en aire y agua para una QCM [39].

aceleración decaen exponencialmente. Sin embargo, la aplicación de sensores QCM en líquido ha proporcionado nuevas posibilidades analíticas para la industria química, la protección del medio ambiente, la biotecnología y la medicina, entre muchos otros.

Otra de las grandes aplicaciones con las que se puede utilizar la QCM es por medio del recubrimiento de películas depositadas en la superficie del cristal de cuarzo para su uso como sensores. Para esta aplicación, la película depositada debe adherirse a la superficie del cristal de cuarzo para tener la misma respuesta que el disco original.

Los polímeros orgánicos comprenden el tipo de recubrimiento más común utilizado en la QCM debido a su capacidad de absorber moléculas. Cuando el cristal de cuarzo recubierto por la película orgánica está en contacto con un líquido, la rugosidad o grietas generadas por la película depositada pueden atrapar moléculas del líquido, que vibrarán con la misma amplitud y aceleración que la superficie del cristal de cuarzo. Estas moléculas atrapadas exhibirán un comportamiento de película sólida, produciendo un cambio de frecuencia adicional [36].

Las propiedades de estas películas se pueden aprovechar para hacer mediciones cinéticas del cambio en el peso o espesor de la película por la acumulación de moléculas absorbidas del líquido a la película. Esto puede ser de utilidad si se busca caracterizar la cinética de absorción de la película, y así, poder ver su comportamiento de absorción a través de un tiempo determinado. La respuesta universal del dispositivo es la razón de su amplia gama de aplicaciones en la tecnología.

Hasta el momento, se han descrito las grandes características que hacen de la QCM un método de medición preciso y bastante útil. Sin embargo, es necesario mencionar una de las pocas desventajas en el uso de la QCM, es que cualquier cosa que tenga masa puede generar una respuesta en el sensor QCM. Sin embargo, la desventaja de tal sensibilidad universal es que siempre se tiene un peligro de interferencia. A pesar de ello, en la mayoría de los casos, esta interferencia se puede reducir casi hasta su eliminación con la utilización de dispositivos adecuados que impidan la interferencia de moléculas ajenas al estudio en cuestión por medio de barreras físicas.

Para tomar en cuenta la sensibilidad que presenta una QCM se ha descrito que el cambio mínimo detectable es en promedio de unos pocos ng/cm^2 , y está limitado por las especificaciones del ruido del oscilador de cristal y la resolución del contador de frecuencia utilizado para medir los cambios.

Ahora, enfocándose en el otro extremo de la detección, es decir, en la carga máxima que se puede tener en una QCM, esta depende de dos factores: de la amortiguación total o la pérdida de la sensibilidad. Para materiales altamente viscosos o sólidos, la amortiguación del cristal aumenta al aumentar el espesor de la capa. A cierto espesor, la amortiguación se vuelve tan alta que el cristal ya no puede ser impulsado, es decir, la medición falla debido a la falta de oscilación.

Además, en el uso de la QCM con líquidos se deben de evitar cambios en la temperatura, el flujo de inyección, las propiedades del disolvente y la formación de burbujas de aire que pueden afectar la señal del sensor.

.2.6. Cálculos DFT

La química computacional es un área de la química que hace uso de modelos matemáticos para simular las interacciones entre los átomos de las sustancias entre sí. Dentro de los modelos existentes, la teoría de los funcionales de la densidad (DFT por sus siglas en inglés) permite el cálculo de sistemas de muchos cuerpos, especialmente con grandes números de electrones y átomos. DFT es una teoría muy importante en el campo de la química y física molecular pues permite calcular las

interacciones electrónicas, y con ello, las interacciones entre las moléculas. Esta teoría nació en 1927 cuando fue propuesta por Thomas y Fermi, y fue extendida posteriormente por Dirac. Sin embargo, no fue hasta los años sesenta que la teoría fue reformulada para ser entendida como lo hacemos ahora gracias a los teoremas de Hohenberg y Kohn.

La aportación primordial que realizaron Hohenberg y Kohn, con contribuciones de Sham, fue reescribir el problema de forma que los parámetros del sistema dependieran de la densidad electrónica, en vez de las posiciones de los electrones. La energía también se reescribe de esta forma, de modo que ahora depende de la densidad, y se convierte en un funcional de energía.

Para calcular la energía y la densidad de la forma más precisa posible, se han realizado muchas aproximaciones del potencial y se han definido muchas bases de orbitales para emular lo mejor posible a los sistemas reales. De esta forma, se ha podido conseguido simplificar enormemente un problema con muchísimos grados de libertad, y calcular un número muy alto de interacciones entre distintas moléculas.

Aunque existen muchos programas que permiten el uso de la técnica DFT para cálculos moleculares, el programa Gaussian es uno de los más empleados por su sencillez y buenos resultados. Cabe señalar que Gaussian está diseñado para estudiar sistemas en fase gaseosa y en solución, en el estado fundamental y estados excitados; lo que permite explorar áreas de interés químico como efectos del sustituyente, mecanismos de reacción, superficies de energía potencial, energías de excitación, energías de enlace, etc. Además, tiene incorporadas muchas librerías que permiten escoger diferentes funcionales y bases para adecuar mejor las simulaciones al sistema de trabajo [37].

En la figura 9, se muestran la estructura de una porfirina, sus orbitales HOMO y LUMO, así como varias transiciones electrónicas de una ZnTPP obtenidos mediante calculos DFT.

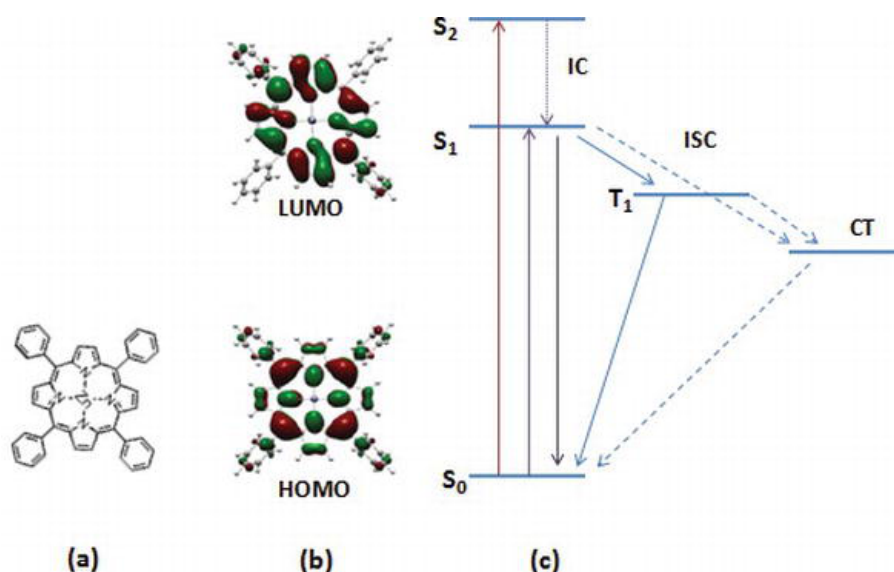


Figura 9: a) Molécula ZnTPP, b) Orbitales HOMO y LUMO, c) Transiciones electrónica calculadas para un proceso de relajación [41] .

.3. Fundamentos de adsorción

La adsorción es la adherencia o la retención de una capa fina de moléculas de un gas o un líquido en contacto con una superficie sólida, como resultado del campo de fuerza en esa superficie. La superficie del sorbente puede presentar afinidades diferentes a los diversos componentes del fluido, y provoca que la composición de la capa adsorbida sea diferente a la composición del seno del fluido. Este fenómeno es un excelente medio de remoción de contaminante o para el diseño de dispositivos sensibles a una molécula en particular, como es el caso de este proyecto.

Las superficies de los sólidos son capaces de fijar átomos o moléculas que se encuentran en sus alrededores. Por lo tanto, el sólido recibe el nombre de adsorbente y los elementos que han sido fijadas en la superficie, adsorbato.

.3.1. Tipos de adsorción

Se reconoce la existencia de dos tipos principales de adsorción: la fisisorción y la quimisorción. Ésta, va a depender de la naturaleza de las fuerzas superficiales entre el adsorbente y el adsorbato.

La fisisorción también es conocida como adsorción física o adsorción de Van der Waals. Esta adsorción sirve para concentrar las moléculas de una sustancia en la superficie y no depende de una manera definitiva de las irregularidades en la naturaleza de la superficie, sino que, por lo general, es proporcional a la extensión de la superficie. La cantidad de adsorción no se limita a una capa monomolecular en la superficie del sólido. Así, a medida que las capas de moléculas se depositan en la superficie sólida, el proceso va pareciendo cada vez más a una condensación.

El fenómeno de quimisorción fue considerado por primera vez en 1912 por el químico estadounidense Langmuir, quien lo definió como la formación de enlaces químicos entre el sorbato y la superficie del sólido. Tales interacciones son fuertes, altamente específicas y a menudo no son fácilmente reversibles.

Una secuela de la quimisorción es que después de que la superficie se ha recubierto con una sola capa de moléculas adsorbidas, queda saturada; sólo puede ocurrir adsorción adicional sobre la capa ya presente, y en general, es de tipo débil. Debido a ello, es que Langmuir insistió en que la quimisorción incluye la formación de una capa unimolecular.

.3.2. Isotermas de adsorción

La relación entre la cantidad de sustancia adsorbida por un adsorbente y la presión o concentración de equilibrio a una temperatura constante se denomina isoterma de adsorción. Braunauer las clasificó en cinco tipos de isotermas.

Isoterma tipo I

La figura 10 muestra la isoterma de Langmuir, y representa el comportamiento del nitrógeno a -195°C o del oxígeno a -183°C sobre carbón. Se obtiene cuando la adsorción está restringida a una capa de espesor monomolecular. Frecuentemente, sólo se representa en la quimisorción o fisisorción sobre sólidos porosos de superficies muy grandes por unidad de peso.



Figura 10: Isotermas de adsorción tipo I

Isoterma tipo II

Este tipo de isoterma es muy frecuente y caracteriza por la adsorción física en multicapas sobre sólidos poco porosos. Su comportamiento se muestra en la figura 11. Aquí, se representa la adsorción del nitrógeno sobre un catalizador de hierro, de sílice u otras superficies a -195°C .



Figura 11: Isotermas de adsorción tipo II

Isotermas tipo III, IV y V

Las isotermas de tipo III y V, muestran la deficiente afinidad del sólido por el soluto, principalmente en la primera capa molecular. Estas isotermas son poco frecuentes. La isoterma de tipo III representa el comportamiento para el bromo a 79°C y el yodo sobre un gel de sílice. La isoterma IV muestra la forma para el benceno sobre un gel de óxido férrico a 50°C ; esta isoterma deja de crecer cerca de la concentración de saturación, pero la superficie cubierta puede adsorber otra capa monomolecular de adsorbato. Todos estos comportamientos están representados en la figura 12

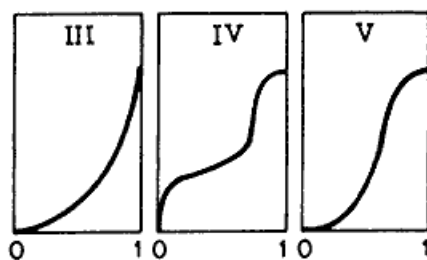


Figura 12: Isotermas de adsorción tipo III, IV y V

.3.3. Modelos de isotermas de adsorción

Los dos modelos más comunes para describir este sistema son Langmuir y Freundlich, aunque existen otras ecuaciones de isotermas disponibles para analizar los datos de equilibrio de adsorción experimental, como son las isotermas de Toth, Dubinin-Radushevich y Temkin.

.3.4. Modelo de Langmuir

El modelo más importante de adsorción en monocapa fué el desarrollado por Langmuir en 1918, donde considera la adsorción de un gas ideal sobre una superficie idealizada. Se basa en la supoción de que la adsorción sólo puede ocurrir en un número fijo y definido de sitios. En este caso, cada uno de los sitios puede ser ocupado solamente por una molécula de adsorbato (monocapa) y no hay interacción entre sitios adyacentes.

Puesto que la adsorción se limita a capas monomoleculares, la superficie puede dividirse en dos partes. Estableciendo equilibrio, es decir, de manera tal que la velocidad a los cuales las moléculas chocan con la superficie y permanecen en ella por una cantidad apreciable de tiempo, y se equilibran exactamente con la velocidad a la que las moléculas se desprenden de la superficie.

La velocidad de adsorción será entonces proporcional a la concentración de las moléculas en la fase líquida o gaseosa C_e . También será proporcional a la fracción de superficie que no está cubierta, representada por $1 - q_e$, ya que q_e representa la fracción cubierta por la capa monomolecular de moléculas adsorbidas. Por tanto, la velocidad de adsorción V_a está dada por:

$$V_a = k_a C_e (1 - q_e) \quad (2)$$

Donde k_a es una constante de la velocidad que se relaciona con el proceso de adsorción. La velocidad de desorción V_d es proporcional solamente al número de moléculas unidas a la superficie.

$$V_d = k_d q_e \quad (3)$$

Donde k_d es una constante de velocidad para el proceso de desorción. En el equilibrio, las velocidades de adsorción y desorción son iguales. Como consecuencia se tiene la siguiente ecuación.

$$K_a C_e (1 - q_e) = K_d q_e \quad (4)$$

Reagrupando términos se tiene:

$$\frac{q_e}{1 - q_e} = \frac{K_a}{K_d} C_e \quad (5)$$

La relación K_a/K_d es una constante de equilibrio que se suele representar como K_L . Entonces, se tiene la siguiente ecuación que se conoce como isoterma de Langmuir.

$$q_e = \frac{K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (6)$$

La fracción de superficie cubierta también se denomina θ y relaciona la cantidad de sitios activos ocupados con respecto a los centros activos totales, entonces se tiene:

$$q_e = \frac{\theta}{a_m} \quad (7)$$

Las últimas dos ecuaciones se pueden combinar, obteniéndose la siguiente expresión:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L a_m} + \frac{C_e}{a_m} \quad (8)$$

Otra forma de linealizar la isoterma es:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L} + \frac{a_m}{K_L} C_e \quad (9)$$

Si ahora se gráfica C_e con respecto a C_e/q_e , se obtiene una linea recta con pendiente a_m/K_L y ordenada al origen $1/K_L$. Aquí, C_e es la concentración de soluto (ppm), q_e es la concentración de soluto adsorbido por unidad de área de adsorbente (ppm/m^2), K_L/a_m es la capacidad de adsorción o la capacidad de monocapa (ppm/m^2), y K_L es la constante de Langmuir (L/m^2).

.3.5. Modelo de Freundlich

La más importante isoterma de adsorción multisitios para superficies heterogéneas es la isoterma de adsorción de Freundlich:

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad (10)$$

Se puede linealizar la ecuación anterior empleando logaritmos a fin de obtener los valores de los parametros K_F y $1/n$.

$$\text{Log} q_e = \text{Log} K_F + \frac{1}{n} \text{Log} C_e \quad (11)$$

Si se grafica $\text{Log } C_e$ se grafica en función del $\text{log } q_e$, se obtiene una recta con pendiente $1/n$ y

ordenada al origen $\log K_F$. Aquí, K_F es una constante relacionada con la capacidad de adsorción y n un parámetro empírico relacionado con la intensidad de la adsorción, el cual varía con la heterogeneidad del adsorbente. Para valores de $1/n$ que se encuentren en el intervalo de 0.1 a 1.0, se dice que la adsorción es favorable.

.4. Cinética química

.4.1. Velocidad de reacción

Toda reacción se efectúa a una velocidad característica. Algunas son más rápidas y otras son extremadamente lentas. Tanto el estudio de la velocidad como los mecanismos de reacción son los temas más fundamentales de la cinética química.

La velocidad de una reacción es variable y depende de la concentración de las especies que reaccionan, la temperatura, la presencia de catalizadores y la naturaleza de los reactivos. En la figura 13 se representa la rapidez de una reacción química, la cual se define como el cambio en la concentración de los reactivos y/o productos en función del tiempo.

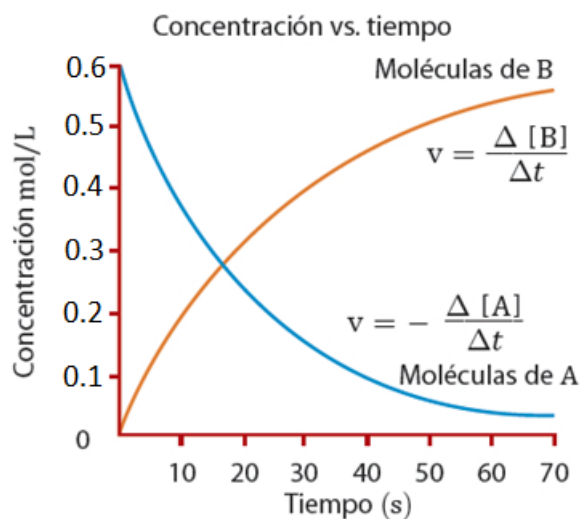
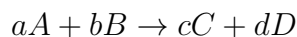


Figura 13: En esta imagen se aprecia como la concentración del reactivo A disminuye, mientras que la concentración del reactivo B aumenta con el paso del tiempo.

.4.2. Ley de velocidad o ecuación de velocidad

Es una expresión matemática que se obtiene de datos experimentales.

$$v = f(\text{concentración de reactivos})$$



$$v = K[a]^\alpha [B]^\beta$$

De donde:

v = velocidad de reacción en unidades de concentración/tiempo

α, β = órdenes parciales

$\alpha + \beta$ = orden total de la reacción

k = constante de rapidez, sus unidades dependen del orden de la reacción

La dependencia de la velocidad de la reacción con las concentraciones de los reactivos es conocida como orden de reacción.

.4.3. Modelos cinéticos de adsorción

La cinética de adsorción se utiliza para describir la tasa de adsorción de un adsorbato en el adsorbente, para explorar la característica de adsorción y sus mecanismos. En la literatura no se encontraron ejemplos de la interacción de películas de porfirinas con aminoácidos en disolución acuosa. Sin embargo, un estudio de cinética de adsorción de aminoácidos en cristales monohidratados de oxalato de calcio (CaO_x), en los cuales se utilizaron los modelos cinéticos de pseudo-primer orden y pseudo-segundo orden para interpolar la difusión cinética [30]. En base a estos estudios, se decidieron utilizar dichos modelos para comprender los fenómenos cinéticos que ocurren en la adsorción de aminoácidos en películas de porfirinas.

Cinética de reacción de pseudo-primer orden

De acuerdo con la literatura, el modelo cinético de pseudo-primer orden se basa en el supuesto de que la adsorción sigue la fisisorción y puede ser expresado como:

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (12)$$

La forma lineal del modelo cinético de pseudo-primer orden se escribe de la manera siguiente:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (13)$$

Donde q_e y q_t representan la cantidad de adsorbato adsorbido en el equilibrio y en cualquier tiempo (t), respectivamente. $k_1(1/s)$ es la constante de adsorción del pseudo-primer orden de reacción. Los valores de k_1 son calculados de la gráfica de $\ln(q_e - q_t)$ contra t .

Cinética de reacción de pseudo-segundo orden

El modelo cinético de pseudo-segundo orden se basa en el supuesto de que la adsorción sigue un proceso de quimisorción. La ecuación respectiva se escribe de la siguiente manera:

$$q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{1 + q_e k_2 t} \quad (14)$$

Pudiendose reescribir en su forma lineal como:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (15)$$

De donde q_e y q_t ya fueron definidas anteriormente y $k_2(s * m^2/ppm)$ es la constante de adsorción cuyo valor esta definido por la gráfica de t/q_t contra t .