



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Matrices orgánico-inorgánicas como sensores-reguladores
de glucosa y fenoles.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Físico

P R E S E N T A:

Gabriel Isai Pérez Ruiz



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Enrique Jaime Lima Muñoz
2012**



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Pérez

Ruiz

Gabriel Isai

55 90 86 97

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de ciencias

Física

302111916

2. Datos del Tutor

Dr.

Enrique Jaime

Lima

Muñoz

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Silvia

Bulbulian

Garabedian

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Ariel

Guzmán

Vargas

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Pedro

Bosch

Giral

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Vivianne

Marquina

Fábrega

7. Datos del trabajo escrito

Matrices orgánico-inorgánicas como sensores-reguladores de glucosa y fenoles.

78p

2012

Agradecimientos.

A mis padres, Lucia y Alberto, por todo su amor, apoyo y dedicación hacia mí y mis hermanos en todos los aspectos de nuestras vidas.

A mis hermanos, Alejandro e Isaac, que siempre han sido mi apoyo y cómplices en todos mis disparates.

A Ahiram, por todos los momentos geniales que hemos pasado juntos, por su amor y apoyo que me ha brindado desde el día que nos conocimos.

A mi tutor el Doctor Enrique Jaime Lima Muñoz por su infinita paciencia, dedicación y experiencia para la realización de esta tesis. Así como al Doctor Pedro Bosch Giral por presentarnos.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales en donde se desarrollo esta tesis con ayuda de sus instalaciones.

A mis profesores en general de los cuales he tenido el placer de ser su alumno.

A la Facultad de Ciencias por formar científicos de calidad.

A todos los amigos que conocí durante la carrera, que directa e indirectamente me enseñaron mucho, por ser mis compañeros de estudio.

A Gerardo Cedillo, Marco Antonio Vera y Omar Novelo por su asistencia técnica, sin ellos esta tesis no se habría podido realizar.

Al CONACYT por el apoyo con la beca del proyecto CB2009/128299.

Al Instituto Nacional de la Juventud del Distrito Federa (INJUVE-DF) por incluirme en sus programas de apoyo a los jóvenes.

Y por ultimo pero no por eso menos importante a la Universidad Nacional Autónoma de México, por su apoyo desinteresado durante mis estudios de preparatoria y licenciatura.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Materiales híbridos	3
2.2 Hidrogeles orgánicos con propiedades “estímulo-respuesta”	6
2.2 Fenoles	8
2.3 Glucosa.....	11
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	14
3.1 Síntesis del ácido 3-acril amido-fenilborónico(APBA).....	14
3.2 SÍNTESIS DE LA RED DE SÍLICE.....	16
3.2.1 Síntesis de sílice porosa (SiO ₂)	16
3.2.2 Síntesis de sílice porosa con APBA (SiO ₂ -APBA)	17
3.2.3 Síntesis de sílice porosa funcionalizada con APBA y alanina	17
3.2.4 Síntesis de sílice porosa funcionalizada con APBA e insulina	18
3.3 Síntesis de microgel de poli n-isopropilacrilamida (p-NIPAM)..	19
3.3.1 p-NIPAM funcionalizado con APBA (p-NIPAM-APBA)	19
3.3.2 p-NIPAM funcionalizado con APBA e insulina (p-NIPAM-APBA-insulina).....	21
3.3.3 p-NIPAM funcionalizado con APBA y alanina (p-NIPAM-ala).	21
3.3 CARACTERIZACIÓN	22
3.4.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)	22
3.3.1 Dispersión de rayos X para ángulos pequeños (SAXS)...	23
3.3.2 Microscopio electrónico de barrido (SEM)	24
3.4 EVALUACIÓN DE LOS MATERIALES COMO SENSORES	25
4. RESULTADOS	27
4.1 Materiales.....	27
4.1.1 APBA.....	27
4.1.2 Construcción del sensor SiO ₂ -APBA-Ala	28
4.1.3 SiO ₂ -APBA-insulina.....	35
4.1.4 p-NIPAM-APBA	38

4.1.5 p-NIPAM-insulina.....	40
4.1.6 PNIPAM-APBA-Alanina.....	41
4.2 Evaluación de los materiales híbridos como sensores	43
4.2.1 Sistemas (SiO ₂ -APBA-Ala)-fenoles	43
4.2.2 Sistema (SiO ₂ -APBA-Ala)-glucosa.....	53
4.2.3 Sistema (SiO ₂ -APBA-insulina)-glucosa	54
4.2.4 Sistema (p-NIPAM-insulina)-Glucosa.....	55
4.2.5 Sistema (p-NIPAM-alanina)-pyrocatecol	56
5. Conclusiones.....	58
6. Bibliografía	59
7. Apéndices.....	63
Apéndice A.....	63
Apéndice B.....	67
Apéndice C.....	72
Apéndice D.....	77

1. INTRODUCCIÓN

La combinación, en un solo material, de componentes inorgánicos y orgánicos, e incluso bioactivos, abrió a la ciencia de materiales numerosas aplicaciones en diversas áreas incluyendo óptica, catálisis, membranas, sensores, entre otras [1,2]. Por ejemplo, algunos materiales híbridos tienen excelente fotoestabilidad, respuestas fotocromáticas muy rápidas, o actúan como sensores [3,4]. En este sentido, existen sistemas químicos que son difíciles de detectar; los fenoles, por ejemplo, son tóxicos para los organismos vivos y son uno de los grupos más contaminantes en la industria química. Así, se encuentran frecuentemente contaminando efluentes acuáticos y es deseable detectarlos y por supuesto eliminarlos, incluso a baja concentración. Algunos fenoles, particularmente catecoles, dañan significativamente al ADN [5]. Sin embargo, los fenoles son frecuentemente difíciles de detectar y algunas veces la exposición a ellos se está ignorando y sin saberlo se está promoviendo una bio-acumulación y por tanto un deterioro de la salud.

Una vía para eliminar los fenoles es su oxidación por óxidos metálicos. En la presencia de oxígeno disuelto y una relación alta óxido/fenol, la oxidación es total y conduce a la formación de CO₂. Durante la oxidación de fenoles, los metales se reducen y es necesario un tratamiento alcalino para re-oxidarlos a su estado de oxidación original. Este procedimiento es particularmente eficiente en la descontaminación de suelos [6]. En el caso de la oxidación de fenoles en medio acuoso se requieren a menudo temperaturas altas.

Entonces, es importante establecer un método rápido para detectar fenoles y su eventual eliminación o conversión química. Así

que, para detectarlos se han propuesto varios métodos analíticos espectrofotométricos y electroquímicos, principalmente. No existe, sin embargo, un método que incluya el uso de materiales inteligentes que detecten y complementariamente neutralicen a los fenoles presentes en solución.

Por otra parte, la glucosa es también una molécula objetivo que es deseable detectarla y neutralizarla en un medio biológico [7]. Este reto se presenta en el marco de las investigaciones para proponer tratamientos alternativos a la diabetes, específicamente se busca un material que regule la liberación de insulina cuando se detecta un nivel elevado de glucosa. Los materiales que se han propuesto hasta ahora son principalmente polímeros [8,9] y no han sido del todo satisfactorios ya que si bien responden a la concentración de glucosa, también varían mucho su grado de hidratación y su sensibilidad disminuye.

Así, la investigación permanece abierta para encontrar materiales sensores-reguladores de glucosa y fenoles, entre otras muchas moléculas objetivo.

Precisamente, es en este contexto que se desarrolla esta tesis, el diseño de materiales híbridos bifuncionales, sensibles a la presencia de fenoles y/o glucosa y que reaccionen con estos compuestos para neutralizarlos. El diseño se basa en alanina y ácido acrilamidofenilborónico anclados o atrapados en la superficie o poros de una matriz de sílice.

2. ANTECEDENTES

2.1 Materiales híbridos

La combinación en un solo material de las propiedades inorgánicas y orgánicas o biológicas de diferentes componentes es una estrategia para el diseño de materiales avanzados con aplicaciones diversas: mejoramiento de la estabilidad térmica y mecánica, modulación del índice de refracción, mejoramiento de las propiedades magnéticas, accesibilidad a una red porosa para sensores o catalizadores, entre otras [10,11]. La adición de componentes orgánicos modifica las propiedades fisicoquímicas específicas de las matrices inorgánicas [12,13]. Las metas más comunes que mueven a la preparación de materiales orgánico-inorgánicos es potenciar las propiedades eléctricas, ópticas, electroquímicas o la reactividad química y bioquímica, etc.

El interés por los materiales híbridos no es solo el confinamiento de algunas propiedades fisicoquímicas sino también el gran potencial que ofrecen para acoplar las propiedades de sistemas simples con las propiedades de sistemas fisicoquímicos complejos. Así, con procedimientos químicos simples se pueden preparar materiales híbridos inspirados en procesos biológicos [14,15].

Tiene que quedar claro que los materiales híbridos orgánico-inorgánicos no son mezclas físicas, sino que pueden definirse como nanocompositos a la escala molecular, teniendo al menos un componente, orgánico o biológico, adicionado al componente inorgánico [16]. Las propiedades de los materiales híbridos no resultan simplemente de la suma de las contribuciones individuales

de sus componentes, sino que también se crea una importante sinergia por una extensa interfase híbrida [17,18]. En este sentido, en la interfase orgánico-inorgánico se presentan diferentes tipos de interacciones, los más comunes son enlaces lábiles que juegan un papel importante en la modulación de numerosas propiedades (ópticas, mecánicas, estabilidad térmica, etc.).

Tomando en cuenta las interacciones en la interfase orgánico (o biológico)-inorgánica, los materiales híbridos pueden clasificarse en: [16]

De Clase I: Se incluye a los sistemas híbridos donde los componentes orgánico (o biológico) e inorgánico interactúan por enlaces débiles, del tipo de Van der Waals, electrostáticos o por puente de hidrógeno.

Los compuestos de tipo I presentan una serie de características que pueden enunciarse como ventajas: la facilidad para sintetizarlos, el uso de precursores no complejos y, cuando se desea crear arquitecturas funcionales de auto-ensamblaje, la remoción superficial de la fase orgánica es muy fácil.

De Clase II: Comprende a los materiales híbridos en los cuales los componentes están enlazados por enlaces químicos covalentes o iónico-covalentes.

Esta clase de materiales incluye a muchos co-polímeros y nanocompositos. La presencia de enlaces covalentes entre los componentes les confiere numerosas ventajas: síntesis de materiales completamente diferentes a sus precursores, minimización de procesos de separación y mejor definición de la interfase orgánico-inorgánica. Esto último puede conducir a un mejor entendimiento del material y a describir mejor la relación entre la microestructura y las propiedades, a facilitar el balance hidrófilo-hidrófobo, etc.

Un anclaje eficiente de la funcionalidad orgánica a la inorgánica es a menudo más conveniente que el anclaje lábil de los compuestos híbridos de la Clase I, sobre todo en aplicaciones como sensores o catalizadores.

Por supuesto, muchos materiales híbridos no pueden clasificarse como puramente de clase I o II, debido a que presentan tanto enlaces fuertes como débiles, pero muy frecuentemente los enlaces fuertes son más significativos y a este tipo de materiales se les clasifica como de tipo II.

Se han sintetizado materiales híbridos exitosos para aplicarse en muchos campos, se pueden citar los siguientes: ha sido posible encapsular células de cianobacterias dentro de redes de sílice porosa [19], estas células poseen centros activos que son capaces de llevar a cabo la fotosíntesis dentro de los poros de la sílice. Por otra parte, un hidróxido doble laminar (Mg-Al-CO_3) se evaluó como receptor de ftalocianinas de cobalto para preparar un material híbrido ensamblado que ha mostrado ser un eficiente sensor de dopamina [20], un importante neurotransmisor. Para ejemplificar la amplia variedad de materiales híbridos que pueden prepararse, debe mencionarse que un hidróxido doble laminar también se usó para transportar DNA al interior de algunas células, el papel del DHL fue el de protección del DNA [21].

Para detectar y regular la concentración de fenoles aun no se ha reportado ningún material híbrido, es por eso que en este trabajo una de las moléculas objetivo es una familia de fenoles que son muy tóxicos para los seres vivos. Esto es particularmente relevante si se toma en cuenta que este tipo de moléculas están frecuentemente presentes en desechos líquidos de las industrias de pinturas, perfumes, etc.

2.2 Hidrogeles orgánicos con propiedades “estímulo-respuesta”

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales entrecruzadas que se estabilizan por enlaces físicos y químicos. Estos hidrogeles son capaces de absorber, en agua, hasta cientos de veces su peso seco [22,23]. Su composición química y su estructura tridimensional pueden modificarse fácilmente para modular sus propiedades de hinchamiento, mecánicas, biocompatibilidad y encapsulación de fármacos [24,25]. La insolubilidad de los hidrogeles los hace estables mecánicamente y les confiere propiedades de permeabilidad a moléculas pequeñas [26].

Existen algunos hidrogeles con una excepcional biocompatibilidad y que responden a ciertos estímulos (físicos o químicos), esto los hace muy atractivos para aplicaciones en autorregulaciones biológicas. Es común que estos sistemas sean llamados “materiales inteligentes”. Las estimulaciones pueden ser muy diversas, por ejemplo el pH, un campo eléctrico o la luz pueden provocar cambios drásticos en las propiedades del polímero. Estos materiales interesan particularmente para aplicaciones en el campo biomédico, explotando al material cuando responde a un cambio en la concentración de una molécula en el ambiente, tal y como lo hacen los sistemas biológicos. Así, estos sistemas son candidatos para sensores, transportadores de fármacos o bien como nuevos biomateriales.

Por ejemplo, se han creado esponjas tridimensionales porosas de poli ácido láctico buscando aplicarlas en el cultivo de células hepatocito [27]. Estas células, al estar localizadas, pueden usarse para la terapia en enfermedades hepáticas, manteniendo la expresión de genes hepáticos específicos.

En este contexto, uno de los objetivos más ambiciosos es la molécula de glucosa, debido a que la enfermedad de la diabetes está ampliamente propagada y se desea buscar tratamientos alternos.

Uno de los principales retos es el diseño de nuevos sensores de monitoreo de glucosa no invasivos o de sistemas de auto-liberación de insulina que ayuden a disminuir la frecuencia de las inyecciones de insulina [28].

Por otro lado, los fenoles también son moléculas objetivo ya que son compuestos que se usan ampliamente, que se liberan al medio ambiente y que una exposición a ellos ocasiona graves daños a la salud, son cancerígenos.

Así, en el presente trabajo se han diseñado materiales híbridos buscando aprovechar sus propiedades híbridas para crear sensores capaces de detectar y eliminar fenoles y/o glucosa. Los materiales híbridos consisten de una red de sílice funcionalizada con derivados del ácido fenilborónico y encapsulando en esta red moléculas bioactivas como la alanina y la insulina. Por otro lado se sintetizó un polímero orgánico hidrogel a base de poly N-isopropilacrilamida (pNIPAM) que se usó también como receptor de las mismas biomoléculas.

2.2 Fenoles

Son compuestos aromáticos que contienen grupos hidroxilo unidos directamente al anillo aromático, El compuesto más sencillo de la familia es el fenol, también conocido como hidroxibenceno, benzofenol o ácido carbólico. Su estructura se representa en la figura 2.1.

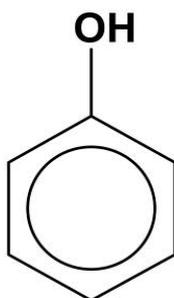


Figura 2.1 Estructura de fenol.

Los fenoles contienen el grupo $-OH$ (hidroxilo) y comparten algunas características con los alcoholes, sin embargo, las propiedades y forma de preparación son muy diferentes.

Los fenoles son más ácidos que los alcoholes, los más sencillos son líquidos o sólidos con un punto de fusión bajo y puntos de ebullición elevados. Esto debido a que el enlace $O-H$ es polar (como consecuencia de la diferencia de electronegatividades de los átomos) y forma puentes de hidrógeno con otras moléculas de fenol. También puede formar puentes de hidrógeno con otras moléculas, por ejemplo agua.

Los fenoles se oxidan con facilidad, dependiendo de la exposición a la luz y al aire, y de la presencia de impurezas metálicas. La oxidación de los fenoles depende de su estructura y la mayoría de ellos da lugar a quinonas. La mayoría de los fenoles son medianamente solubles en agua (9 g/100 g H_2O).

Los fenoles son de gran interés en la industria debido a los muchos usos que se les puede dar como disolventes, en la fabricación de resinas y herbicidas, desinfectantes, antisépticos, fungicidas e insecticidas, entre otras, esto aumenta el riesgo de que se diseminen en el medio ambiente. Particularmente, los fenoles se usan con frecuencia para producir colorantes azoicos, aspirinas y taninos artificiales [29]. El gran uso que se les da a los fenoles, sin embargo, también los hace presentes comúnmente como desechos, siendo un problema su disposición final.

Además, los fenoles son tóxicos para los seres vivos, principalmente fenoles con más de un grupo OH en el anillo aromático. Entre los efectos de los fenoles en los seres vivos hay que remarcar que produce modificaciones en los cromosomas, lo que le confiere propiedades cancerígenas.

En el presente trabajo se utilizan 3 tipos de fenoles: pyrocatecol, resorsinol y 4-metilcatecol (figura 2.2)

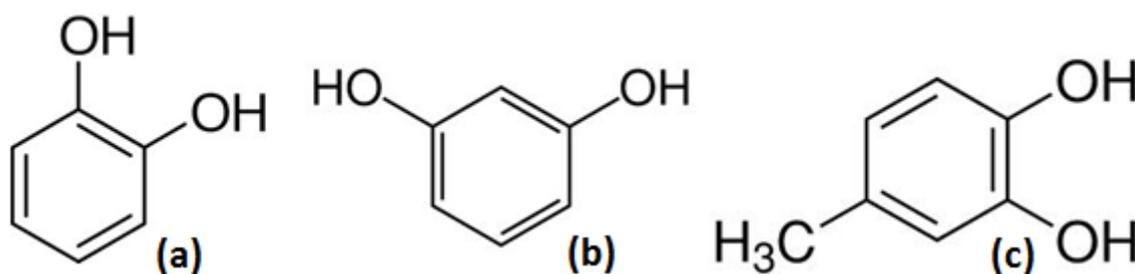


Figura 2.2 Estructuras de (a)Pyrocatecol, (b)Resorcinol y (c)4-Metilcatecol.

Los tres fenoles representados en la figura 2.2 contienen los grupos OH unidos al anillo aromático, difieren en las posiciones del OH y en uno de ellos un grupo metilo también está unido al anillo.

Estos tres fenoles pertenecen a un grupo de fenoles llamados catecoles. Estos compuestos son muy tóxicos para los seres vivos. Por ejemplo, el pyrocatecol es capaz de contribuir significativamente

al daño del ADN por mecanismos genotóxicos estocásticos y también contribuye al riesgo de contraer cáncer [30].

El resorcinol tiene una toxicidad baja al inhalarse y a la exposición cutánea pero por vía oral es muy elevada, afecta al sistema nervioso central. Algunos de sus efectos nocivos son disfunción del tiroides, irritación cutánea, desorden en el sistema nervioso central (taquipnea y temblores), irritación ocular, entre otros.

El 4-metilcatecol es irritante de las vías respiratorias además de perjudicar el sistema nervioso central. Al igual que el pyrocatecol y el resorcinol, es irritante cutáneo y ocular, y la exposición prolongada a este material induce náuseas y vómitos, agitación, vasodilatación periférica, taquipnea, taquicardia, hipertermia, temblores y convulsiones y edema pulmonar. En algunos casos, dependiendo de la dosis absorbida, la afección puede llegar al coma, daño renal o cardíaco.

Como se acaba de mencionar, los tres fenoles son altamente tóxicos. Además, es común que se encuentren presentes como desechos, diluidos en efluentes acuosos, por lo tanto es deseable detectarlos y eliminarlos.

2.3 Glucosa

La glucosa es un monosacárido sencillo que se produce en la fotosíntesis, y es el carbohidrato más importante que las plantas y animales usan como fuente de energía.

La figura 2.3a presenta la estructura de la glucosa, que puede describirse como un anillo "piranoso" de cinco átomos de carbono y uno de oxígeno. En este anillo, cada carbono está enlazado a grupos hidroxilo e hidrógeno, con la excepción de uno de ellos que se enlaza a otro átomo de carbono externo al anillo, formando un grupo CH_2OH . Esta estructura se encuentra en equilibrio con una forma más reactiva acíclica, Figura 2.3 b. Ambas estructuras en equilibrio son capaces de formar puentes de hidrógeno debido a sus numerosos grupos OH estructurales [31].

La glucosa se encuentra libre en la sangre (azúcar sanguíneo) y en otros numerosos fluidos corporales, así como en los jugos de las frutas, y es el componente principal de muchos oligosacáridos y polisacáridos [32]. La glucosa constituye el 98% del metabolismo oxidativo (respiración) del cerebro y es fuente principal de energía. La función respiratoria mantiene la vida celular con la glucosa como su principal combustible.

La glucosa se obtiene comercialmente por hidrólisis de almidón y tiene un alto grado de solubilidad.

Las personas con afecciones pancreáticas tienen problemas para metabolizar la glucosa ya que no producen o produce muy poca insulina, esta es una hormona que se necesita para poder llevar la glucosa a las células.

Una baja concentración de insulina causa una acumulación de glucosa en la sangre porque no puede transportarse a las células, este aumento de glucosa en la sangre se le llama hiperglucemia,

entonces la glucosa tiene un efecto tóxico que deteriora diferentes órganos y sistemas completos lo que puede resultar en coma y hasta la muerte.

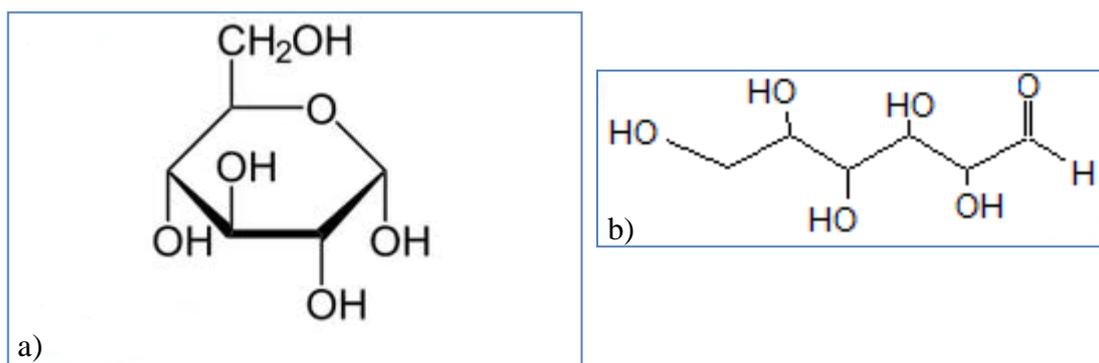


Figura 2.3 Estructura de la glucosa cíclica a) y no cíclica b).

La diabetes dificulta de dos formas diferentes el que las células reciban la cantidad adecuada de glucosa. La primera es cuando la insulina que genera el páncreas no es la suficiente, esto provoca que los receptores que permiten la entrada de glucosa a la célula no se abran, aumentando los niveles de glucosa en la sangre. Esto se conoce como diabetes tipo 1.

La diabetes tipo 2 no es una insuficiencia de insulina, sino que el número de los receptores de las células que permiten la entrada de glucosa es reducido, aunque la insulina necesaria esté presente no se puede usar, lo cual resulta en altos niveles de glucosa en la sangre, este tipo de diabetes también se dice que tiene resistencia insulínica. Este tipo de diabetes se controla usando medicamentos y modificando la dieta, pero a diferencia de la diabetes tipo 1 en esta es posible evitar inyecciones constantes de insulina.

Para controlar la insulina (la diabetes no es curable), actualmente se utilizan dispositivos de autocontrol que miden el nivel de glucosa en la sangre. El diabético tiene que medir estos niveles en

diferentes momentos del día, antes de cada comida, después de cada comida y a la hora de irse a dormir, pero para personas que utilizan insulina generalmente necesitan hacerse el autocontrol más a menudo que las que no lo usan (diabetes tipo 2 y tipo 1). Estas pruebas consisten en utilizar gotas de sangre, generalmente el dispositivo para medir tiene una pequeña aguja en donde se presiona con el dedo para así perforar la piel y obtener la gota de sangre. Después, dependiendo de si lo necesita o no, se inyecta insulina (no se puede tomar de otra forma).

Un diabético, en promedio, se inyecta insulina de 3 a 4 veces al día, se recomienda la rotación de las inyecciones por todo el cuerpo ya que se pueden formar lesiones, y también se recomienda inyectar de forma subcutánea, es decir en la capa de grasa debajo de la piel ya que si se inyecta en el músculo el dolor se significativamente mayor.

Lo anterior ejemplifica lo difícil que puede resultar la regulación de la glucosa en la sangre de los diabéticos. Es por esto que actualmente se investigan materiales que puedan autoregular los niveles de glucosa.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Materiales.

Todos los reactivos siguientes, usados en las diferentes síntesis de este trabajo, se adquirieron en Sigma-Aldrich:

Sulfato 3-aminofenil borónico ácido 95% (PBA), N-(3Dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimhidro cloruro (EDCI), Ácido acrílico 99% (AAc), Tetraetilortosilicato 98 % (TEOS), Etanol, L-Alanina 98%, n-isopropilacrilamida 97% (NIPAM), N'-Metil-bisacrilamida 99 % (BIS), dodecil sulfato de sodio 96% (SDS), persulfato de amonio 98% (APS).

3.1 Síntesis del ácido 3-acril amido-fenilborónico (APBA)

Se disolvieron 5 mmoles de sulfato ácido amino-fenilborónico en 16 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 4.8 agregando NaOH 2M. Enseguida, se bajó la temperatura de la solución a 4 °C y se adicionaron 5 mmoles de N-(3Dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimodehidrocloruro (EDCI)

Por otro lado, a 3 mL de ácido acrílico (AAc) se adicionó NaOH 2M hasta alcanzar un valor de pH=4.8.

Se mezclaron estas 2 soluciones y se bajó la temperatura a 4 °C, se dejó en agitación a esta temperatura por 1 h.

Posteriormente, se hicieron 4 extracciones con éter etílico (20 mL) en un embudo de separación (figura 3.1a). Se recolectó la fase orgánica, la cual contenía el APBA.

Se evaporó el éter etílico para así obtener un líquido con consistencia aceitosa de color blanco.

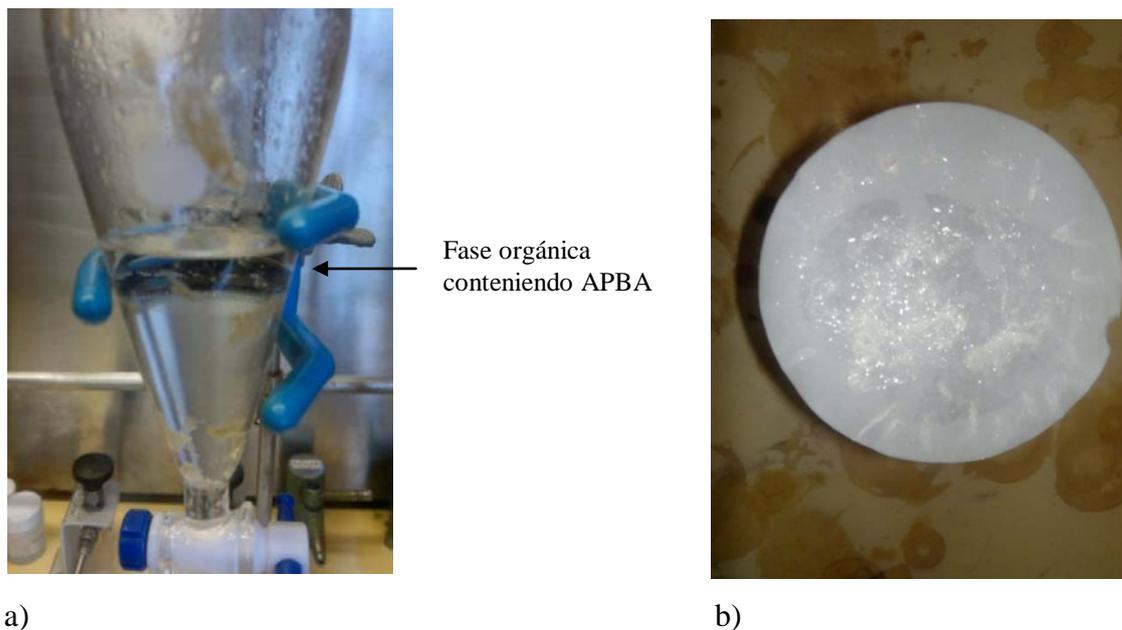


Figura 3.1 a) Embudo de extracción, se pueden apreciar las 2 fases, la menos densa es la fase orgánica. b) Agujas de APBA obtenidas de la recrystalización.

Al líquido se le agregó agua para inducir la recrystalización de la APBA. Se dejó reposar por 1 día, obteniendo entonces pequeñas agujas cristalinas de APBA (ver figura 3.1b). La estructura de este compuesto se muestra en la figura 3.2.

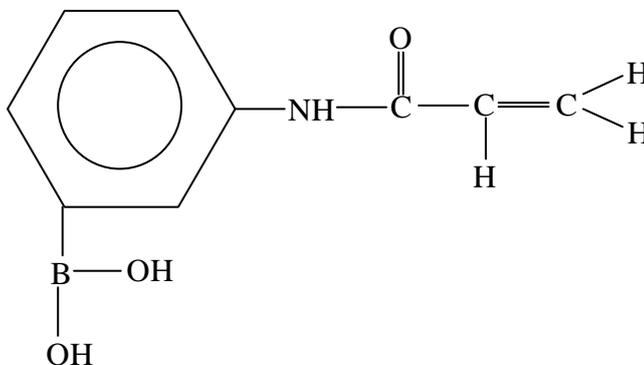


Figura 3.2 Estructura química del APBA

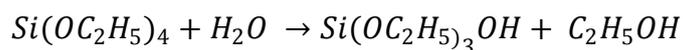
3.2 SÍNTESIS DE LA RED DE SÍLICE

3.2.1 Síntesis de sílice porosa (SiO₂)

Se sintetizó sílice por sol-gel [33]. Para esto, se preparó un sol con 0.1 moles (22.5 mL) de tetra etil orto silicato (TEOS), 0.57 moles de etanol (33.5 mL) y 0.62 moles de H₂O (11.2 mL). Se dejó en agitación a temperatura ambiente y al cabo de 74 horas se formó un gel. Se dejó añejar el gel y después de 4 días se secó obteniéndose un polvo blanco.

Las reacciones que se llevan a cabo durante el proceso sol-gel, son principalmente dos:

Por un lado la hidrólisis en donde el TEOS reacciona con el agua para formar grupos silanoles (R-Si-OH) y etanol como productos.



Por otro lado, la condensación. En esta reacción dos unidades de silicio con grupos silanoles reaccionan para formar enlaces – O – Si – O – Si – y agua, las reacciones de condensación se llevan a cabo consecutivamente con unidades Si con silanoles para polimerizar y formar las cadenas Si – O – Si – O – Si – O.



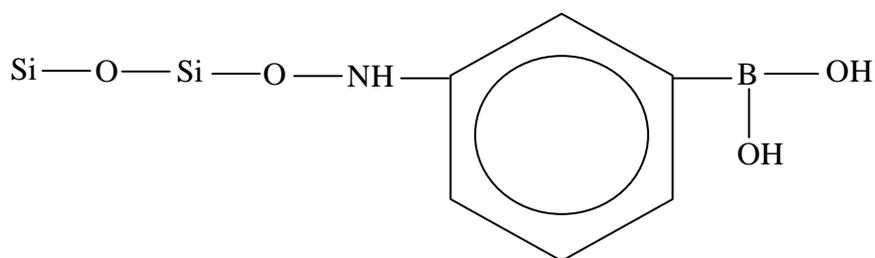
Las reacciones arriba mencionadas se combinan para proveer un material que no necesariamente está formado de cadenas saturadas de (SiO₄)⁴ sino que, dependiendo del tiempo de añejamiento del gel,

y otros factores, posee grupos silanoles que son considerados centros reactivos para interactuar con otras moléculas.

3.2.2 Síntesis de sílice porosa con APBA (SiO₂-APBA)

Se siguió el mismo procedimiento como descrito en 3.2.1 pero después de 24 horas de iniciado el experimento se añadieron 0.0566 g de APBA (sintetizado previamente) y se agitó por 50 horas más a temperatura ambiente. Después se evaporó el solvente y se obtuvo el sólido que se llamó SiO₂-APBA.

Con esta síntesis el objetivo fue el lograr funcionalizar la sílice como a continuación:



3.2.3 Síntesis de sílice porosa funcionalizada con APBA y alanina

La síntesis se realizó de manera similar a la descrita en 3.2.2 pero 24 horas después de añadido el APBA (48 horas después de comenzado el experimento) se adicionaron 0.0033 moles de alanina y se agitó durante 2 horas más. Se detuvo la agitación y enseguida se evaporó el solvente para obtener el sólido SiO₂-APBA-Ala (ver figura 3.3). La finalidad de agregar la alanina en la parte final de la síntesis fue de no funcionalizar la sílice como se hizo con el APBA sino de solamente atraparla en los poros de la sílice.



Figura 3.3. Sólido SiO₂-APBA-Ala sintetizado por sol-gel.

3.2.4 Síntesis de sílice porosa funcionalizada con APBA e insulina

Para funcionalizar la sílice con insulina se usó un digestor como el mostrado en la figura 3.4, en donde se mezclaron 22.30 mL de TEOS, 11.2 mL de H₂O y 33.5 mL de etanol, se dejó en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Pasadas estas 24 horas se añadieron 0.0618 g de APBA y se dejó durante 24 horas más para después añadir la insulina agitando por 3 horas más y secarlo para así obtener un sólido de tono rojo claro.

3.3 Síntesis de microgel de poli n-isopropilacrilamida (p-NIPAM)

3.3.1 p-NIPAM funcionalizado con APBA (p-NIPAM-APBA)

Se sintetizó un gel de poli NIPAM por precipitación de radicales libres [34] (ver apéndice A). Para esto, se disolvieron 0.5020 g de NIPAM, 0.509 g de BIS y 0.0163 g de dodecil sulfato de sodio en 40 mL de agua destilada a temperatura ambiente. Se agitó hasta que la solución se tornó transparente.

Por otra parte, se disolvieron 0.05 g de APBA (sintetizado previamente) en 1 mL de etanol.

Estas dos soluciones se mezclaron y se colocaron con un agitador magnético dentro de un digestor (ver figura 3.4a). Se dejó agitando a una temperatura de 70 °C durante una hora antes de iniciar la polimerización la cual se promovió añadiendo 0.406 g de persulfato de amonio (APS). Se agitó a 70 °C durante 4 horas y 11 horas más a temperatura ambiente.

Al abrir el digestor se podía percibir que el color de la solución, inicialmente transparente, se había tornado blanca y turbia (ver figura 3.4b), indicativo de la obtención de un sólido suspendido en un líquido.

Para recuperar el sólido se centrifugó durante 15 minutos a 250 rpm. Enseguida se secó el sólido y después de 24 horas se recuperaron 0.5490 g de láminas transparentes de p-NIPAM-APBA (ver figura 3.5).



a)



b)

Figura 3.4 a) Digestor usado para síntesis de NIPAM. b) Microgel de NIPAM suspendido en agua.



Figura 3.5 Microgel de p-NIPAM-APBA.

3.3.2 p-NIPAM funcionalizado con APBA e insulina (p-NIPAM-APBA-insulina)

Para funcionalizar el p-NIPAM con insulina, se sumergió el p-NIPAM-APBA (0.1 g) en 5 mL de insulina marca Insulex durante 72 horas a 4 °C. Seguidamente se dejó evaporar el solvente durante 24 horas a temperatura ambiente y así obtener un sólido blanco que se etiquetó como pNIPAM-APBA-insulina.

3.3.3 p-NIPAM funcionalizado con APBA y alanina (p-NIPAM-ala).

Además de funcionalizar el p-NIPAM-APBA con insulina, también se funcionalizó con alanina, en este caso se sumergieron 0.2011 g de NIPAM en una solución de 40 mL de agua con 0.02011 g de alanina por 72 horas a temperatura ambiente, después se dejó evaporar el solvente durante 48 horas para así obtener un sólido blanco el cual se etiquetó como pNipam-APBA-Alanina.

Resumiendo, se sintetizaron materiales híbridos sensores a base de sílice y NIPAM ambos funcionalizados con APBA, esto porque se propone que esta molécula interaccione a través de los grupos $-B(OH)_2$ con los polioles de las moléculas objetivo (fenoles y glucosa). Además, los materiales contienen en sus poros alanina o insulina, las cuales serán las moléculas responsables de neutralizar a las moléculas objetivo.

3.3 CARACTERIZACIÓN

3.4.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Con el objetivo de caracterizar estructuralmente a los materiales híbridos, se caracterizaron por RMN de sólidos [35] ya que esta técnica es sensible a los ambientes químicos de los átomos. El principio de la técnica se describe en el apéndice B.

Esta técnica es fundamental para concluir la funcionalización de los materiales SiO₂ y NIPAM con APBA

Los espectros de RMN en estado sólido de ²⁹Si, ¹³C y de ¹¹B se obtuvieron con giro al ángulo mágico (MAS) en un espectrofotómetro Bruker 300 Avance II a una frecuencia de resonancia de 59.59 MHz, 75.42 MHz y 96.2 MHz respectivamente.

Los espectros de ²⁹Si se adquirieron con un pulso de 3 μs y un tiempo entre pulsos de 40 s. Las muestras se empacaron en rotores de ZrO₂ y se giraron a 5 kHz. Los desplazamientos químicos se referenciaron a una solución acuosa de Al(NO₃)₃.

Los espectros de ¹³C se adquirieron en condiciones de polarización cruzada (¹H-¹³C) usando una sonda Bruker con rotores de zirconio de 4mm. Las muestras empacadas en los rotores se giraron a una frecuencia de 5 kHz. Se utilizaron pulsos sencillos π/2 de 4 μs, un tiempo entre pulsos de 5 s y los desplazamientos químicos se referenciaron al desplazamiento en 38.2 ppm de adamantano relativo a tetrametilsilano (TMS).

Los espectros de ¹¹B se adquirieron con pulsos sencillos de excitación (90°) de 1.5 μs, con un tiempo de repetición de 2 segundos. Los rotores se giraron a 8 kHz. Los desplazamientos

químicos se referenciaron al trifloruro de boro etil eter ($\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$).

3.3.1 Dispersión de rayos X para ángulos pequeños (SAXS)

La técnica de SAXS es particularmente sensible a cambios de densidad electrónica [36] (Apéndice C). Así, esta técnica se eligió para medir el cambio en densidades provocado por las interacciones entre el material híbrido y la molécula objetivo a detectar y/o regular en un medio líquido.

Los perfiles SAXS se obtuvieron utilizando una cámara Kratky acoplada a un tubo de rayos X con ánodo de cobre. La radiación K_α se seleccionó por medio de un filtro de níquel (Ni). Las muestras fueron introducidas en un tubo capilar. La intensidad $I(h)$ se midió por 9 minutos para obtener buenas estadísticas. Los datos obtenidos fueron procesados con el programa ITP [37,39], donde el parámetro angular (h) está definido como $h = 2\pi \sin \theta / \lambda$ con θ siendo el ángulo de incidencia de los rayos X y λ la longitud de onda.

La forma de la muestra puede estimarse de la gráfica Kratky, $h^2 I(h)$ contra h .

De la pendiente de la curva $\log I(h)$ contra $\log(h)$ se puede calcular la dimensión fractal de las muestras, de acuerdo con la Ley de Porod [40,41].

Hay que tener en cuenta que por el principio de Babinet, la dispersión de rayos X a ángulos pequeños puede deberse a partículas densas en un ambiente de baja densidad o a los poros o inclusiones de baja densidad en un medio continuo de alta densidad de electrones.

3.3.2 Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Para observar la morfología de las muestras se utilizó la técnica SEM (Apéndice D), la cual por su alta resolución e imágenes en tercera dimensión facilita la observación de elementos morfológicos como la forma y tamaño de partículas a escala micrométrica.

Las micrografías SEM de las muestras se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido Leica Stereoscan-440. Las muestras se recubrieron con oro para evitar problemas de carga. Las muestras se analizaron a 1000, 2000, 10000 y 50000 aumentos.

3.4 EVALUACIÓN DE LOS MATERIALES COMO SENSORES

Para evaluar la eficiencia de los materiales híbridos en tanto que sensores, ellos se pusieron en contacto con glucosa o fenoles. Los sistemas a estudiar se resumen en la tabla 3.1. La interacción del sensor regulador y la molécula objetivo se evaluaron cuantitativamente por espectroscopia ^1H RMN.

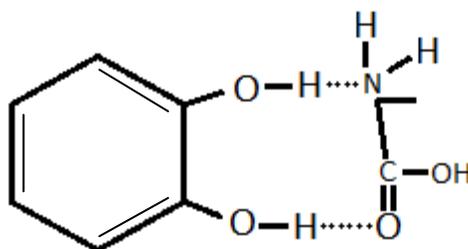
Material (sensor)	Molécula objetivo
SiO ₂ - APBA-Alanina	Pyrocatecol
SiO ₂ -APBA-Alanina	Resorcinol
SiO ₂ -APBA-Alanina	4-Metilcatecol
SiO ₂ -APBA-Alanina	Glucosa
SiO ₂ -APBA-Insulina	Glucosa
pNIPAM-APBA-Alanina	Pyrocatecol
pNIPAM-APBA-insulina	Pyrocatecol

Tabla 3.1. Materiales propuestos para detectar y regular algunas moléculas con grupos -OH

Una masa conocida del sensor se suspendió en 40 mL de agua junto con las diferentes moléculas objetivo, a cantidades variables, de acuerdo a la tabla 3.2. La solución se mantuvo en agitación a temperatura ambiente y la evolución de la interacción sensor-molécula objetivo se siguió en función del tiempo, para esto se muestreaba, a intervalos regulares, 0.9 mL de la solución y se adquiría inmediatamente el espectro ^1H RMN en estado líquido. Antes de la obtención del espectro la muestra líquida se diluyó en 0.2 mL de D₂O con una sal de sodio de ácido 3-(trimetilsilil) propionico-2,2,3,3-d₄. Este último componente se usó como una referencia para integrar

el espectro ^1H RMN y obtener un valor cuantitativo de la concentración de sus componentes en función del tiempo.

Por ejemplo, suponiendo que la interacción entre pyrocatecol y la alanina liberada del material híbrido $\text{SiO}_2\text{-APBA-Ala}$ se da a través de interacciones dipolares, se formaría el complejo siguiente:



Sensor(masa [g])	Molécula objetivo [g]	Volumen de agua [mL]
$\text{SiO}_2\text{-APBA-Ala}$ (0.5400)	Pyrocatecol 0.2479	40
$\text{SiO}_2\text{-APBA-Ala}$ (0.5406)	Resorcinol 0.2481	40
$\text{SiO}_2\text{-APBA-Ala}$ (0.5405)	4-Metilcatecol 0.2788	40
$\text{SiO}_2\text{-APBA-Ala}$ (0.5407)	Glucosa 0.4081	40
$\text{SiO}_2\text{-APBA-ins}$ (0.5408)	Glucosa 0.4061	40
pNIPAM-APBA-insulina (0.0993)	Glucosa 0.2477	40
pNIPAM-APBA-Alanina (0.2009)	Pyrocatecol 0.1209	40

Tabla 3.2 Combinaciones sensor y molécula objetivo en solución acuosa bajo estudio.

Así, en este caso es conveniente monitorear por RMN ^1H el grupo OH del fenol que interacciona por puentes de hidrógeno. Por supuesto, dependiendo del tipo de sensor y molécula objetivo, la molécula a seguir será diferente. Esto se reportará en la sección de resultados para cada sistema sensor-molécula objetivo.

4. RESULTADOS

4.1 Materiales

4.1.1 APBA

El espectro RMN ^1H de la figura 4.1 confirma que sí se logró sintetizar el compuesto APBA. Los picos RMN a 5.7 y 6.3 ppm corresponden al grupo $\text{CH}_2=\text{CH}-$, las señales a 7.2, 7.5 y 7.8 ppm se atribuyen al anillo bencénico, el pico a 8.0 ppm es característico de los hidrógenos del grupo $-\text{B}(\text{OH})_2$ y la resonancia a 10.1 ppm se debe al grupo amino ($-\text{NH}$) [42]. La totalidad del espectro puede atribuirse a APBA con lo que se concluye que se obtuvo puro. Este espectro, fue similar al obtenido por Kitano et. al. [34] quienes realizaron por primera vez la síntesis de APBA.

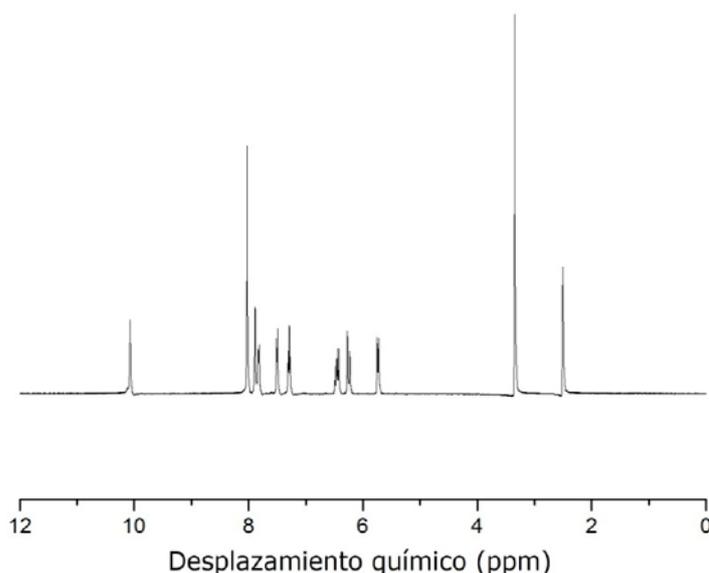


Figura 4.1 Espectro RMN ^1H en estado líquido de una solución de APBA. Condiciones de adquisición: frecuencia de resonancia a 400 MHz, solvente CD_3Cl .

4.1.2 Construcción del sensor SiO₂-APBA-Ala

En la figura 4.2 se presentan imágenes SEM del sensor a diferentes etapas de la síntesis. En la figura 4.2a se observan partículas de sílice que se obtienen cuando no se funcionaliza ni con APBA ni con alanina (Ala), en este caso las partículas esféricas de sílice muy pequeñas (0.3 μm aproximadamente) tienden a aglomerarse para formar partículas muy grandes de forma irregular, del orden de 5 μm y mayores.

Cuando la sílice se funcionaliza con APBA (SiO₂-APBA), figura 4.2b, la morfología del material cambia significativamente con respecto a la sílice (SiO₂). Ahora las partículas que se observan son de forma irregular pero formando una red macroporosa, dejando ver la formación de macroporos de 5 μm y mayores. El material SiO₂-APBA parece que tiende a ser más homogéneo en cuanto a su morfología porosa, comparado con el sólido SiO₂, que seguramente tenía una micro o nanoporosidad no observable por SEM.

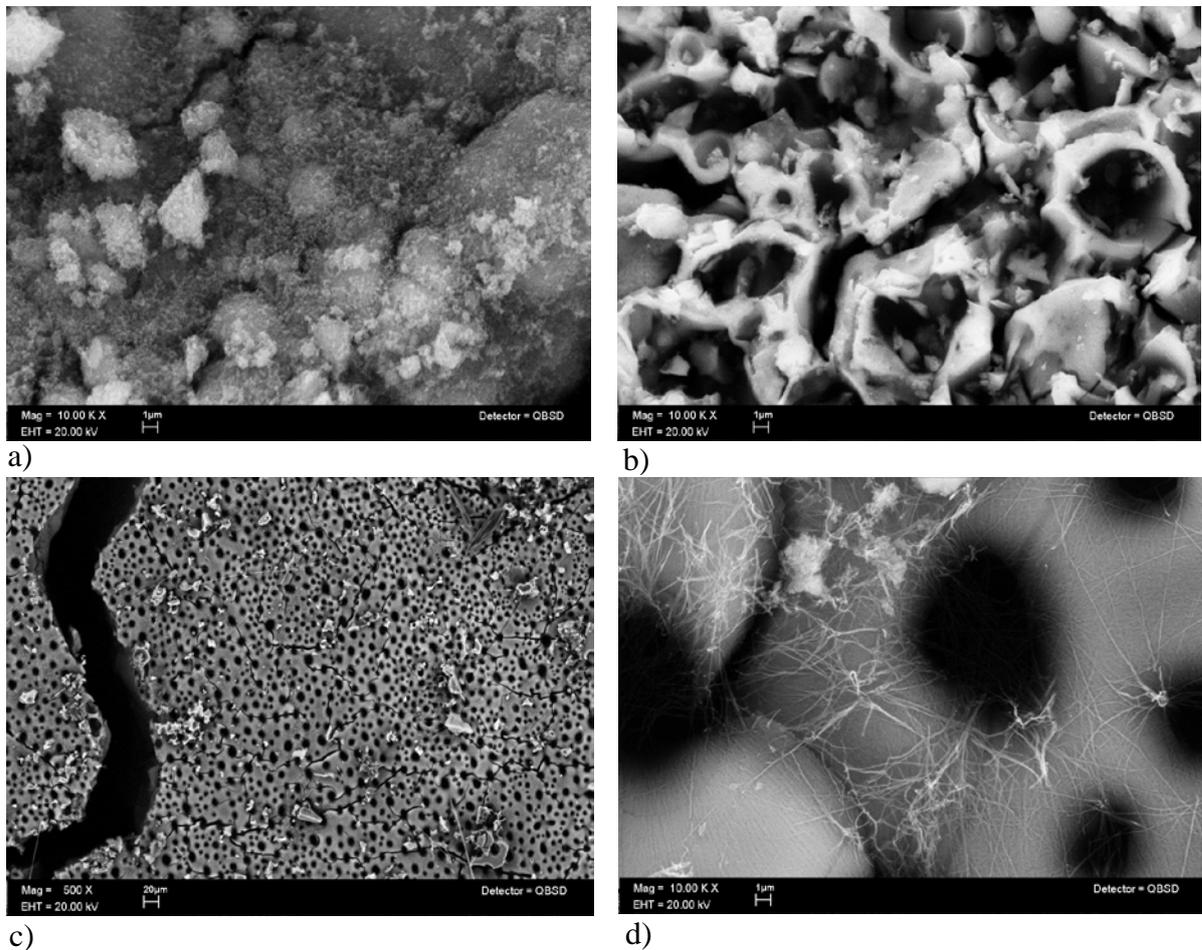


Figura 4.2 Imágenes SEM de a) SiO_2 , b) SiO_2 -APBA, c) y d) SiO_2 -APBA-Ala.

La morfología del material se modifica nuevamente cuando se funcionaliza con APBA y alanina (SiO_2 -APBA-Ala). Es claro que se formó una red con una macroporosidad regular, figura 4.2c, con los poros principalmente de diámetro igual a 8 μm. Existen algunas partículas densas sobre la red macroporosa, mismas que pueden atribuirse a SiO_2 sin funcionalizar. La imagen de la figura 4.2d muestra más en detalle al material SiO_2 -APBA-Ala, revelando que la red del material se compone de quasi-esferas poco densas, interconectadas para formar los macroporos. La morfología se asemeja a cebollas interconectadas.

Debe concluirse que las condiciones de síntesis son determinantes para la morfología del material. Las moléculas utilizadas para funcionalizar a la sílice juegan también el papel de templante para guiar la morfología del material. Esto ocurre a menudo con la síntesis de materiales silíceos [43,44]. Por un lado, la molécula de APBA es una molécula voluminosa, con grupos amino terminales alrededor de los cuales la sílice puede estructurarse. Al parecer la molécula APBA es la molécula que actúa como molde de la sílice, ya que en el material SiO_2 -APBA ya puede observarse la formación de una macroporosidad regular. Debe tomarse en cuenta que las síntesis de los materiales SiO_2 -APBA y SiO_2 -APBA-Ala ocurrieron de manera similar, agregando el APBA a la sílice a tiempos similares, pero que la síntesis de SiO_2 -APBA-Ala fue más larga, es decir en este caso el material estuvo un tiempo mayor con APBA, con lo que seguramente se logró una estructuración completa del material. La presencia de APBA y alanina en el sensor y su interacción con la sílice no pueden caracterizarse por SEM y serán discutidos a partir de los resultados de RMN multinuclear.

En la figura 4.3 se comparan los espectros de RMN MAS ^{29}Si de las muestras a las diferentes etapas de diseño del sensor. El espectro de la sílice sin funcionalizar se compone de 4 señales a -82, -90, -102 y -112 ppm, que se atribuyen a núcleos de silicio en grupos SiOSi(OH)_3 , $(\text{SiO})_2\text{Si(OH)}_2$, $(\text{SiO})_3\text{Si(OH)}$ y $(\text{SiO})_4$, respectivamente.

La presencia de estas especies es usual para un material SiO_2 sintetizado a partir del método sol-gel [45,46], es decir la hidrólisis y la condensación promueven la formación de muchos grupos silanoles (SiOH) en superficie, especialmente para síntesis con tiempos cortos de añejamiento del gel, como la efectuada en la muestra SiO_2 . Cuando el material se funcionaliza con APBA, el número de grupos silanoles disminuye significativamente, particularmente los silicios

soportando tres OH, $(\text{SiOSi}(\text{OH})_3)$, desaparecen, para dar paso a la formación, principalmente, de grupos $(\text{SiO})_3\text{Si}(\text{OH})$ lo que sugiere que las moléculas de APBA reaccionan en los grupos SiOH. Cabe hacer notar que la funcionalización provoca, al menos parcialmente, que la sílice no siga polimerizando ya que no se observa un incremento significativo en la intensidad del pico atribuido a $(\text{SiO})_4$. No obstante, la ausencia de picos RMN en el intervalo de -50 a -70 ppm, revela que la adsorción no forma enlaces covalentes Si-O-C, sino que la adsorción debe ser mediante interacciones dipolares tal y como ocurre con sistemas que tienen grupos polares los cuales pueden inducir fácilmente un momento dipolar [46]. Finalmente, cuando el sensor está construido totalmente, es decir, cuando la alanina ya está presente, el pico a -112 ppm aumenta significativamente lo que se interpreta como un aumento en la polimerización de las cadenas de sílice, es decir la población de especies $(\text{SiO})_4$ aumentan significativamente en decremento de las especies $(\text{SiO})_3\text{Si}(\text{OH})$. Este resultado implica que el aminoácido alanina no está directamente unido a las cadenas (Si-O-Si-O-), sino que fue atrapado en los intersticios que se forman.

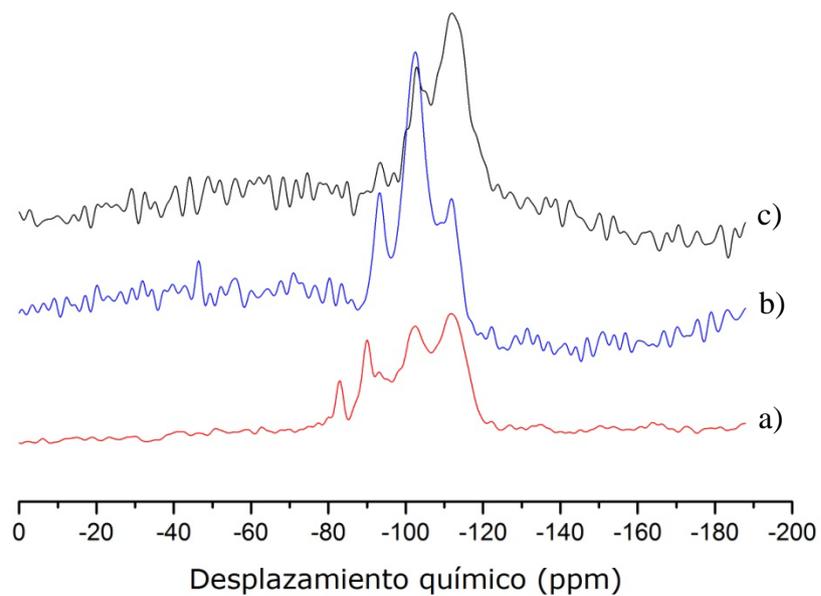


Figura 4.3 Espectro RMN MAS ^{29}Si en estado sólido de las muestras a) SiO_2 , b) $\text{SiO}_2\text{-APBA}$ y c) $\text{SiO}_2\text{-APBA-Ala}$.

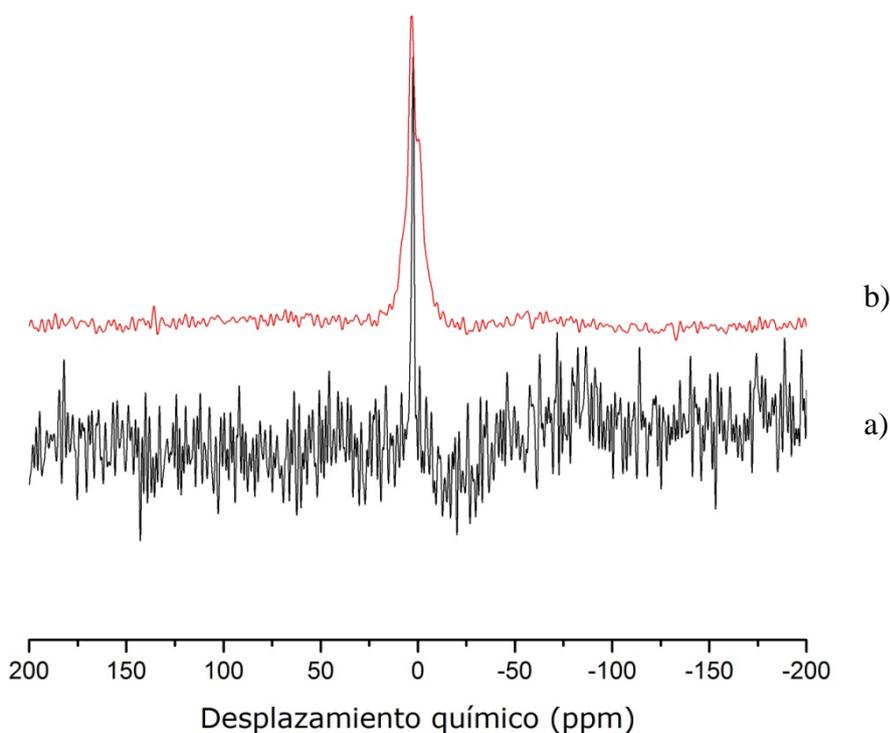


Figura 4.4 Espectros RMN MAS ^{11}B de las muestras a) $\text{SiO}_2\text{-APBA}$ y b) $\text{SiO}_2\text{-APBA-Ala}$

Los espectros RMN MAS ^{11}B de la figura 4.4 confirman que la alanina es “recubierta” por la sílice. El espectro del material $\text{SiO}_2\text{-APBA}$ (antes de la incorporación de la alanina) se compone de un pico RMN fino, cerca de 0 ppm, que se atribuye al grupo $-\text{B}(\text{OH})_2$ unido al anillo bencénico. Con la incorporación de alanina, el pico RMN no cambia en posición pero sí en anchura, el pico es más ancho para la muestra que contiene alanina. Esto puede interpretarse como una variación en la densidad electrónica del anillo de benceno, lo que cambia el tiempo o mecanismo de relajación de la señal ^{11}B RMN. Este hecho es consistente con la suposición de que la alanina es “atrapada” por la red de sílice.

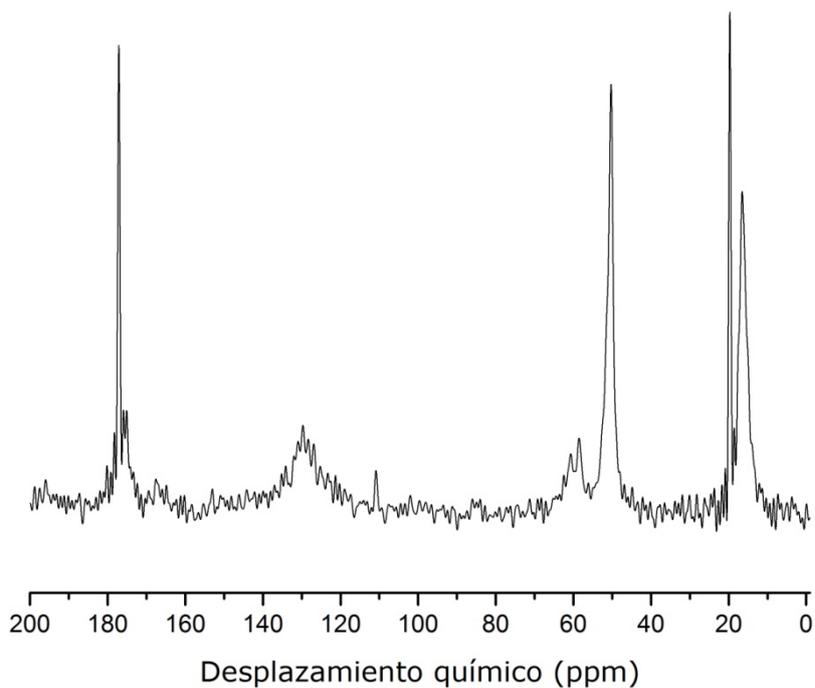


Figura 4.5 Espectro RMN MAS ^{13}C del sensor de sílice ($\text{SiO}_2\text{-APBA-Ala}$).

En la figura 4.5 se muestra el espectro RMN MAS ^{13}C del sensor $\text{SiO}_2\text{-APBA}$ funcionalizado con alanina. Se pueden apreciar picos en 20, 50 y 177 ppm correspondientes a los grupos CH_3 , CH y $\text{C}=\text{O}$ respectivamente. Por otra parte las señales con los desplazamientos en 17, 58 y 175 ppm se atribuyen a la alanina.

El pico en 119 ppm se debe al anillo bencénico presente en la estructura de APBA.

4.1.3 SiO₂-APBA-insulina

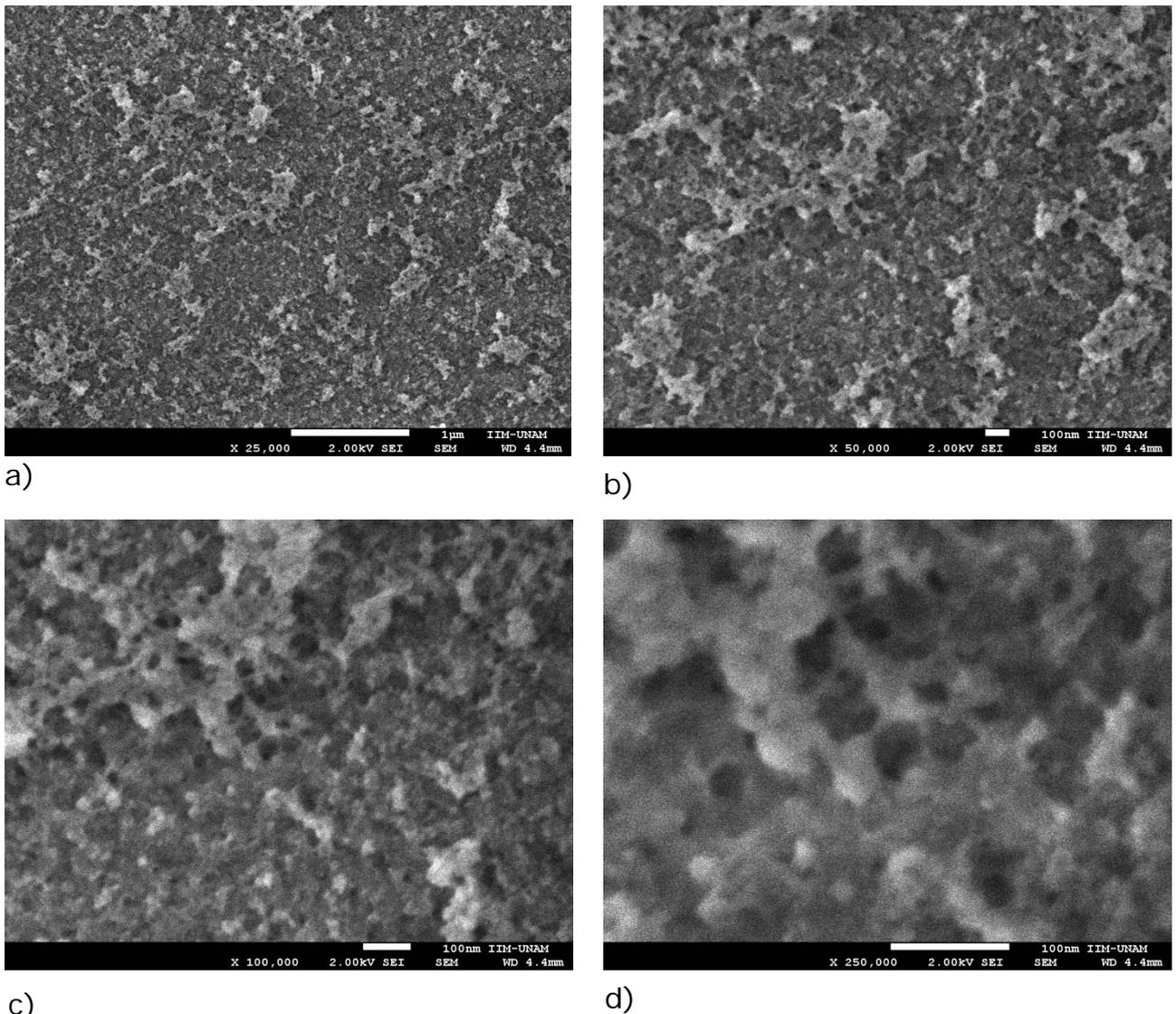


Figura 4.6 Imágenes SEM de sílice funcionalizado con insulina (SiO₂-APBA-insulina) a) aumento de 25k X, b) aumento de 50k X, c) aumento de 100k X y d) aumento de 250k X .

En la figura 4.6 se muestran las fotografías SEM de la muestra SiO₂-APBA-insulina, a diferentes aumentos. En estas imágenes se puede apreciar como la densidad de las partículas es mayor, formando aglomerados. No se forma una red porosa regular como en

el caso de SiO₂-APBA-Ala. Esto se debe a que la molécula de insulina es muy grande, envolviendo parcialmente la red de sílice. Aún así, en la figura 4.6 a), se pueden apreciar algunos poros muy pequeños en el material, y en la figura 4.6 c)

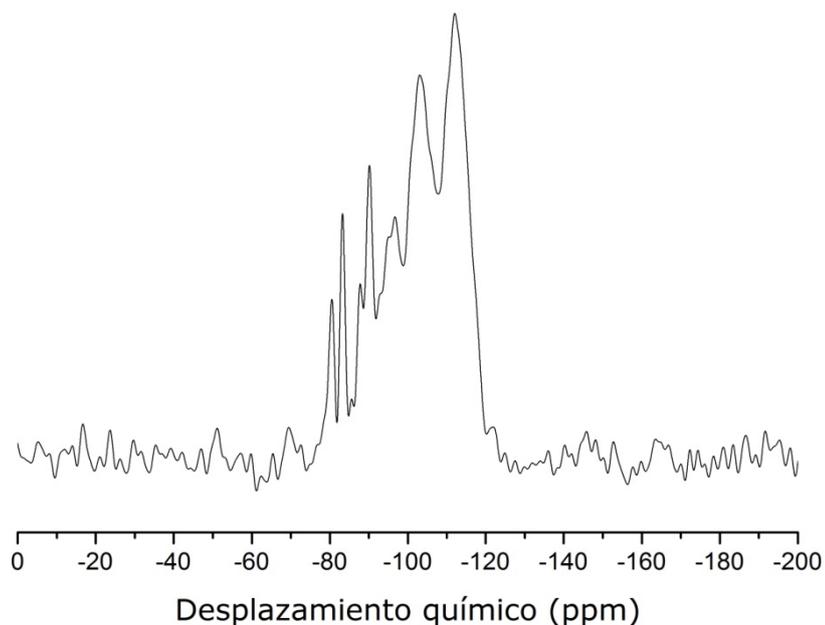
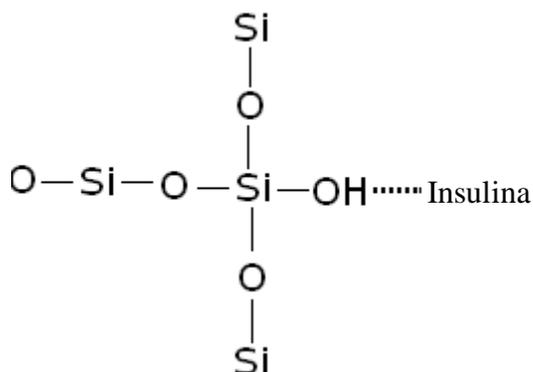


Figura 4.7 Espectro RMN MAS ²⁹Si de SiO₂-APBA-insulina

La figura 4.7 muestra el espectro RMN MAS ²⁹Si de la muestra de sílice funcionalizada con insulina. Se observan picos RMN en -83, -90, -103 y -112 ppm correspondientes a los grupos SiOSi(OH)₃ [Q1], (SiO)₂Si(OH)₂ [Q2], (SiO)₃Si(OH) [Q3], y (SiO)₄ [Q4], respectivamente, característicos de una muestra de sílice, descritos también para la muestra SiO₂ (figura 4.3). También se encuentran presentes picos adicionales en -80, -87 y -96, los cuales corresponden a variaciones de las unidades Q1, Q2 y Q3, respectivamente. Estas señales desplazadas pueden atribuirse a modificaciones en los grupos de la sílice por interacciones con grupos polares presentes en la insulina como se muestra a continuación:



Las interacciones particulares no se muestran debido a que la insulina es una molécula muy grande y las interacciones pueden ser muy diversas. No obstante, el resultado no es sorprendente ya que las macromoléculas, de hecho, contienen muchas interacciones dipolares intramoleculares, y el ejemplo más clásico son los enlaces por puente de hidrógeno y de azufre, además de que su superficie está parcialmente cargada, y los receptores de la insulina en el tratamiento de la diabetes son justamente receptores polares [47,48].

4.1.4 p-NIPAM-APBA

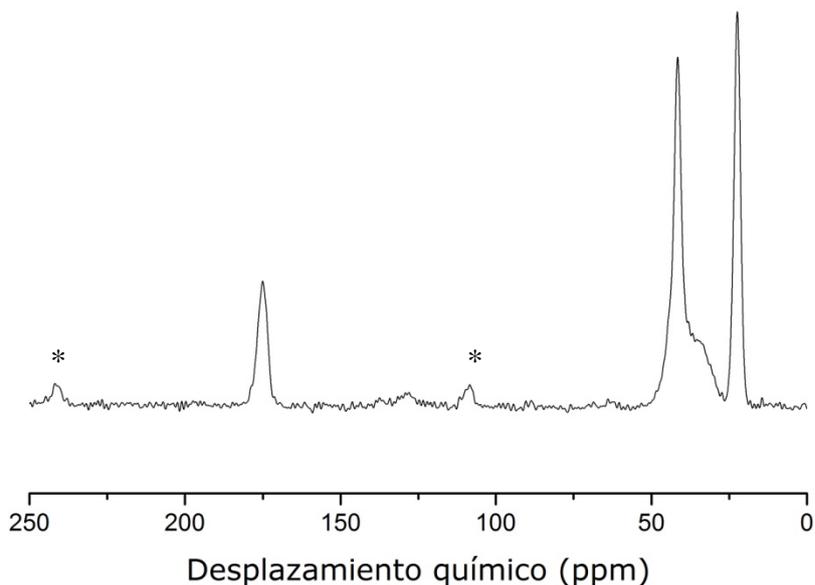


Figura 4.8 Espectros RMN MAS ^{13}C de p-NIPAM-APBA. * indican bandas de rotación (5kHz).

En la figura 4.8 se muestra el espectro RMN MAS ^{13}C del microgel de p-NIPAM-APBA en donde se observan 3 picos intensos a 22, 42 y 175 ppm atribuidos a los carbonos de los grupos CH_3 , CH_2 y CH , y $\text{C}=\text{O}$, respectivamente. Se debe enfatizar que el pico en 42 ppm es más ancho debido al traslape de las señales de los grupos CH y CH_2 , presentes en la molécula de NIPAM, el pico a 128 ppm se atribuye al benceno. Los picos marcados con * son bandas de rotación. Este espectro será el espectro de referencia para discutir los espectros ^{13}C RMN de las muestras de NIPAM funcionalizadas.

En la figura 4.9 se aprecia el espectro RMN MAS ^{11}B del microgel pNIPAM-APBA, en el se puede ver un pico intenso en 3 ppm, lo que indica la presencia de boro en el compuesto, esto quiere decir que la red tiene unido el APBA. A diferencia del pico ^{11}B RMN en la

muestra SiO₂-APBA el pico en p-NIPAM-APBA es relativamente ancho, lo que significa que el grupo B-(OH)₂ ya interacciona con la red del polímero.

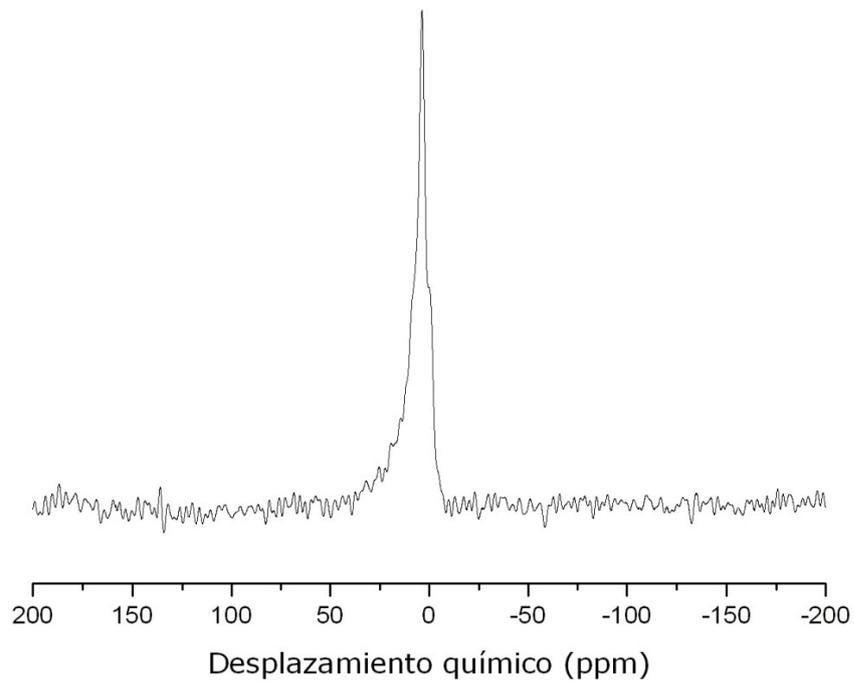


Figura 4.9 Espectro RMN MAS ¹¹B de pNIPAM

4.1.5 p-NIPAM-insulina

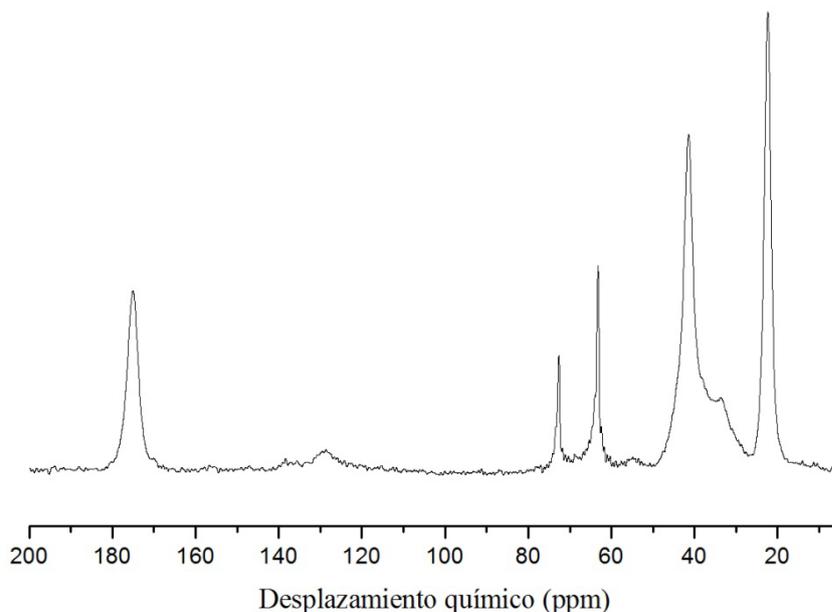


Figura 4.10 Espectro RMN MAS ^{13}C del microgel p-NIPAM funcionalizado con insulina.

En la figura 4.10 se presenta el espectro de ^{13}C RMN MAS del material pNIPAM funcionalizado con insulina. Los picos en 22, 42 y 175 ppm se asignan a la red formada por NIPAM y están de acuerdo con lo descrito para la muestra pNIPAM-APBA (espectro en figura 4.7). Los picos en 63 y 72 ppm se asignan a los carbonos de los grupos C-N y C-O presentes en la insulina, confirmando la presencia de insulina encapsulada en la red de NIPAM. Evidentemente la estructura de la insulina posee muchos más grupos funcionales, pero la abundancia natural isotópica de ^{13}C hacen imposible la resolución de todas las señales de esta proteína en el material. El pico presente en 128 ppm corresponde a las señales de los carbonos del anillo bencénico.

4.1.6 PNIPAM-APBA-Alanina

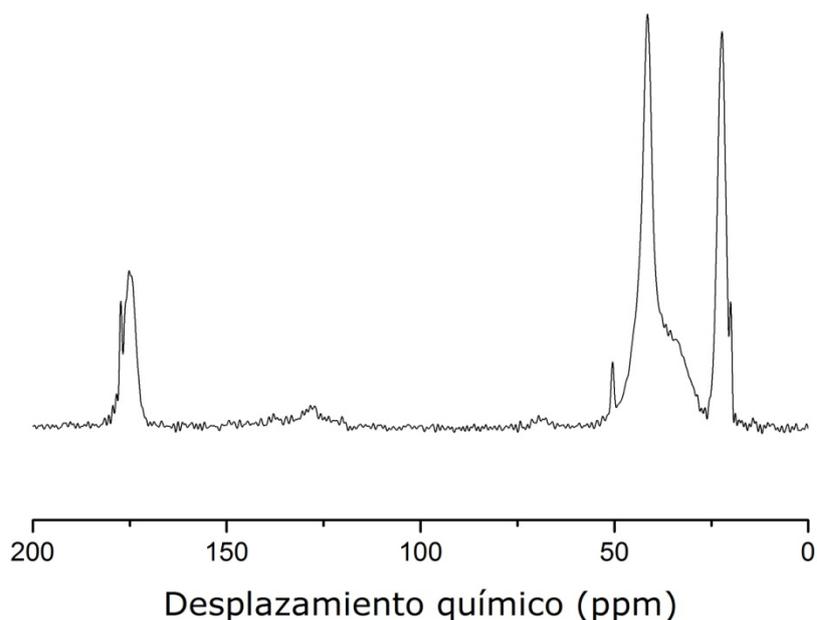


Figura 4.11 Espectro RMN MAS ^{13}C en estado sólido de la muestra pNIPAM funcionalizado con alanina (pNIPAM-Alanina)

En la figura 4.11 se observa el espectro RMN MAS ^{13}C del sensor compuesto de NIPAM funcionalizado con alanina, en el se pueden apreciar los picos a 22, 42 y 175 ppm, que como ya se mencionó antes, corresponden a la red de p-NIPAM. Por otra parte se observan 3 picos muy cerca de los picos característicos del p-NIPAM a 20 y 175 ppm los cuales junto con el pico menos intenso a 50 ppm, se deben a la molécula de alanina.

El pico presente a 127 ppm se atribuye a carbonos aromáticos (ciclobenceno).

En el espectro RMN MAS ^{11}B de pNIPAM-APBA-Ala (figura 4.12), se aprecian tres picos a 9 ppm, los cuales confirman que el APBA forma parte del sensor. El hecho de que haya tres picos significa que tres diferentes ambientes son posibles para boro en el sensor. Este resultado es relevante, ya que es posible que los grupos OH enlazados al boro estén interaccionando con la alanina mediante puentes de hidrógeno.

Tal parece que la alanina puede interaccionar como donador y aceptor de puentes de hidrógeno, figura 4.12b, lo que explica la aparición de señales RMN alto y bajo campo, además del pico central.

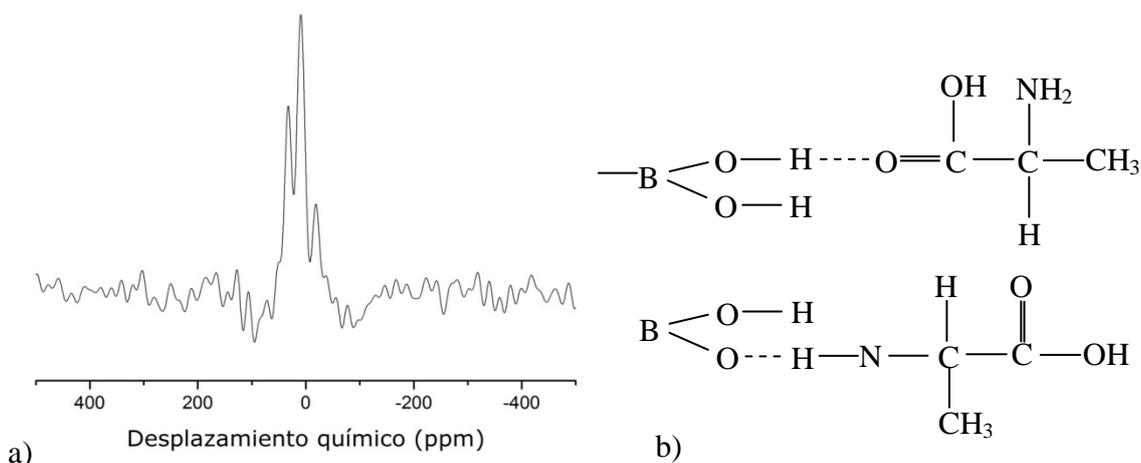


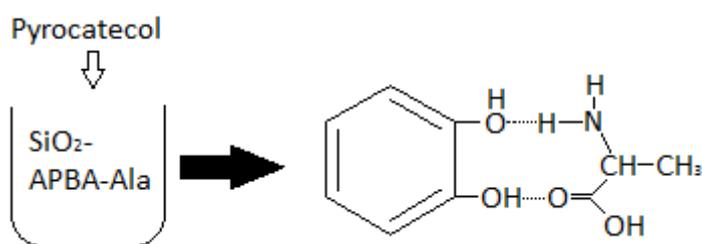
Figura 4.12 a) Espectro RMN MAS ^{11}B MAS de la muestra p-NIPAM funcionalizado con alanina (pNIPAM-Alanina), b) Alanina como aceptor y receptor.

4.2 Evaluación de los materiales híbridos como sensores

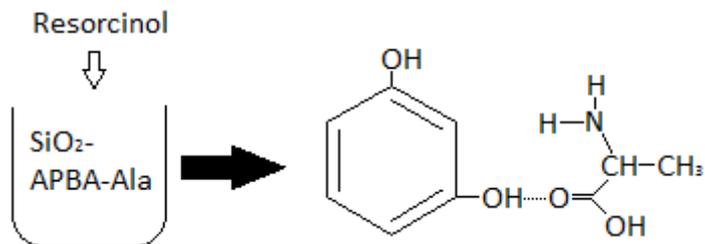
4.2.1 Sistemas (SiO₂-APBA-Ala)-fenoles

Como ya se mencionó, el sensor se evaluó para detectar diferentes moléculas objetivo, para ello se siguieron las interacciones para cada uno de los fenoles:

a)



b)



c)

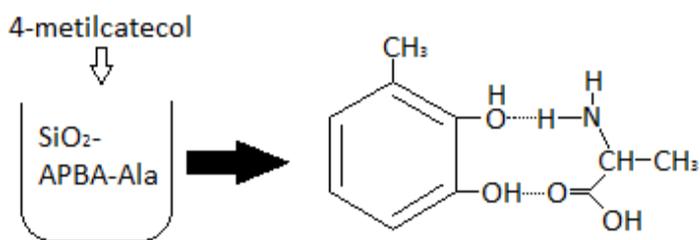


Figura 4.13 Compuestos resultantes al mezclar alanina con los diferentes fenoles. a) pyrocatecol + alanina, b) resorcinol + alanina, c) 4-metilcatecol+ alanina.

En la figura 4.13 se esquematizan las interacciones esperadas entre la molécula de alanina, liberada del sensor, con la molécula objetivo (pyrocatecol, resorcinol o 4-metilcatecol), presente en

solución acuosa. La molécula alanina tiene que liberarse como una consecuencia de la interacción entre el fenol y los grupos OH de APBA, como mostrado en la figura 4.14

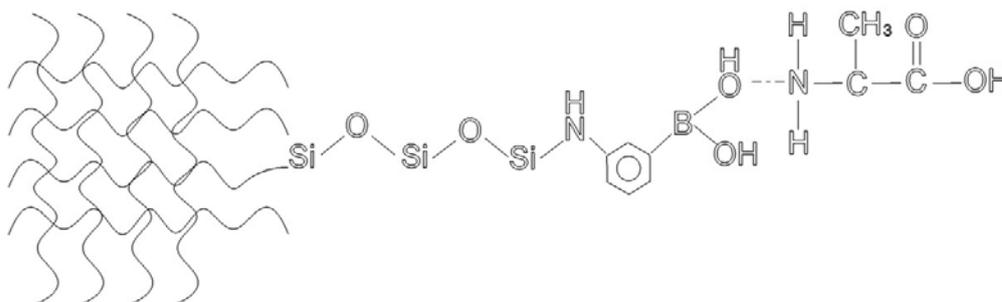


Figura 4.14 Interacción fenol-sensor

Como consecuencia de esta interacción el modo vibracional del benceno se modifica, conduciendo a un cambio en la densidad del sensor, liberando a la alanina del material híbrido. Estas interacciones pueden elucidarse de los datos de SAXS. La figura 4.15 presenta los perfiles de Kratky de las sílices funcionalizadas y sin funcionalizar. En los tres casos las curvas de dispersión siguen la ley de Porod, donde $I(h)$ es proporcional a h^{-4} para valores altos de h y a h^{-2} para valores moderados. Así, los perfiles Kratky exhiben un máximo, comportamiento típico en los objetos dispersores con forma esférica [49,50].

La tabla 4.1 resume las dimensiones fractales de los materiales SiO_2 , SiO_2 -APBA y SiO_2 -APBA-Ala.

La variación en la dimensión fractal indica que la red de sílice se hace menos compacta [51] conforme se le adiciona APBA y alanina. Por otra parte, las cadenas de sílice no son del todo rígidas en solución, ya que como mostrado por RMN, algunos grupos silanoles permanecen en los materiales funcionalizados. Así la interacción

propuesta en la figura 4.13 conduciría a la liberación de alanina para que a su vez se acople al fenol según se propone en la figura 4.13

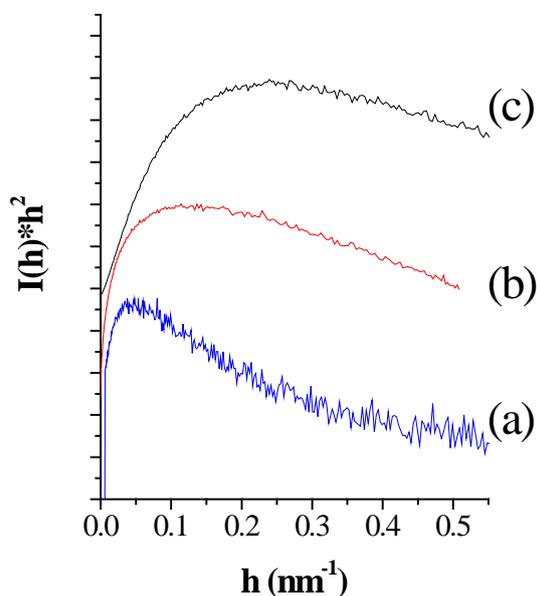


Figura 4.15 Perfiles de Kratky de los los materiales SiO_2 (a), $\text{SiO}_2\text{-APBA}$ (b) y $\text{SiO}_2\text{-APBA-Ala}$ (c).

Material	Dimensión fractal
SiO_2	2.91
$\text{SiO}_2\text{-APBA}$	2.48
$\text{SiO}_2\text{-APBA-Ala}$	2.32

Tabla 4.1. Dimensión fractal del sensor de sílice funcionalizado.

Hay que mencionar que la regulación de las moléculas objetivo no se termina con la interacción con el aminoácido sino que, se espera que en otro medio, por ejemplo enzimático, se catalicen otras reacciones en donde la molécula objetivo reaccione para producir compuestos de interés biológico. No obstante, esta tesis no se planteó como objetivo la etapa de catálisis enzimática y aborda

solamente las interacciones sensor-molécula objetivo. En este sentido, en la tabla 4.2 se observa la disminución de la concentración de cada fenol en función del tiempo, después de haber agregado el sensor a la solución que contenía el fenol.

Tiempo [minutos]	Pyrocatecol [M]	Resorcinol [M]	4-metilcatecol [M]
0	0.056	0.053	0.055
5	0.050	0.049	0.053
30	0.048	0.045	0.051
60	0.042	0.035	0.048
90	0.040	0.031	0.046
120	0.040	0.030	0.043
400	0.040	0.030	0.041

Tabla 4.2 Variación de la concentración de la molécula objetivo después de estar en contacto con el sensor SiO₂-APBA-Ala con respecto al tiempo.

La velocidad con la que se forma el complejo alanina-fenol es proporcional a la velocidad con la que disminuye la concentración del fenol en la solución acuosa y depende de la naturaleza del fenol. La cantidad máxima de fenol que puede eliminar de la solución acuosa también es una función del tipo de fenol. Las diferencias se notan mejor en las gráficas de la figura 4.16.

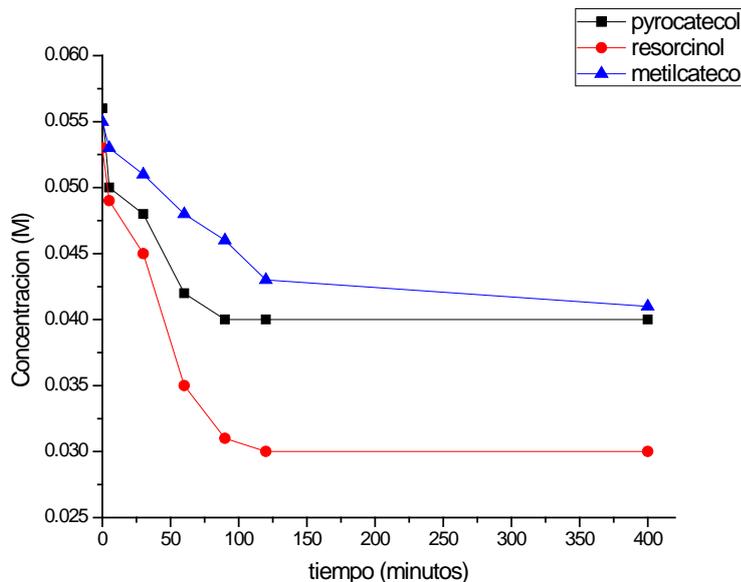


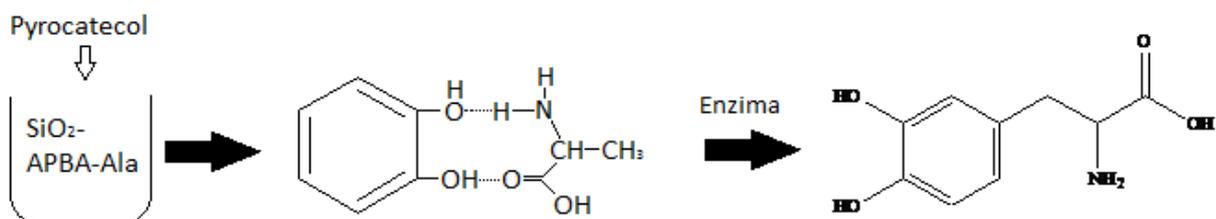
Figura 4.16 Eliminación de fenoles en solución acuosa por interacción con alanina liberada del sensor $\text{SiO}_2\text{-APBA-Ala}$.

Antes de agregar el sensor a la solución de fenol, la concentración de fenol fue estable al menos por 5 horas. Por otra parte, el sensor en medio acuoso no liberó alanina en ausencia de fenol, lo que confirmó las propiedades de los materiales híbridos como sensores.

Una vez que se adicionó el sensor, la concentración de resorcinol disminuyó más rápidamente si se compara con los otros dos fenoles. Los resultados son relevantes ya que se inicia de la misma concentración de fenol y el sensor contiene un exceso de alanina que debería neutralizar al fenol. También, es el resorcinol el fenol que llega a la concentración más baja de los tres fenoles evaluados. Por el contrario, el metilcatecol es el fenol que se elimina más lentamente y además, después de 400 minutos, solo se ha eliminado el 25% de la concentración original. La concentración del pyrocatecol también disminuye solo al 70% de la concentración inicial pero lo hace más rápido que el metilcatecol. Estas diferencias pueden

explicarse por las capacidades diferentes que tienen los fenoles para formar los puentes de hidrógeno con la alanina. Primeramente, el resorcinol tiene los grupos $-OH$ en las posiciones 1,3 del anillo bencénico, por tanto es improbable que una sola molécula de alanina interaccione con los dos hidroxilos de una misma molécula de resorcinol, causando entonces que las alaninas liberadas reaccionen más fácilmente con un solo OH del resorcinol y varios complejos son posibles; la disminución del resorcinol es proporcional al número de especies formadas. Es claro que en el caso del metilcatecol debe haber un impedimento estérico para que se logre la interacción propuesta entre fenol y alanina. El grupo metil del metilcatecol tiene la libertad de girar sobre el eje perpendicular al anillo bencénico lo que dificulta la interacción esperada. Finalmente, en el caso del pyrocatecol, la interacción de la alanina con los dos grupos $-OH$ del fenol es muy probable, dándole estabilidad al complejo pyrocatecol-alanina pero llegando a un equilibrio en donde no se elimina más que una pequeña parte del pyrocatecol inicial. Esto por supuesto puede modificarse en presencia de un medio biológico. Como mencionado anteriormente, los complejos fenol-alanina pueden evolucionar por catálisis enzimática.

En el caso del sistema pyrocatecol-(SiO_2 -APBA-alanina), se llevó a cabo un experimento adicional: se efectuó la evaluación del sensor en una solución acuosa que contenía fenol (0.05M) y se adicionó la enzima tirosina-fenol-lyasa [52], y una vez que se puso en contacto a esta solución con el sensor, se siguió por RMN¹H la reacción siguiente [53, 54, 55]:



Antes de la adición de la enzima no se observó la señal del grupo metileno, CH₂ (1.49 ppm), del producto 3(3,4 dihidroxi fenil) alanina (L-DOPA). 5 minutos después de iniciado el experimento se observó la señal de este grupo, confirmando la reacción descrita anteriormente.

La intensidad del pico RMN del grupo CH₂ varió en función del tiempo, Figuras 4.17a y 4.17b. Primero se incrementó a tiempos cortos y después decreció, sugiriendo que la molécula L-DOPA primeramente se produce y después es capturada por el sólido. Este resultado es relevante ya que puede usarse para implementar una vía de síntesis de L-DOPA, que es un compuesto muy importante desde el punto de vista farmacéutico ya que se utiliza para el tratamiento del Alzheimer. No obstante, se reitera que la tesis no tiene como objetivo principal la etapa de la catálisis enzimática sino la etapa del sensor.

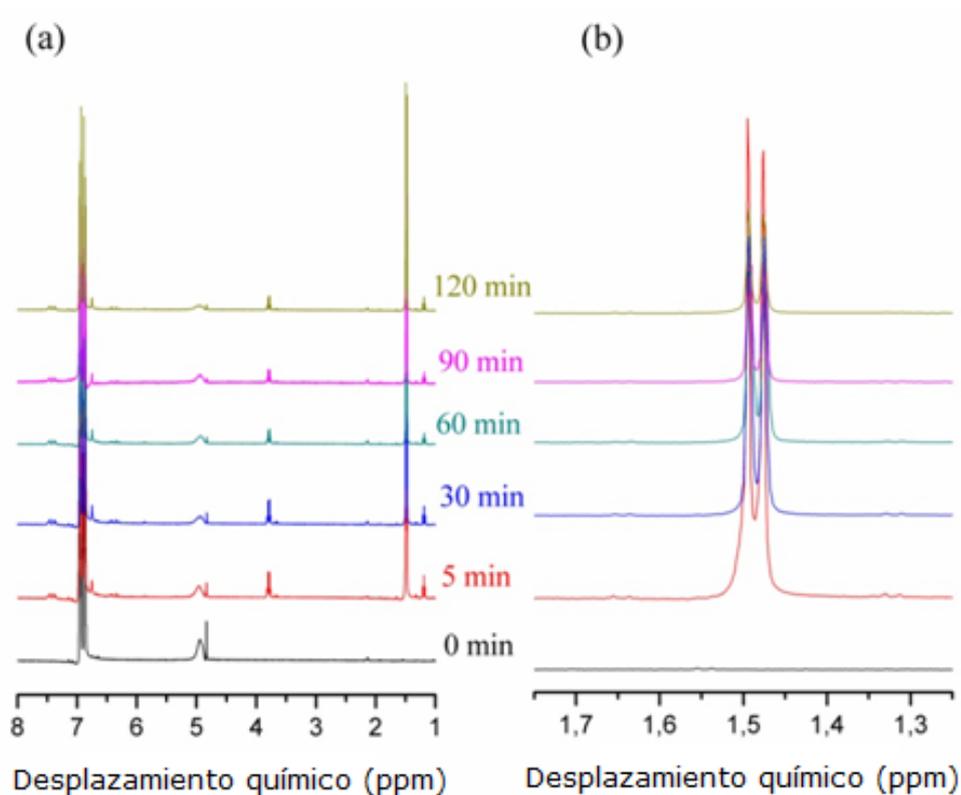


Figura 4.17. Espectros ^1H RMN de una solución de pyrocatecol y tyrosina fenol lyasa en ausencia (0 min) y en presencia del sensor híbrido SiO_2 -APBA-alanina a diferentes tiempos de contacto. Espectros en la ventana espectral completa (a). En (b) se muestra la ventana espectral donde se observa el doblete debido a CH_2 de L-DOPA.

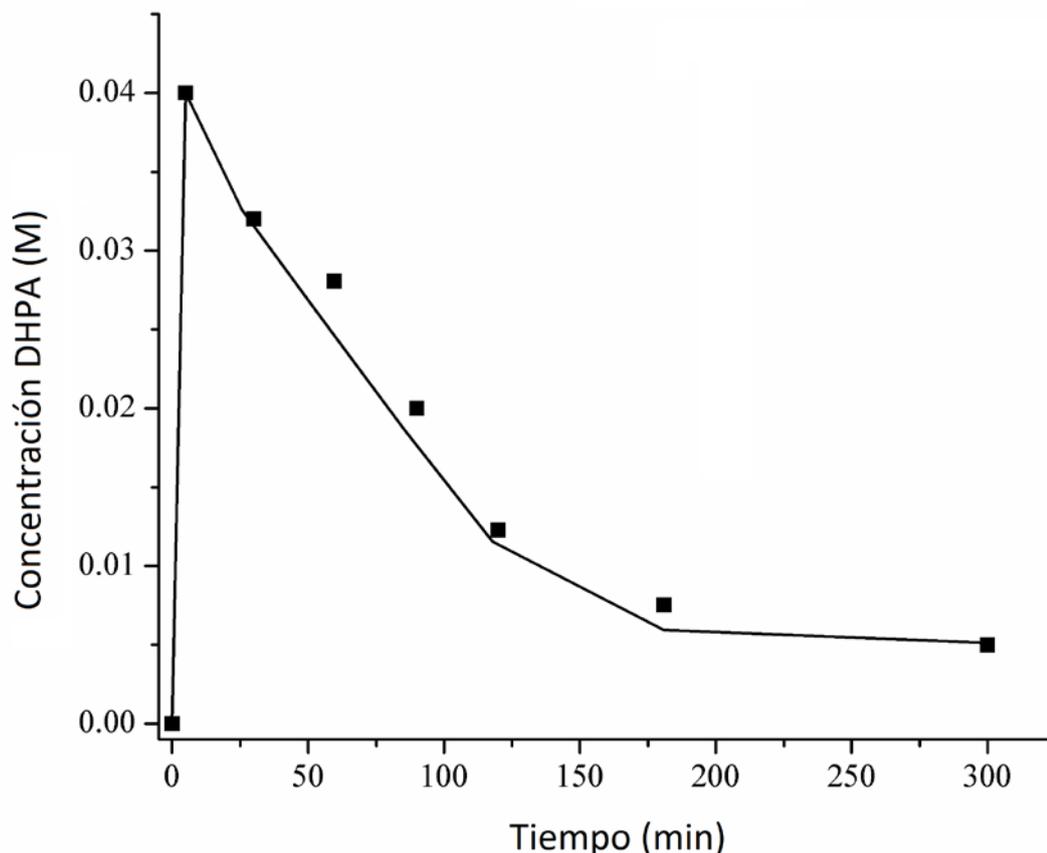


Figura 4.18 Producción y remoción de 3-(3,4-Di-hidroxi fenil) alanina a partir del sistema pyrocatecol-(SiO₂-APBA-alanina).

Si se comparan las dos evaluaciones del sistema (SiO₂-APBA-Ala)-pyrocatecol, con y sin enzima, claramente el experimento con enzima elimina más pyrocatecol de la solución, esto se explica porque el complejo alanina-pyrocatecol formado se consume vía catálisis enzimática y la formación del complejo procede nuevamente a fin de cumplirse el principio de Le-Chatelier [56]. Es decir, que la liberación de alanina y formación del complejo alanina-fenol debiera de verse como un equilibrio y no como una reacción irreversible. La producción de altas cantidades de L-DOPA en solución se da en los primeros 5 minutos pero después este compuesto se adsorbe en el sólido. Hasta ahora, no se ha mencionado con detalle la interacción inicial sensor-molécula objetivo, pero como mencionado anteriormente, la

liberación de alanina no ocurre por el solo contacto con agua, sino que es necesaria la presencia del fenol en solución, lo que confirma la propiedad de sensor.

Así, en la figura 4.19 se propone el mecanismo para la detección-eliminación del pyrocatecol, y en general de los fenoles, en solución acuosa.

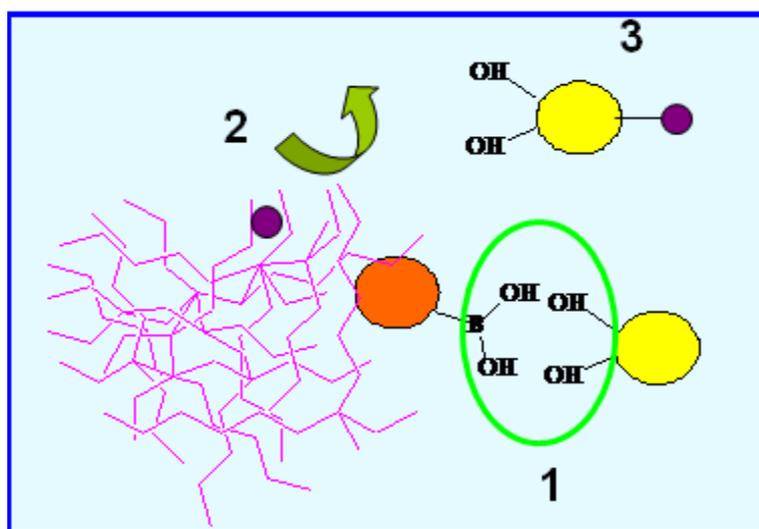


Figura 4.19. Esquema de funcionamiento de un sensor para neutralizar fenol en solución acuosa.

El mecanismo puede describirse en 3 etapas. Primeramente el pyrocatecol en solución (amarillo) reacciona con el APBA del sensor (anaranjado), lo cual afecta la densidad de la matriz de sílice del sensor, liberando en una segunda etapa alanina (púrpura) que se encontraba atrapada en la red de sílice (rosa). Finalmente, el complejo alanina-pyrocatecol se forma por interacciones de puentes de hidrógeno y, eventualmente, se transforma a L-DOPA en presencia de enzimas.

El mecanismo que se propuso no es exclusivo de este tipo de materiales, la dosificación controlada de moléculas activas ocurre en sistemas médicos en donde materiales como la sílice se utilizan como

hospedadores para liberarlos en un sistema biológico. No obstante los sistemas SiO_2 -APBA-Ala no han sido utilizados para neutralizar catecoles y mucho menos para producir L-DOPA. De hecho, la L-DOPA comúnmente se sintetiza por un proceso enzimático extremadamente complejo [57].

4.2.2 Sistema (SiO_2 -APBA-Ala)-glucosa

Tomando en cuenta el mecanismo propuesto para que el material SiO_2 -APBA-Alanina interaccione con fenoles, se espera que también los hidróxidos de la glucosa interaccionen con este material, en la forma que se esquematiza en la figura 4.20. Entonces, este material también fue evaluado como sensor de glucosa. La concentración de glucosa en solución fue seguida mediante RMN ^1H e integración de la señal del H del grupo aldehído.

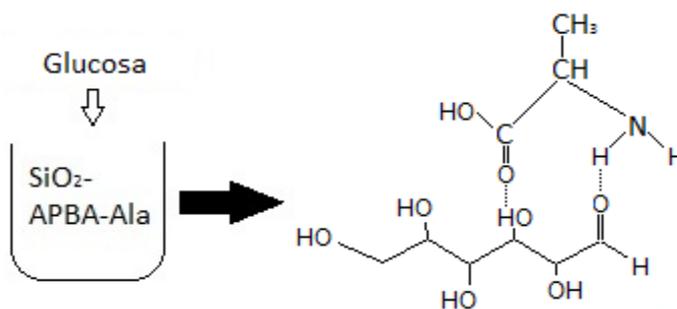


Figura 4.20 Reacción glucosa-alanina después de ser expuesto al sensor.

En la tabla 4.3 se puede apreciar como la concentración de glucosa disminuye rápidamente pero después de diez horas de monitoreo de la solución solo se ha eliminado aproximadamente el 30% de glucosa de la solución, en este caso debe tomarse en cuenta que posiblemente el método usado para monitorear el experimento no provee datos precisos ya que la forma no cíclica de la glucosa está

en equilibrio con la forma cíclica pero en el espectro ^1H RMN no hubo una señal bien definida que se pudiera integrar para la forma cíclica.

Tiempo [minutos]	Glucosa [M]
0	0.056
5	0.050
30	0.041
60	0.039
90	0.039
120	0.038
360	0.039
600	0.038

Tabla 4.3 Variación de la concentración de la glucosa después de estar en contacto con el sensor SiO_2 -APBA-Ala con respecto al tiempo.

4.2.3 Sistema (SiO_2 -APBA-insulina)-glucosa

En la tabla 4.4 se observa como la concentración de glucosa disminuye de forma rápida los primeros 90 minutos del monitoreo, la concentración disminuyó hasta en un 70% después de dos horas y la concentración se mantiene en un equilibrio aparente después de diez horas. Es claro que la insulina neutraliza la glucosa, pero con los experimentos realizados no es posible proveer de un mecanismo de interacción glucosa-sensor debido a que la insulina no se usó enriquecido en ^{13}C y por tanto es muy difícil seguirla por RMN. No obstante, sí puede decirse que el material híbrido es un neutralizador de glucosa en medio acuoso, pero el efecto regulador en un medio biológico no fue estudiado. La cantidad de glucosa neutralizada se compara con la que neutraliza un material inteligente orgánico [34], pero en este último caso la desventaja es que los materiales orgánicos pueden descomponerse más fácilmente que los

inorgánicos, incluso a condiciones suaves de temperatura, pero los sistemas biológicos podrían ser muy agresivos químicamente.

Tiempo [minutos]	Glucosa [M]
0	0.055
5	0.045
30	0.030
60	0.022
90	0.017
120	0.018
360	0.017
600	0.016

Tabla 4.4 Variación de la concentración de la glucosa después de estar en contacto con el sensor SiO₂-APBA-insulina con respecto al tiempo.

4.2.4 Sistema (p-NIPAM-insulina)-Glucosa

En la tabla 4.5 se reporta la variación en la concentración de la glucosa después de diferentes tiempos de contacto con el material p-NIPAM-insulina. Los resultados difieren notablemente de los obtenidos con el material SiO₂-APBA-insulina.

La concentración de glucosa disminuye más lentamente en el sistema que contiene p-NIPAM que en el que contiene insulina. Esto es de esperarse ya que las interacciones de la glucosa son diferentes para cada material, no obstante no puede decirse cual material es el mejor, solo puede decirse que ambos materiales son sensibles a la concentración de glucosa y que ambos la neutralizan, aunque a diferentes velocidades.

Tiempo [minutos]	Glucosa [M]
0	0.055
5	0.051
30	0.049
60	0.040
90	0.031
120	0.029
360	0.028
600	0.027

Tabla 4.5 Variación de la concentración de la glucosa después de estar en contacto con el sensor *p*-NIPAM-insulina con respecto al tiempo.

4.2.5 Sistema (*p*-NIPAM-alanina)-pyrocatecol

La eliminación de pyrocatecol usando el material *p*-NIPAM-alanina se resume en la tabla 4.6.

Tiempo [minutos]	Pyrocatecol [M]
0	0.055
5	0.055
30	0.052
60	0.049
90	0.045
120	0.043
400	0.041

Tabla 4.6 Variación de la concentración de pyrocatecol después de estar en contacto con el sensor *p*-NIPAM-alanina con respecto al tiempo.

Al igual que en el caso de la molécula glucosa, la red p-NIPAM en lugar de SiO_2 hace que la eliminación del pyrocatecol sea más lenta. El hecho de que ambas moléculas se eliminan más lentamente usando como matriz p-NIPAM puede atribuirse a interacciones más fuertes de los grupos OH con la matriz de p-NIPAM, lo cual es completamente posible ya que hay grupos polares que pueden interaccionar con ellos. Además, es de esperarse que la dimensión fractal varié mas significativamente en p-NIPAM que en SiO_2 ya que en general las redes orgánicas son menos rígidas. Aún así, con p-NIPAM la eliminación es más lenta, lo que confirma que las interacciones dipolares son determinantes.

5. Conclusiones

Se prepararon dos sistemas híbridos, el primero a base de sílice, APBA y alanina; el segundo a base de P-NIPAM, APBA e insulina. Estos sistemas fueron usados como sensores-reguladores de pyrocatecol, resorcinol, 4-metilcatecol y glucosa.

Las interacciones, por puente de hidrógeno, entre la molécula objetivo y el sensor son suficientes para provocar un cambio en la densidad del sensor que libera ya sea alanina o insulina para neutralizar a los fenoles o a la glucosa respectivamente.

La eficiencia del sensor depende tanto de la molécula objetivo como de la molécula que libera el sensor. En el caso del sistema (SiO₂-APBA-Ala)-Fenoles, el resorcinol se elimina más eficientemente debido a que no hay impedimentos estéricos para interactuar con la alanina, ni tampoco tiene la posibilidad de unirse a una molécula de alanina por dos puentes de hidrógeno.

La eficiencia de remoción de fenoles puede mejorarse si se añade una enzima que reaccione con el complejo fenol alanina.

En el caso del sistema (SiO₂-APBA-Insulina)-glucosa, la glucosa es fácilmente removida por insulina en tiempos tan cortos como dos horas.

6. Bibliografía

1. L. Nicole, L. Rozes, and C. Sanchez. Integrative approaches to hybrid multifunctional materials: From multidisciplinary research to applied technologies. *Adv. Mater.* 2010, 22, 3208-3214.
2. R. Gonzalez-McQuire, J. Chane-Ching, E. Vignaud, A. Lebugle and S. Manna. Synthesis and characterization of amino acid-functionalized hydroxyapatite nanorods, *J. Mater. Chem.* 2004, 14, 2277 – 2281.
3. C. Sanchez, B. Julian, P. Belleville, M. Popall. Applications of hybrid organic-inorganic nanocomposites. *J. Mater. Chem.* 2005, 15, 3559-3592.
4. E. Ruiz Hitzky, K. Ariga, Y. M. Lvov, *Bio-inorganic Hybrid Nanomaterials*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany 2008.
5. S. Park, Y. Ko, and C. Kim. Toxic effects of catechol and 4-chlorobenzoate stresses on bacterial cells. *J. Microb.* 2001, 39, 206-212.
6. M. Colarieti, G. Toscano, M. Ardi, G. Greco Jr. Abiotic oxidation of catechol by soil metal oxides. *J. Haz. Mat.* 2006, B134, 161-168.
7. T. Miyata, T. Uragami, K. Nakamae, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2002, 54, 79-98.
8. A. Matsumoto, R. Yoshida, and K. Kataoka. Glucose-Responsive Polymer Gel Bearing Phenylborate Derivative as a Glucose-Sensing Moiety Operating at the Physiological pH. *Biomacro.* 2004, 5, 1038-1045.
9. Y. Qiu, K. Park. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv. Drug. Delivery Rev.* 2001, 53, 321-339
10. D. Avnir, T. Coradin, O. Lev, J. Livagré. Recent bio-applications of sol-gel materials. *J. Mater. Chem.* 2006, 16, 1013-1030.
11. F. Mammeri, E. Le Bourhis, L. Rozes, C. Sanchez. Mechanical properties of hybrid organic-inorganic materials. *J. Mater. Chem.* 2005, 15, 3787-3811.
12. C. Sanchez, G. J. de A. A. Soler-Illia, F. Ribot, T. Lalot, C. Mayer, and V. Cabuil. Designed Hybrid Organic-Inorganic Nanocomposites from Functional Nanobuilding Blocks. *Chem. Mater.* 2001, 13, 3061-3083.
13. E. Lima, A. Guzmán, M. Vera, J. L. Rivera, J. Fraissard. Aged Natural and Synthetic Maya Blue-Like Pigments: What Difference Does It Make? *J. Phys. Chem.* 2012, 116, 4556–4563.
14. C. Sanchez, H. Arribart and M. Guille. Biomimetism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems. *Nat. Mat.* 2005, 4, 277-288.
15. Mann, S. & Ozin, G. A. Synthesis of inorganic materials with complex form. *Nature.* 1996, 382, 313-318.

- 16.** P. Gómez-Romero, C. Sanchez, *Functional hybrid materials*, Wiley-VCH, Weinheim. Germany 2003.
- 17.** G. Ozin. *Panoscopic materials: synthesis over 'all'length scales*. 2000, 6, 419-432.
- 18.** D. Tranchemontagne, J. Mendoza-Cortes, M. O'Keeffe, O. Yaghi. *Secondary building units, nets and bonding in the chemistry of metal-organic frameworks*. *Chem. Soc. Rev.* 2009, 38, 1257-1283.
- 19.** J. Rooke, A. Léonard, H. Sarmiento, J. Descy, B. Su. *Photosynthesis within porous silica gel: viability and activity of encapsulated cyanobacteria*. *Mater. Chem.* 2008, 18, 2833-2841.
- 20.** J. Han, X. Xu, X. Rao, M. Wei, D. G. Evans and X. Duan. *Layer-by-layer assembly of layered double hydroxide/cobalt phthalocyanine ultrathin film and its application for sensor* 2011, 21, 2126-2130.
- 21.** J.H. Choy, S.Y. Kwak, Y.J. Jeong, J.S. Park. *Inorganic Layered Double Hydroxides as Nonviral Vectors*. *Angew. Chem.* 2000, 39, 4041.
- 22.** M. Ejaz, H. Yu, Y. Yan, D.A. Blake, R. S. Ayyala, S. M. Grayson. *Evaluation of redox-responsive disulfide cross-linked poly(hydroxyethyl methacrylate) hydrogels*. *Polymer.* 2011, 52, 5262-5270.
- 23.** R. H. Pelton and P. Chibante. *Preparation of aqueous latices with N-Isopropylacrylamide*. *Colloids and Surfaces.* 1986, 20, 247-256.
- 24.** K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, and U. S. Schubert. *Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons As Well as Potential Alternatives*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 2-23.
- 25.** R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer. *Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres*. *Science.* 1994, 263, 1600 – 1603.
- 26.** G. Underhill, A. Chen, D. Albrecht, N. Bhatia. *Assessment of hepatocellular function within PEG hydrogels* *Biomaterials.* 2007, 28, 256-270.
- 27.** D. Mooney, S. Park, P. Kaufmann, K. Sano, K. McNamara, J. Vacanti, R. Langer *Biodegradable sponges for hepatocyte transplantation*. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995, 29, 959-965.
- 28.** V. Lapeyre, I. Gosse, S. Chevreux, and V. Ravaine. *Monodispersed Glucose-Responsive Microgels Operating at Physiological Salinity*. *Biomacromol.* 2006, 7, 3356-3363.
- 29.** S. Quideau, D. Deffieux, C. Douant-Casassus, and L. Pouységu. *Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities and synthesis*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 586-621.
- 30.** T. Tsutsui, N. Hayashi, H. Maizumi, J. Huff, J. Barret. *Benzene-, catechol-, hydroquinone - and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells*. *Mutant Res.* 1997, 373, 113-123.

- 31.** R. Rupali, A. James, Renewable hydrogen by aqueous-phase reforming of glucose Chem. Commun. 2004, 1, 36-37.
- 32.** P. Williams, G. Phillips, Formation of "Weak Gel" Networks by Konjac Glucomannan in Mixtures with Sucrose, Glucose or Fructose Gums and Stabilisers for the Food Industry 2009, 15, 201-208.
- 33.** I. James Colquhoun. Some constitutional problems of carbohydrate chemistry. J. Chem. Soc., Trans., 1923, 123, 898-921.
- 34.** S. Kitano, Y. Koyama, K. Kataoka, T. Okano, Y. Sakurai. A novel drug delivery system utilizing a glucose responsive polymer complex between poly (vinyl alcohol) and poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) with a phenylboronic acid moiety, J. Con. Rele. 1992, 19, 161-170.
- 35.** K. Mackenzie, M. Smith, Multinuclear Solid State NMR of Inorganic Materials (Pergamon, Netherlands, 2002) p. 212.
- 36.** M. Schneider, R. Zantl, C. Gege, R. Schmidt, M. Rappolt, and M. Tanaka Hydrophilic/Hydrophobic Balance Determines Morphology of Glycolipids with Oligolactose Headgroups. Biop. J. 2003, 84, 306-313.
- 37.** O. Glatter. Convolution square root of band-limited symmetrical functions and its application to small-angle scattering data. J. Appl. Cryst. 1981, 14, 101-108.
- 38.** O. Glatter, B. Hainisch. Improvements in real-space deconvolution of small-angle scattering data. J. Appl. Cryst. 1984, 17, 435-441.
- 39.** N. Maurer, O. Glatter, M. Hofer. Determination of size and structure of lipid IVA vesicles by quasi-elastic light scattering and small-angle X-ray scattering. J. Appl. Cryst. 1991, 24, 832-835.
- 40.** A. Harrison, Fractals in Chemistry. Oxford University Press Inc. 1995.
- 41.** A. Montesinos-Castellanos, E. Lima, J. A. de los Reyes, V. Lara Fractal Dimension of MoP-Al₂O₃ Catalysts and Their Activity in Hydrodesulfurization of Dibenzothiophene. J. Phys. Chem. C. 2007, 111, 13898-13904.
- 42.** H. Kalinowski, S. Berger, S. Braun, Carbon-13 NMR Spectroscopy, John Wiley & Sons, New York, 1988.
- 43.** A. Cotano, Q. Kau, M. T. Navarro, J. Pérez, F. Rey. Synthesis of MLM-41 with different pore diameters without addition of auxiliary organics. Chem. Mater. 1997, 9, 2123-2126.
- 44.** Beck, S. S. Patent, US. 5, 057, 296, 199.
- 45.** G. Pozarnsky, A. McCormick. Multinuclear NMR study of aluminosilicate sol-gel synthesis using the prehydrolysis method. J. Non-Cryst. Solids, 1995, 190, 212-225.
- 46.** A. Paul. Chemistry of Glasses, 2Ed (Chapman and Hall, Great Britain), 1990, 52-53.
- 47.** Y. Lee, M. White. Insulina receptor substrate proteins and diabetes. Arch. Pharm. Res. 2004, 27, 361-370.

- 48.** C. Reiter, L. Sandirasigarane, M. Nakamura, K. Gilbert, R. Singh, P. Fort, D. Antonelli, T. Gardner. Diabetes reduces basal retinal insulin receptor signaling reversal with systematic and local insulin. *Diabetes*, 2006, 55, 1148-1156.
- 49.** E. Martin, A. Hurd. Scattering from fractals. *J. Appl. Crystallogr.* 1987, 20, 61-78.
- 50.** M. Kataoka, J. Flanagan, F. Tokunaga, D. Engelman. Use of X-ray solution scattering for protein folding study. In *Synchrotron Radiation in the Biosciences*. B. Chaise, J. Deisenhofer, S. Ebashi, D. Goodhead, H. Huxley, Eds. Clarendon Press: Oxford, U.K., 1994; Vol. 4, p 87.
- 51.** H. Chen and R. S. Phillips. Binding of phenol and analogues to alanine complex of tyrosine phenol-lyase from *Citrobacter freundii*: Implications for the mechanisms of α,β -elimination and alanine racemization. *Biochemistry*. 1993, 32, 11591-11599.
- 52.** I. Ibarra, S. Loera, H. Laguna, E. Lima and V. Lara. Irreversible Adsorption of an Aztec Dye on Fractal Surfaces. *Chem. Mater.* 2005, 17, 5763-5769.
- 53.** D. Mahmoud, M. El Bendary. Production of 3,4-dihydroxy phenyl-L-alanine (L-DOPA) by egyptian halophilic black yeast. *W. J. Micro. Biotech.* 2011, 27, 39-46.
- 54.** H. Kumagai, N. Kashima and H. Yamada. Racemization of D- or L-alanine by crystalline tyrosine phenol-lyase. *Biochemical and biophysical research communications*. 1970, 39, 769-801.
- 55.** D. Levy, D. Avnir, Effects of the changes in the properties of silica cage along the gel/xerogel transition on the photochromic behavior of trapped spiropyrans *J. Phys. Chem.*, 1988, 92, 4734-4738.
- 56.** Castellan, G. W. *Physical Chemistry*, 3rd ed. Addison-Wesley Pub. Co. 1964.
- 57.** W. Knowles. Asymmetric hydrogenation. *Acc. Chem. Res.* 1983, 16,3,106-112

7. Apéndices

Apéndice A

Polimerización por radicales libres.

El proceso de polimerización por radicales libres es uno de los métodos más usados en síntesis orgánica.

Este tipo de reacciones se emplean frecuentemente para sintetizar polímeros a partir de pequeñas moléculas pequeñas con dobles enlaces de carbono (C=C).

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón (e^-) libre con capacidad de aparearse, por lo que son muy reactivos.

La polimerización por este método es una reacción rápida que consta de las etapas características de una reacción en cadena: iniciación, propagación y terminación. Algunos pasos intermedios en la propagación incluyen eliminación de radicales y formación de ramificaciones.

Iniciación.

En esta etapa se lleva a cabo la activación de un enlace (generalmente doble), que puede ser por:

- Activación térmica (adición de energía), donde se necesitan temperaturas elevadas o determinadas sediciones (fotoquímica, radioquímica).
- Adición determinada de moléculas que actúan como indicadores químicos (molécula que genera radicales libres) en condiciones suaves.

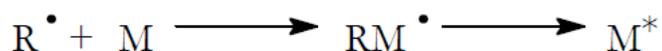
Esta última forma de iniciación es la que más se usa. Los iniciadores deben ser compuestos relativamente inestables para que fácilmente puedan dar lugar a radicales libres.

La iniciación consiste como se representa en la siguiente figura:



Esto es la ruptura hemolítica del iniciador que forma los radicales libres.

Después, el radical libre actúa sobre el monómero, esto crea un monómero activado M^* , como se muestra en la siguiente figura:



Propagación.

En la etapa de propagación, el monómero activado o radical libre formado en la iniciación, se une a otros monómeros, Obteniendo así una cadena activada M_n^* , este proceso es muy rápida debido a que la energía de activación es de unas 7000 cal/mol, esto puede ser de unas milésimas de segundo.

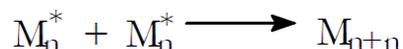


Terminación.

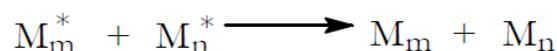
En esta etapa de cierre es donde se obtiene el polímero debido a la pérdida de actividad de las cadenas activadas en la etapa de propagación. Esta etapa puede ocurrir en cualquier momento, generalmente cuando presenta un aumento de la viscosidad, ya que existe un exceso de resto polimérico contra monómero.

La terminación puede darse por diferentes mecanismos, apareamiento, desproporción y transferencia de cadena.

En la terminación por apareamiento dos cadena activadas se adicionan entre sí con pérdida de actividad.



La terminación por desproporción se da cuando dos cadenas activas distintas se adicionan dando lugar a una desproporción

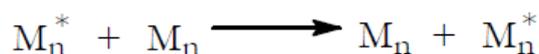


La terminación por transferencia de cadena puede tener lugar cuando:

Se adicionan la cadena activa de la etapa anterior y un monómero.



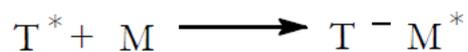
Entre la cadena activa y el polímero.



Y entre la cadena activa y un reactivo T llamado agente de transferencia el cual permite terminar la polimerización cuando se desee y así controlar el peso molecular medio del polímero sin necesidad de eliminar el iniciador, o como retardador de la polimerización.



Si el reactivo T comienza la formación de una nueva cadena, entonces es un retardador.



Pero si en lugar de reaccionar con un monómero reacciona consigo mismo para dar un producto inerte será un inhibidor.



El inhibidor termina totalmente la polimerización, mientras que el retardador termina la cadena pero no el proceso de polimerización.

Apéndice B

Resonancia magnética nuclear.

Algunos núcleos atómicos poseen un momento magnético ya que tienen carga y un espín intrínseco. El teorema de Wigner-Eckart nos da la relación entre el momento magnético y el espín del núcleo.

$$\mu = \gamma \hbar \vec{I} \quad (1)$$

Donde γ es la constante girométrica única para cada núcleo. \vec{I} es el operador de espín y \hbar es la constante de Planck dividida por 2π (6.582×10^{-16} eVs).

El espín nuclear se modifica al ser expuesto a un campo magnético externo \vec{B} y que en el caso del espín $\frac{1}{2}$ pueden ocurrir fenómenos de alineamiento: paralelo a o anti paralelo al campo \vec{B} . Esto se conoce como el efecto Zeeman, con lo que se pueden distinguir 2 estados de energía, cuya diferencia está dada por

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad (2)$$

Donde B_0 es la magnitud del campo magnético externo. El sistema formado por el momento magnético de un núcleo en un campo magnético externo tendrá el siguiente hamiltoniano:

$$\vec{H} = -\frac{1}{\hbar} \vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad (3)$$

Donde \vec{B} , el campo magnético externo, se expresa como $\vec{B} = B_0 \cdot \hat{B}$ siendo \hat{B} el vector unitario en la dirección del campo.

Estas tres ecuaciones (1, 2 y 3) son la base de la resonancia magnética nuclear.

Dado que proceso de alineación no es inmediato, se genera un efecto de precesión del espín en el plano XY. Entonces si el campo magnético esta en dirección del eje Z el hamiltoniano se expresa de la siguiente forma.

$$H_0 = \omega_L I_z = 2\pi\nu_L I_z \quad (4)$$

El espín precesa en función del tiempo a una frecuencia llamada frecuencia de Larmor $\omega_L = -\gamma B_0$ alrededor del eje Z como se muestra en la figura A.1, y ν_L es la frecuencia de Larmor expresada en Hz.

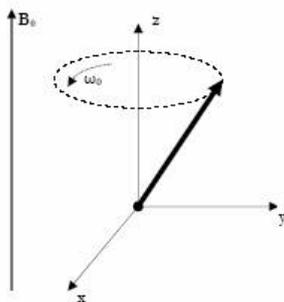


Figura A.1 Precesión del espín nuclear por la presencia del campo magnético B_0

Si se hace incidir un pulso de radio frecuencia consistente en un campo magnético adicional correspondiente al valor de la frecuencia de Larmor ω_L , el sistema absorberá la energía para cambiar de nivel energético a los espines y pasaran de un sistema de baja energía (paralelo) a uno de más alta energía (antiparalelo) y viceversa. Esto quiere decir, en RMN, que los espines están "resonando". Después de terminado el pulso de radiofrecuencia, el sistema regresa a su estado energético estable y se emite una onda llamada FID, es decir, se

emite una radiofrecuencia cuantificada por una función de inducción, la cual se detecta, amplifica y se analiza según la transformada de Fourier, lo que da lugar al espectro de RMN.

Experimentalmente, para cumplir con la condición de resonancia se hace una perturbación (magnetización) en el plano XY, que junto al movimiento de precesión da un efecto de que el plano XY estuviera rotando.

El núcleo no se encuentra aislado, en realidad se encuentra inmerso en un ambiente electrónico que genera un campo de apantallamiento o desapantallamiento, esto ocasiona que la frecuencia de RMN dependa de un campo magnético "local". El campo de apantallamiento se expresa de la siguiente forma:

$$B'_0 = B_0(1 - \sigma) \quad (5)$$

El apantallamiento da lugar a un cambio en la frecuencia de resonancia de los núcleos, por lo que se adquieren diferentes lecturas para los mismos núcleos dependiendo del ambiente electrónico en el que estén inmersos. Por lo que se pueden diferenciar grupos de átomos con diferente ambiente químico en una molécula.

Se podría construir una escala que dependiera del campo B_0 y de la frecuencia de resonancia de los núcleos pero sería muy complicado comparar espectros adquiridos en diferentes campos. Se utiliza entonces una escala que no depende de estos valores, esta se llama escala de desplazamiento químico, y se denota con la letra griega delta δ , la cual se define como:

$$\delta[ppm] = \frac{\Delta\nu}{\nu_{ref}} \times 10^6 ppm \quad (6)$$

Donde $\Delta\nu = \nu_{ref} - \nu_{med}$, que es la diferencia de una frecuencia de referencia y la frecuencia de resonancia de la muestra a un determinado B_0 . Para volver la escala relativa, la diferencia se divide entre la diferencia relativa y así se elimina la dependencia en B_0 . Los valores se presentan en unidades de ppm debido a los valores de las frecuencias.

Para núcleos ^{29}Si y ^{13}C se utiliza comúnmente como referencia el tetrametilsilano o TMS, con esta escala se pueden comparar, por ejemplo, desplazamientos químicos obtenidos a un campo de 4.7 Teslas con alguno adquirido a un campo de 9.3 Teslas.

Para el caso de RMN en estado sólido, se presentan otro tipo de interacciones, una de ellas y una de las más importantes es el acoplamiento dipolar, que es el resultado de la interacción de un campo magnético creado por un dipolo en relación con el campo generado por otro dipolo cercano. El hamiltoniano que describe estas interacciones en coordenadas esféricas se expresa como:

$$H_{dip} = \frac{\mu_0 \gamma_1 \gamma_2 \hbar^2}{4\pi r_{12}} I_{1z} I_{2z} (3\cos^2\theta - 1) \quad (7)$$

Donde μ_0 es la permeabilidad magnética en el vacío, γ_i es la constante giromagnética del núcleo i , I_{iz} es la proyección del espín del núcleo i en el eje Z , r_{12} es la distancia entre núcleos y θ es el ángulo que forma el vector que une a los núcleos con el campo externo B_0 . A diferencia de un líquido las moléculas de un sólido no se reorientan de manera rápida por lo que no se puede promediar la interacción dipolar. Si se analiza la ecuación (7) el efecto dipolar se anula en el caso en donde $3\cos^2\theta - 1$ sea igual a cero, lo cual ocurre con $\theta = 54.736^\circ$, a este ángulo se le conoce comúnmente como ángulo mágico. Por lo anterior es que los espectros de RMN en estado sólido

se obtienen haciendo girar la muestra en este ángulo ya que anula gran parte de la interacción dipolar.

Apéndice C

Dispersión de rayos X a ángulos pequeños (SAXS)

A diferencia del método de difracción de rayos X, el método de SAXS utiliza una resolución menos fina, ya que la materia se estudia a una resolución espacial de 10 a cientos de varios Å, haciendo de este método una herramienta muy útil.

En ángulos pequeños, una variación continua o discontinua de la densidad electrónica produce una dispersión de rayos X (a ángulos pequeños).

Las heterogeneidades de un medio continuo son los que dan lugar a la dispersión de rayos X a ángulos pequeños. Las heterogeneidades pueden ser poros, partículas, precipitados en las aleaciones, variaciones en la cristalinidad en polímeros. El ensanchamiento del haz que atraviesa se genera por los cambios de la densidad electrónica del medio. Por ejemplo, un sólido poroso heterogéneo, puede verse como un medio electrónico debido a la red del material de alta densidad y una red de poros (aire, gases, agua) de baja densidad inmersa en la fase de alta densidad.

La contribución de la dispersión depende del tamaño de las partículas, por lo que mientras más grandes sean estos, su contribución es cercana al ángulo cero y viceversa. Las partículas pequeñas son las que contribuirán a ensanchar el haz en ángulos un poco "más grandes".

Entonces la forma del haz dispersado $I(q)$ se puede relacionar con el tamaño de los objetos que lo dispersan. Se podrá medir el tamaño de las heterogeneidades, el tamaño y forma del poro, así como la morfología de la muestra pero no su naturaleza.

Para el análisis de la intensidad dispersada se suelen usar 2 ecuaciones, una exponencial, ley de Guinier, y otra polinomial ley de Porod. La primera de estas (ley de Guinier) coincide bien con los datos experimentales a ángulos pequeños, por lo que será muy útil si las heterogeneidades dispersoras son relativamente grandes mientras que la ley de Porod se ajusta mejor para la parte más alejada de la intensidad.

La Ley de Guinier se expresa como:

$$I(q) = \exp(-Rg q^2) \quad (1)$$

Donde "q" es el parámetro angular, y esta dado por

$$q = 4\pi \sin \theta / \lambda \quad (2)$$

Y dado que para ángulos pequeños se cumple que $\sin \theta \approx \theta$, la ecuación (2) se queda como:

$$q = 4\pi\theta / \lambda \quad (3)$$

Siendo θ el ángulo de incidencia y λ la longitud de onda de la radiación.

Rg es el radio de giro, el cual se puede determinar fácilmente a partir de la pendiente de la curva $\log I(q)$ función de q^2 . Este es un resultado importante ya que caracteriza en promedio el tamaño de las heterogeneidades sin hacer hipótesis de forma. Si las heterogeneidades dispersoras fueran esféricas y de radio a , se podría calcular su radio de giro y estaría dado por:

$$Rg = a(3/5)^{1/2} \quad (4)$$

El radio de giro también conocido como radio de Guinier se define como la distancia de inercia respecto al centro de gravedad. Y, si la colimación es puntual, la ley de Porod se expresa como:

$$I(q) = Aq^4 \quad (5)$$

Pero, si la colimación es lineal, la expresión válida es:

$$I(q) = A/q^3 + B \quad (6)$$

En la ecuación (6) se añade la constante B, que es el fondo constante del experimento. La constante A que es la ordenada al origen de la gráfica $q^3 I(q)$ versus q^3 (colimación lineal) es:

$$A = S(\rho - \rho_0)^2 / 8\pi^3 \quad (7)$$

Donde ρ y ρ_0 son densidades diferentes, una al material y otra a el medio en el que se encuentran.

S es el área específica entendida como el área de las partículas dispersoras por gramo de muestra. Si el material estudiado se trata de un sólido poroso, el área también tomará en cuenta aquella que sea inaccesible a los gases, es decir, que incorpora el área de las burbujas y de los poros cerrados.

Porod demostró que esta fórmula es válida no importando la forma de los granos dispersores, siempre y cuando no tenga un

diámetro nulo, esto es, que no sean bastoncillos o discos planos. Además, los objetos dispersores no necesariamente tienen que estar ordenados.

Hay que hacer notar que no se hace ninguna hipótesis de forma y que el valor obtenido incluye el área correspondiente a los poros inaccesibles a los gases.

La ley de Porod (ecuación (5)) es válida cuando la frontera entre el medio y las partículas dispersoras es nítida pero si presenta fluctuaciones en la densidad electrónica localmente, se dice que hay desviaciones a la Ley de Porod y se vuelve:

$$I(q) = A/q^D \quad (8)$$

Esta ecuación es válida siempre y cuando $1/q$ se mantenga en el intervalo que va del radio de la partícula al del cúmulo.

Por lo tanto, de la pendiente de la gráfica del $\log I(q)$ versus q se puede obtener la dimensión fractal (D) y el dominio fractal del objeto dispersor.

Para determinar la forma de las heterogeneidades responsables de la dispersión de rayos X a ángulos pequeños se utiliza una gráfica conocida como la gráfica de Kratky, esto es, $q^2 I(q)$ en función de q .

La forma que tome la gráfica de Kratky indica la forma de las heterogeneidades. Si se obtiene una parábola, entonces las heterogeneidades son esféricas, mientras que si la curva es una recta, la forma es fibrilar y si forma una media parábola representa formas de láminas.

Usando la gráfica de Kratky y la curva completa de dispersión de rayos X a ángulos pequeños se puede calcular la distribución de tamaño. Este cálculo requiere de transformadas de Fourier y Laplace

y se vuelve un cálculo complicado por lo que se usan programas como el ITP-92 que recurre a splines.

Cuando se tiene una distribución de partículas metálicas y se comparan con difracción de rayos X, los tamaños determinados no suelen coincidir. Esto es porque en dispersión de rayos X a ángulos pequeños se determina la distribución de tamaño de partícula y en difracción de rayos X la de cristalitas.

La caracterización por dispersión de rayos X a ángulos pequeños puede proveer la forma y distribución de tamaños de heterogeneidades, el radio de giro y la dimensión fractal de estas heterogeneidades que van de 1 a 400 Å.

Apéndice D

Microscopio electrónico de barrido.

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento de caracterización que permite observar y caracterizar materiales orgánicos e inorgánicos superficialmente, lo que proporciona información morfológica del material analizado. Las principales utilidades del SEM es la alta resolución hasta 100 \AA , la profundidad de campo que da apariencia tridimensional y la facilidad de preparación de las muestras.

El microscopio electrónico de barrido utiliza un haz de electrones que se hace incidir sobre la muestra a analizar, interactuando con la materia mediante colisiones, lo que se detecta con diferentes detectores que amplifican la señal emitida por la superficie cuando es barrida por el haz de electrones. Después esta señal amplificada se visualiza en un monitor convencional.

La interacción de los electrones incidentes y los átomos que conforman la muestra se clasifican de la siguiente forma: colisiones elásticas, inelásticas y emisión de radiación de frenado. Las colisiones elásticas son aquellas que modifican la trayectoria del electrón incidente, mientras que las colisiones inelásticas provocan una pérdida de energía, los electrones sometidos a colisiones inelásticas también son llamados como electrones secundarios. Los electrones retrodispersados son aquellos que han sufrido múltiples colisiones elásticas e inelásticas.

Los electrones secundarios tienen, por convenio, una energía menor a 50eV . El número de electrones secundarios que se produce del bombardeo de la muestra varía según el ángulo de incidencia del haz, el número atómico de los núcleos en la muestra tiene poca

influencia, sin embargo el número de electrones retrodispersados aumenta casi linealmente con el número atómico.

Por lo tanto si la muestra es rugosa la cantidad de electrones secundarios que se detectarán será diferente para cada inclinación en los sectores de la muestra, esto se verá en el monitor como zonas muy iluminadas correspondientes a zonas que producen muchos electrones secundarios, zonas con sombra con pocos electrones secundarios y zonas con tonos intermedios en donde la cantidad de electrones secundarios es intermedia. Estas diferentes tonalidades es lo que da la sensación de relieve. Los electrones secundarios son indispensables para el estudio morfológico de la muestra alcanzando resoluciones menores a 1 nm.

Para garantizar una mejor imagen a las muestras se les recubre con una capa delgada de distintos metales, siendo uno de los más efectivos el recubrimiento con oro utilizando la técnica de sputtering para películas delgadas.