



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

MÉTODO PARA LA EVALUACIÓN DE
BIOMATERIALES COMO POSIBLES
CAPTORES DE CO₂ MEDIANTE
ESPECTROMETRÍA DE FLUORESCENCIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

SARA CAROLINA HUERTA GUERRERO

DIRECTOR:

M. en I. MA ESTELA DE LA TORRE GÓMEZ
TAGLE



MÉXICO, CDMX

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento al Instituto Mexicano del Petróleo por brindarme la oportunidad de realizar una tesis experimental en sus instalaciones.

Agradezco a mi asesora, Maestra Ma Estela de la Torre Gómez Tagle por todo su apoyo, tanta paciencia y por nunca dejar de lado este trabajo.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, que con orgullo llamo mi universidad, por darme la formación académica que me ha traído hasta este punto.

Dedicatorias

A mi familia, como un testimonio de que habrá un mejor mañana.

A mi padre, Ramón Huerta Ruiz, a quien desearía poder mostrarle que su ejemplo no ha sido en vano.

Siempre tendrán un lugar especial en mi corazón y en esta tesis las maestras Ma Estela De la Torre y María José Marques Dos Santos, quienes me orientaron con sabios consejos y nunca se dieron por vencidas.

A Celeste Hernández, por su cariñoso impulso y constante apoyo, por ayudarme a salir de cada adversidad que se presentó en el largo trayecto.

A la M. en C. Annia Alejandra, quien siempre encontró palabras para levantarme cuando nada parecía estar bien.

Con mucho amor, me gustaría compartir este trabajo con mis amigos de la carrera, Mauricio Morales, Abdallah Murillo, Guadalupe Belman, Denis Monroy y Luz Cárdenas.

Contenido

Glosario	1
Resumen.....	3
Introducción	4
Planteamiento del problema	5
Hipótesis.....	7
Objetivo.....	7
Objetivos particulares	7
CAPÍTULO 1. Marco teórico.....	8
1.1 CO ₂ y el efecto invernadero	8
1.2 Captura de CO ₂	10
1.2.1 Tecnologías para la captura de CO ₂	11
1.2.2 Absorción.....	15
1.3 Aminoácidos.....	25
1.3.1 Propiedades Ácido-Base.....	26
1.3.2 Estereoisomería.....	26
1.3.3 Clasificación de los aminoácidos	27
1.3.4 Aminoácidos en la industria	31
1.4 Espectroscopia	32
1.4.1 Fundamentos	32
1.4.2 Espectrofotometría y la ley de Lambert-Beer	33
1.4.3 Consideraciones generales al realizar mediciones espectroscópicas	37
1.5 Espectroscopia de fluorescencia	38
1.5.1 Fenómenos de fotoluminiscencia	39
1.5.2 Sustancias que presentan fluorescencia y su importancia en investigación ...	41
1.5.3 Espectros de fluorescencia.....	44
1.5.4 Amortiguación de la fluorescencia.....	45
1.5.5 Excímeros y monómeros	46
1.5.6 Efecto de la concentración en la fluorescencia.....	50
CAPITULO 2. Desarrollo experimental	52
Diagrama General	52
2.1 Reactivos y equipo	53
2.1.1. Reactivos	53

2.1.2 Equipo	53
2.2 Métodos experimentales	54
2.2.1 Preparación de las muestras	54
2.2.2 Obtención de los espectros de emisión y excitación	54
2.2.3 Determinación de interacciones específicas	55
2.2.4 Determinación de linealidad	55
2.2.5 Porcentaje de error	56
2.2.5 Método experimental para determinar interacción específica mediante fluorometría de estado basal en aminoácidos	57
CAPITULO 3. Resultados y discusión	58
3.1 Determinación de la concentración del fluoróforo	58
3.2 Determinación de interacción específica entre el fluoróforo y amina de referencia	61
3.3 Determinación de la concentración adecuada para la amina de referencia	62
3.4 Determinación del método de adición de CO ₂ a la muestra y tiempo de adición..	63
3.4.1 Por atmósfera de CO ₂	63
3.4.2 Burbujeo con aguja	64
3.4.3 Burbujeo a través de medio poroso	65
3.5 Método de burbujeo experimental	66
3.5.1 Determinación de la temperatura a la que se realizará el procedimiento	67
3.5.2 Determinación de la concentración del fluoróforo a 40 °C	69
3.5.3 Determinación de la concentración adecuada para la amina de referencia a 40 °C	70
3.5.4 Determinación del tiempo de adición de dióxido de carbono a 40 °C	72
3.5.5 Resultados del método experimental establecido	73
Conclusiones	77
Bibliografía	78
Referencias electrónicas	79
ANEXOS	82
I. Emisiones de CO ₂ en México	82
II. Procedimiento de Operación del Espectrofluorofotómetro Shimadzu Modelo RF-5301	85

FIGURAS

Figura 1. Efecto invernadero.....	8
Figura 2. Ciclo del Carbono.....	9
Figura 3. Diagramas de bloques que ilustran los sistemas de post-combustión, pre-combustión y oxi-combustión.....	10
Figura 4. Adsorción química y física.....	13
Figura 5. Estructuras cristalinas de varios MOFs.....	14
6. Membranas.....	14
Figura 7. Licuefacción criogénica.....	15
Figura 8. Diagrama de una planta de absorción de CO ₂	16
Figura 9. Interacción de un LI con CO ₂	17
Figura 10. Proceso de absorción con aminas.....	20
Figura 11. Molécula de amoníaco.....	23
Figura 12. Proceso PostCap™ de Siemens.....	24
Figura 13. Estructura general de los aminoácidos.....	25
Figura 14. Zwitterion.....	26
Figura 15. Estereoisómeros.....	27
Figura 16. Conformación de los L-aminoácidos.....	27
Figura 17. Regiones del espectro electromagnético.....	34
Figura 18. Función de un monocromador al escoger un intervalo de longitudes de onda.....	35
Figura 19. Atenuación de un haz de radiación por una solución absorbente.....	35
Figura 20. Transmisión, reflexión, refracción, absorción y luminiscencia.....	38
Figura 21. Diagrama de Jablonski.....	40
Figura 22. Fluorescencia: brillo de colores.....	41
Figura 23. Ajolote con sangre fluorescente.....	42
24. Piel de las piernas en luz visible y ultravioleta.....	43
25. ELISA.....	43
Figura 26. Desplazamiento de Stokes.....	44
Figura 27. Regla de Kasha.....	44
Figura 28. Espectros de excitación y emisión del antraceno.....	45
Figura 29. Fluorescencia de quinina.....	46
Figura 30. Espectro de emisión de antraceno disuelto en tolueno con 0.2 M de dietilnilina.....	46
Figura 31. Molécula de pireno.....	47
Figura 32. Espectro de emisión de pireno y su excímero.....	47
Figura 33. Formación de excímeros.....	48
Figura 34. Formación y fluorescencia de un excímero.....	48
Figura 35. Formación de excímero y espectros de emisión de éste y el monómero.....	49
Figura 36. Fluorescencia del monómero a bajas concentraciones.....	50
Figura 37. Emisión del excímero a bajas concentraciones.....	50
Figura 38. Aumento de fluorescencia del monómero al aumentar la concentración.....	51
Figura 39. Aumento de fluorescencia del excímero al aumentar la concentración.....	51

Figura 40. Disminución de la fluorescencia del monómero al aumentar la concentración.	51
Figura 41. Disminución de la fluorescencia del excímero al aumentar la concentración. 51	
Figura 42. Sistema de burbujeo con aguja.....	64
Figura 43. Sistema de burbujeo a través de material poroso.....	65
Figura 44. Sistema de burbujeo experimental.....	66
Figura 45. Diagrama de emisiones de GEI para México (2010).	84
Figura 46. Ventana de chequeo.	87
47.Ventana de medición,.....	88

TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los diferentes acercamientos a la captura de CO ₂	12
Tabla 2. Aminas primarias, secundarias y terciarias.	18
Tabla 3. Comparación entre las tecnologías usadas para captura de CO ₂	19
Tabla 4. Otras aminas usadas para captura de CO ₂	21
Tabla 5. Estado del arte de la absorción química basada en aminas.....	22
Tabla 6. Clasificación de los 20 aminoácidos estándar por su cadena lateral.	28
Tabla 7. Longitud de onda de los colores visibles.	33
Tabla 8. Interacciones pireno-MEA.....	61
Tabla 9. Atmósfera de CO ₂ , agitación sónica.	63
Tabla 10. Atmósfera CO ₂ agitación en incubadora a 140 rpm.....	64
Tabla 11. Burbujeo con aguja. MEA variable.	64
Tabla 12. Burbujeo con aguja. Tiempo variable.....	65
Tabla 13. Burbujeo a través de medio poroso. Tiempo variable.....	66
Tabla 14. Sin CO ₂ . Temperatura vs ΔCEM.....	67
Tabla 15. CO ₂ . Temperatura vs ΔCEM.	67
Tabla 16. 25 °C y 40 °C, repetición. Temperatura vs ΔCEM.....	68
Tabla 17. 25 °C y 40 °C. Porcentaje de error del CEM del monómero.....	68
Tabla 18. 25 °C y 40 °C. Porcentaje de error del CEM del excímero.....	68
Tabla 19. Interacciones pireno-MEA.....	71
Tabla 20. Interacciones a 40°C variando tiempo de adición de CO ₂	72
Tabla 21. Interacciones pireno-CO ₂ a 40 °C.	72
Tabla 22. Interacciones 40 °C.....	73
Tabla 23. 25 °C Aminoácidos.....	74
Tabla 24. 25 °C Aminoácidos y CO ₂	74
Tabla 25. 40 °C Aminoácidos.....	75
Tabla 26. 40 °C Aminoácidos y CO ₂	75
Tabla 27. Aminoácidos que presentan interacción específica con CO ₂	77
28.Partes del espectrofluorómetro	85

GRÁFICOS

Gráfico 1. Concentración de fluoróforo vs intensidad de emisión.	58
Gráfico 2. Concentración del fluoróforo contra intensidad de excitación.....	59
Gráfico 3. Concentración del fluoróforo vs intensidad de emisión. Tendencia.....	59
Gráfico 4. Pireno. Concentración contra intensidad de excitación. Monómero. Tendencia.	60
Gráfico 5. Concentración fluoróforo contra intensidad de excitación. Excímero. Tendencia	60
Gráfico 6. Concentración de la MEA vs intensidad de emisión.....	62
Gráfico 7. Concentración la MEA vs intensidad de excitación.	62
Gráfico 8. Pireno 40 °C. Concentración contra intensidad de emisión.....	69
Gráfico 9. Pireno 40 °C. Concentración contra intensidad de excitación. Monómero, Tendencia.	69
Gráfico 10. Pireno 40 °C. Concentración contra intensidad de excitación. Excímero. Tendencia.	70
Gráfico 11. MEA 40 °C. Concentración contra intensidad de emisión.....	70
Gráfico 12. MEA 40 °C. Concentración vs intensidad de excitación.	71
Gráfico 13. % Error Aminoácidos 25 °C	76
Gráfico 14. % Error Aminoácidos 40 °C	76
Gráfico 15. Tendencia de las emisiones de GEI (1990-2010).....	82
Gráfico 16. Contribución de emisiones de GEI por categoría (2010).....	82
Gráfico 17. Contribución de emisiones de GEI por gas (2010).....	83
Gráfico 18. Porcentaje de emisiones de CO ₂ en PEMEX.	83

Glosario

°C Grado centígrado (unidad de temperatura)	E Energía
°F Grado Fahrenheit (unidad de temperatura)	ELISA <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensayos de Inmunoabsorción con Enzimas Ligadas)
% v/v Porcentaje volumen / volumen	g gramo (unidad de masa)
> Mayor que	GEI Gas de Efecto Invernadero
≤ Menor o igual que	GICC Gasificación Integrada a un Ciclo Combinado de Potencia
Δ Diferencia	Gln Glutamina
ε Absortividad molar	Glu Ácido glutámico
Σ Sumatoria	Gly Glicina
λ Longitud de onda	GJ Gigajoules (unidad de trabajo y energía)
μM micromolar (unidad de cantidad de sustancia)	h Constante de Planck
v Frecuencia	HCFC Hidroclorofluorocarbonos
Å Angström (unidad de longitud)	His Histidina
A Absorbancia	HOMO <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> (mayor orbital molecular ocupado)
Ala Alanina	HPLC <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia)
AMP 2-amino-2-metil-1-propanol	Hz Hertz (unidad de frecuencia)
Arg Arginina	I_λ Intensidad de la excitación a la longitud de onda dada
Asn Asparagina	Ile Isoleucina
Asp Ácido aspártico	INEGEI Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero
atm atmósfera (unidad de presión)	IPCC Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático
b paso óptico	IR Infrarrojo
bar bar (unidad de presión)	J Joules (unidad de trabajo y energía)
CAP <i>Chilled Amonia Process</i> (Proceso de Amoniaco Enfriado)	K Kelvin (unidad de temperatura)
CO₂ Dióxido de carbono	Kg kilogramo (unidad de masa)
CMNUCC Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático	L- Levógiro
Cys Cisteína	L Litro (unidad de volumen)
C Concentración	Leu Leucina
c Velocidad de la luz	LI Líquidos Iónicos
CEM Centro Espectral de Masas	LUMO <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> (menor orbital molecular desocupado)
cm centímetro (unidad de longitud)	
CV Coeficiente de variación	
D- Dextrógiro	
DEA Dietanolamina	
DGA Diglicolamina	
DIPA Diisopropanolamina	

Lys Lisina	syngas Gas de síntesis
m metro (unidad de longitud)	T₁ Estado de excitación triplete
M Molar (unidad de concentración)	T Transmitancia
MJ MegaJoule (unidad de trabajo y energía)	TEA Trietanolamina
mL mililitro (unidad de volumen)	Thr Treonina
mm milímetro (unidad de longitud)	TLC <i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografía en Capa Fina)
MDEA Metildietanolamina MDL Mecanismo para un Desarrollo Limpio	ton Tonelada (unidad de masa)
MEA Monoetanolamina	Trp Triptófano
Met Metionina	Tyr Tirosina
MOF <i>Metal Organic Frameworks</i> (Estructuras Metal-Orgánicas)	u.a. Unidades de absorbancia
mol mol (unidad de cantidad de sustancia)	USUCUSS Uso del Suelo, Cambio del Uso del Suelo y Silvicultura
min minuto (unidad de tiempo)	UV Ultravioleta
MW MegaWatt (unidad de potencia)	UV/V Ultravioleta - visible
n índice de refracción	Val Valina
nm nanómetro (unidad de longitud)	vs versus (contra)
P Potencia radiante	ν̃ Número de onda
P₀ Potencia radiante incidente	W Watt (unidad de potencia)
PE 2-piperidinaetanol	̄x Media aritmética
PEMEX Petróleos Mexicanos	
PEP PEMEX Exploración y Producción	
PFC Perfluorocarbonos	
pH Potencial de hidrógeno	
Phe Fenilalanina	
pI Punto Isoeléctrico	
PICC Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático	
pK_a Constante de disociación ácida	
POPOP 1,4-bis benceno	
ppmv Partes por millón en volumen	
Pro Prolina	
PZ Piperazina	
r² coeficiente de determinación	
RA Reactivo analítico	
Ser Serina	
S Desviación estándar	
s segundo (unidad de tiempo)	
S₀ Estado fundamental	
S₁ Estado de excitación singulete	
S₂ Estado excitación singulete más alto	

Resumen

En 1990, el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC) presentó su primer informe: las actividades humanas resultaron responsables del aumento de las concentraciones atmosféricas de gases de efecto invernadero que han provocado el cambio climático mundial.

El principal gas de efecto invernadero es el dióxido de carbono proveniente de la quema de combustibles fósiles. Para reducir las emisiones de CO₂ a la atmósfera, existen tecnologías que permiten capturarlo, entre las que destaca la absorción química basada en aminas por su grado de desarrollo, pero que presenta altos costos de mantenimiento y regeneración.

Como una alternativa de bajo impacto ambiental se ha propuesto el uso de aminoácidos; en esta tesis se desarrolla un método experimental que utiliza espectrofluorimetría para evaluar la interacción entre los diferentes aminoácidos y dióxido de carbono, encontrando así una técnica para seleccionar los aminoácidos que pueden ser los mejores captosres de CO₂. El método se validó con una amina de referencia y se evaluaron 11 aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, asparagina, glicina, glutamina, histidina, lisina, triptófano y valina, de los cuales se encontraron tres que presentaron interacción específica con CO₂.

La selección de aminoácidos constituye el primer paso hacia el desarrollo y escalamiento de un proceso industrial de captura de CO₂ que no origine gastos de mantenimiento y sea una opción atractiva y sustentable para el sector energía en nuestro país.

Introducción

El cambio climático es un problema complejo, debido a que implica actividades humanas que repercuten en las condiciones climatológicas de todo el planeta a largo plazo. Uno de los fenómenos que lo propician es el aumento en las concentraciones de gases de efecto invernadero (GEI), siendo el principal GEI antropogénico el dióxido de carbono (CO₂): 77 % de la contribución humana al efecto invernadero en la década reciente se debe a las emisiones provenientes de la quema de combustibles fósiles.

Para reducir las emisiones de CO₂ a la atmósfera, se han propuesto tecnologías que permiten capturarlo, tales como absorción, adsorción, paso a través de membranas e incluso destilación criogénica. Si bien son propuestas audaces, la única que ha pasado de planta piloto es la absorción.

La absorción química basada en aminas es la tecnología más realista: existen varios procesos implementados a escala industrial, ya que es utilizada en el endulzamiento de gas natural. En estos procesos, se hace pasar el gas natural por un absorbedor para que las aminas reaccionen con los gases ácidos de éste. Las aminas son compuestos orgánicos que reaccionan formando compuestos solubles en agua. Se utilizan en disolución acuosa, atrapando al CO₂ por una reacción ácido-base reversible. Reaccionan rápidamente, son altamente selectivas con los gases ácidos y relativamente baratas.

Sin embargo, las aminas presentan degradación en presencia de oxígeno y óxidos de azufre, además de corrosión al equipo y altas necesidades energéticas durante su regeneración (hasta un 70 % del costo del proceso), lo que se traduce como altos costos de mantenimiento y operación.

En México, no existe regulación para las emisiones de dióxido de carbono, por lo que el método de captura debe ser atractivo para las empresas, generando los menores costos. Ante esta situación, se ha propuesto la utilización de otros materiales para absorber CO₂. De entre las mejores opciones y la más viable hasta el momento es la captura de dióxido de carbono por medio de aminoácidos. Estos compuestos poseen un grupo amino en su estructura molecular, son económicos, fáciles de manipular y provocan un bajo impacto ambiental dada su presencia en la naturaleza. Los procesos industriales para sintetizarlos se basan en la acción de microorganismos o en reacciones de hidrólisis de proteínas, lo que nos brinda una gran oportunidad, pues la materia prima para obtenerlos puede ser biomasa proveniente de la industria alimentaria. De este modo, le damos una alternativa a los desechos de la industria alimentaria y solución al incremento de dióxido de carbono.

Existen 20 aminoácidos estándar y en esta tesis se propone el uso de espectrofluorimetría de estado basal para identificar de entre éstos a los mejores candidatos para captura de CO₂. La espectrofluorimetría de estado basal es una técnica de gran sensibilidad que permite identificar si existe o no interacción específica entre dos moléculas. En nuestro caso, dichas moléculas serían la de CO₂ y el aminoácido en cuestión, siendo aquellos que muestren una interacción específica los seleccionados como mejores prospectos para la captura de dióxido de carbono.

Planteamiento del problema

El clima es consecuencia de multitud de factores que interactúan entre sí, algunos externos como la radiación solar y otros más internos. Las actividades humanas tienen un impacto en éstos factores, siendo el mayor el aumento de emisiones de gases de efecto invernadero.

El incremento en los niveles de dióxido de carbono alcanzó 38.75 % en el año 2011, cifra preocupante tomando en cuenta que los niveles de este gas habían permanecido prácticamente invariables hasta que el ser humano tuvo su revolución industrial. En México, el sector energía es responsable de más de la mitad¹ de las emisiones de este gas de efecto invernadero.

En respuesta a esta situación, se reunieron en 1992 en Río de Janeiro 150 países en la llamada “Cumbre de la Tierra de Río”. Sus esfuerzos se vieron vertidos en la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC), la cual fue firmada por México el 13 de junio de 1992 y ratificada en 1993.

El objetivo de la CMNUCC es el de lograr *“la estabilización de las concentraciones de GEI en la atmósfera a un nivel que impida interferencias antropogénicas peligrosas en el sistema climático. Ese nivel debería lograrse en un plazo suficiente para permitir que los ecosistemas se adapten naturalmente al cambio climático, asegurar que la producción de alimentos no se vea amenazada y permitir que el desarrollo económico prosiga de manera sostenible.”* (CMNUCC: 1992).

Durante la tercera conferencia de la CMNUCC celebrada en Kioto, Japón, en 1997 se firmó el Protocolo de Kioto, que establece *“mecanismos de mercado para facilitar el cumplimiento de los compromisos de mitigación de los países desarrollados y promover el desarrollo sustentable en los países en desarrollo: Comercio de Derechos de Emisiones; Implementación Conjunta y Mecanismo para un Desarrollo Limpio.”*² (SEMARNAT: 2013). México firmó dicho Protocolo y lo ratificó en el año 2000. El Protocolo de Kioto entró en vigor en 2005.

Los países desarrollados firmantes de la CMNUCC se comprometieron a reducir sus emisiones de GEI a los niveles que tenían en 1990 para el año 2000. México, como país en desarrollo, no tiene un compromiso cuantitativo de reducción de emisiones, pero comparte los compromisos aplicables a todas las partes de la convención. Entre ellas están la realización de actividades de planeación, implementación de acciones, educación, difusión del conocimiento, elaboración de documentos de planeación a nivel

¹ Ver **Anexo I**.

² El Mecanismo para un Desarrollo Limpio (MDL) es el único instrumento que permite la realización de proyectos de reducción de emisiones entre países desarrollados y países en desarrollo. México tiene el quinto lugar a nivel mundial en desarrollo de proyectos MDL, mismos que se han desarrollado en las áreas de recuperación de metano, energías renovables, eficiencia energética, procesos industriales y manejo de desechos, entre otros.

nacional y estatal, y la elaboración de las comunicaciones nacionales de México con sus respectivos inventarios de emisiones.³

En cumplimiento con los compromisos adquiridos, México elabora el Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero (INEGEI). Es un esfuerzo que incluye a especialistas de diferentes dependencias, estimando las emisiones de GEI por actividades antropógenas. El último INEGEI se realizó en 2012, comprendiendo el periodo 1990-2010. Este Inventario es elaborado con metodologías comparables, desarrolladas por el Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (PICC) y aprobadas por la CMNUCC.

Para evitar la emisión de dióxido de carbono a la atmósfera, se implementan diversas tecnologías que captan el CO₂ producido por la quema de combustibles fósiles: por adsorción, absorción, membranas y destilación criogénica, de entre las que la absorción es la única que se ha implementado en la industria. La absorción química es útil en el proceso de endulzamiento de gas natural, en donde se usan aminos para captar los gases ácidos teniendo altos costos de mantenimiento y energía utilizada para la regeneración de las mismas.

Los aminoácidos son una opción interesante para la captura de CO₂, debido a sus propiedades de resistencia a la degradación y estabilidad química. Su presencia en la naturaleza los hace amigables con el medio ambiente, así como su baja toxicidad y baja presión de vapor los hace idóneos para su manipulación. Todo esto, unido al hecho de que se obtienen de biomasa, las convierte en una gran alternativa al uso de aminos. La absorción con aminoácidos es una tecnología escalable en un proceso del que se obtiene CO₂ de alta pureza.

³ Agenda Internacional. CMNUCC. [Sitio de Internet]. México: SEMARNAT, 2013. [Consulta 19 de octubre del 2015].

Hipótesis

Al desarrollar un método que use espectroscopia de fluorescencia para determinar la interacción específica entre moléculas de dióxido de carbono y una amina de referencia, apoyará a entender las interacciones específicas entre aminoácidos y dióxido de carbono.

Objetivo

Seleccionar aminoácidos que pueden ser los mejores captosres de CO₂ mediante la espectroscopia de fluorescencia.

Objetivos particulares

- Desarrollar un método experimental el cual nos indique si las interacciones entre los aminoácidos y el CO₂ son específicas usando espectroscopia de fluorescencia, validándolo con monoetanolamina como amina de referencia.
- Evaluar once aminoácidos polares y no polares con carga con el método desarrollado.

CAPÍTULO 1. Marco teórico

1.1 CO₂ y el efecto invernadero

El dióxido de carbono (CO₂) es un gas resultante tanto de procesos geoquímicos como biológicos, cuya presencia en la atmósfera es fundamental en la regulación de la temperatura debido a sus propiedades como gas de efecto invernadero.

Nuestro planeta posee una atmósfera compuesta en un 99 % de nitrógeno (N₂) y oxígeno (O₂). El 1 % restante lo conforman otros gases, entre los que se encuentran los de efecto invernadero: los más importantes son el vapor de agua y el CO₂.

La temperatura de la Tierra depende de los gases de efecto invernadero (GEI). Por estar a cierta distancia del Sol y reflejar una parte de la radiación que llega a ella, la Tierra tiene una temperatura efectiva⁴ de -18 °C. Sin embargo, el valor típico⁵ de temperatura en la superficie terrestre es de 15 °C. Esta diferencia de 33 °C se debe a los GEI, los cuales constituyen un filtro natural para la radiación electromagnética proveniente del sol.

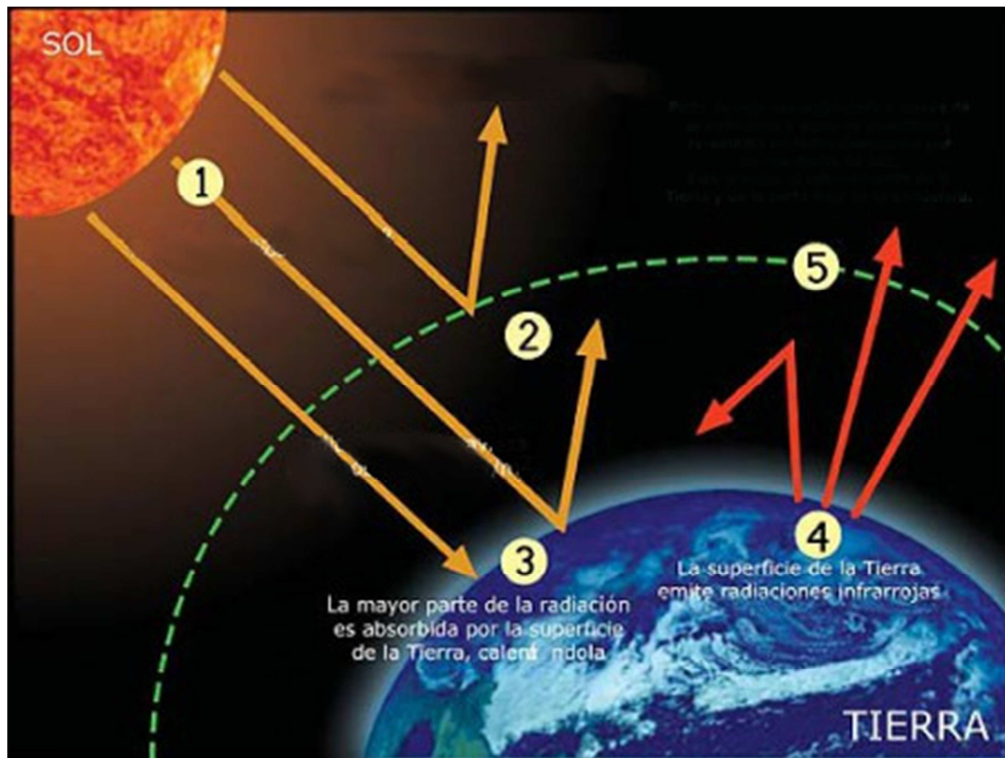


Figura 1. Efecto invernadero⁶.

1) Radiación de onda emitida por el sol. 2) Radiación reflejada. 3) La radiación es absorbida por la superficie de la Tierra. 4) La superficie de la Tierra emite parte de la radiación. 5) La radiación emitida es absorbida por los gases de efecto invernadero, provocando el calentamiento de la Tierra desde la superficie terrestre.

⁴ La temperatura efectiva es el resultado de la diferencia entre la radiación solar absorbida por la Tierra y la emitida.

⁵ Promedio anual y global.

⁶ Carrión M. Efecto Invernadero Natural. [Blog en internet]. El blog de Mónica en Agustinas. [Consulta 19 de octubre del 2015]. Modificada por la autora.

Como se puede notar, el efecto invernadero es inherente a la composición de la atmósfera y ha estado presente desde la existencia de la misma, por lo que es fundamental para la vida en la Tierra. Su concentración atmosférica se mantiene constante gracias a dos mecanismos, uno de naturaleza geoquímica y otro de naturaleza biológica.

El mecanismo geoquímico requiere de una gran escala de tiempo para llevarse a cabo. El CO₂ atmosférico es disuelto en el agua de lluvia y transformado en ácido carbónico que reacciona con los minerales expuestos de la superficie terrestre, siendo acarreados los productos por los ríos hasta el océano, donde se forma carbonato de calcio. Éste se deposita en el lecho marino, entra a la astenósfera mediante subducción⁷ y se reemite como CO₂ a la atmósfera con la actividad volcánica.

Durante el mecanismo biológico, las plantas obtienen CO₂ de la atmósfera y lo convierten en carbohidratos durante la fotosíntesis, regresando una parte como CO₂ a la atmósfera. Mediante las cadenas tróficas, esas plantas son ingeridas por organismos que a su vez son ingeridos por otros organismos. Todos ellos ingieren los carbohidratos producidos y expelen CO₂ mediante la respiración. Algunos organismos descomponen materia orgánica y fijan el carbono al suelo. El carbono también se encuentra en yacimientos, en forma de combustibles fósiles.

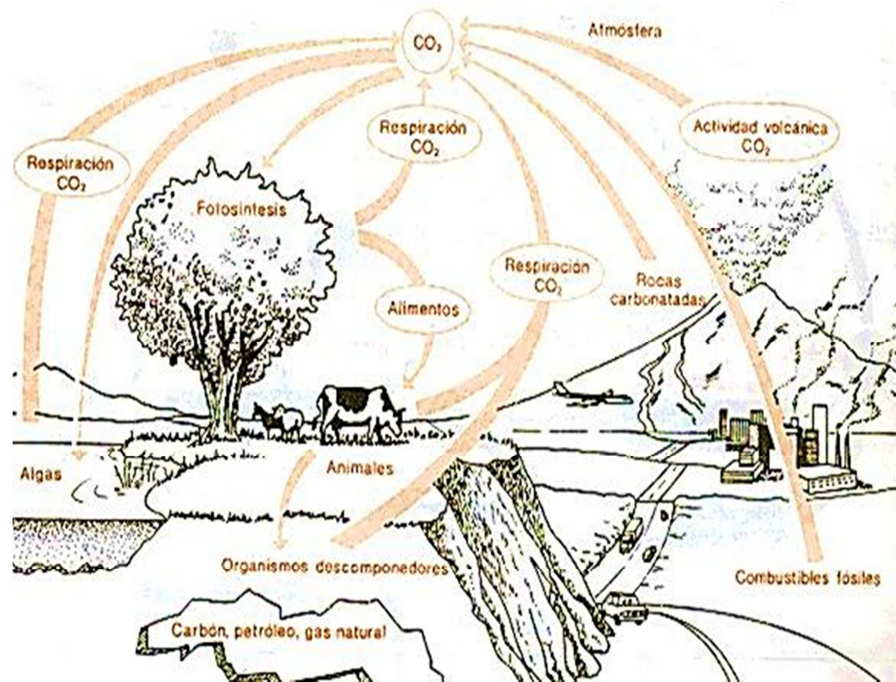


Figura 2. Ciclo del Carbono.⁸

Las actividades humanas han aumentado la concentración de CO₂ atmosférico de forma alarmante. Durante la época anterior a la industrialización, tuvo una concentración casi

⁷ Subducción se refiere al proceso mediante el que una placa de litósfera se desliza bajo otra, entrando en la astenósfera.

⁸ Profesor en Línea. Ciclo del Carbono. [Página web en Internet]. Santiago, Chile: Querelle y Cia Ltda. Disponible en: www.profesorenlinea.cl.

constante de 280 ppmv⁹. Esta concentración ha ido en aumento desde el siglo XIX, llegando a 388.5 ppmv en 2011. El CO₂ antropógeno procede de la quema de combustibles fósiles (petróleo, gas natural y carbón mineral), a lo cual podemos añadir la deforestación (por urbanización agricultura, etc.) como factor de gran importancia para el aumento de CO₂. Al aumentar la concentración de CO₂ atmosférico, hay un aumento del efecto invernadero.

1.2 Captura de CO₂

Para reducir las emisiones antropógenas de CO₂ a la atmósfera, se han propuesto tecnologías que permiten capturar el CO₂ proveniente de la quema de combustibles fósiles en las industrias. Dicha captura puede ser abordada desde 3 perspectivas: post-combustión, pre-combustión y oxi-combustión.

Estas perspectivas de captura de CO₂ presentan ventajas y desventajas. Es necesario aplicar tecnologías de captura de CO₂ adecuadas y eficientes, con bajo costo y consumo energético, basados en consideraciones económicas y ambientales.

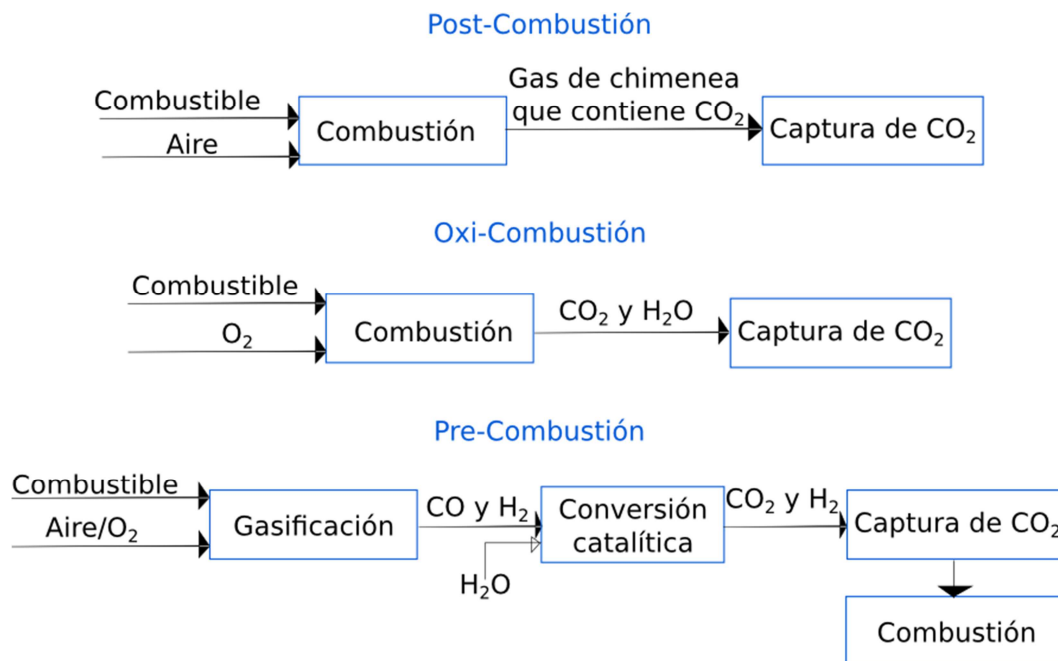


Figura 3. Diagramas de bloques que ilustran los sistemas de post-combustión, pre-combustión y oxi-combustión.

En la *captura post-combustión*, la captura se realiza después de la combustión y el CO₂ debe separarse de todos los productos de ésta, lo que genera un reto para la captura efectiva y rentable. Esta perspectiva a la captura de CO₂ presenta el mayor potencial para reducir las emisiones a corto plazo, puede implementarse a las plantas actualmente

⁹ Partes por millón en volumen

en operación. Es la más factible actualmente ya que, a diferencia de las otras, no necesita que el proceso esté pensado desde un principio para su implementación.

La *captura pre-combustión*, como su nombre lo indica, busca separar CO₂ antes de que se realice la combustión. Está pensada para implementarse en plantas que realizan procesos de gasificación, ya que ésta implica la reacción del combustible con aire (o en algunos casos oxígeno) para producir gas de síntesis (syngas); que está compuesto en su mayoría de monóxido de carbono (CO) e hidrógeno (H₂). El CO reacciona con vapor de agua en un reactor catalítico para producir CO₂ y más H₂. El CO₂ es separado para producir una corriente rica en H₂, que es utilizado como combustible. Esta forma de captura es ideal para sistemas de Gasificación Integrada a un Ciclo Combinado de Potencia (GICC), las cuales aprovechan la integración energética.

En la *captura oxi-combustión*, se utiliza oxígeno en vez de aire, por lo que se obtiene H₂O y CO₂ (más de 80 % v/v de CO₂), siendo relativamente sencillo separar el agua por condensación. El oxígeno se obtiene usualmente de la destilación criogénica del aire (con una pureza mayor al 95 %). Para ser enviado al quemador, el O₂ debe combinarse con la corriente de gas de salida de éste, ya que los materiales de construcción actualmente disponibles no podrían resistir las temperaturas que se alcanzarían.

1.2.1 Tecnologías para la captura de CO₂

Las tecnologías de captura de CO₂ son cuatro: absorción, adsorción, membranas y destilación criogénica.

Para la captura pre-combustión se recomienda la absorción física o tecnologías combinadas de membranas poliméricas o soportadas con líquidos iónicos, debido a la alta presión parcial del CO₂. Un adsorbente muy prometedor basado en silicato de litio (Li₄SiO₄) ha demostrado captar 90 % del CO₂ contenido en el syngas, siendo efectivo a altas temperaturas (250 - 550 °C) y presiones (hasta 20 atm).

Para la oxi-combustión, el reto es más bien separar el oxígeno a un menor costo energético y monetario, por lo que el enfoque es utilizar tecnología basada en membranas.

En nuestro caso, nos interesa la absorción química basada en aminas, para después revisar los aminoácidos, por lo que la dejaremos al final para ahondar en ella.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los diferentes acercamientos a la captura de CO₂¹⁰.

Captura	Ventajas	Desventajas
Post-combustión	<ul style="list-style-type: none"> -Aplicables a la mayoría de las plantas existentes. -Tecnología con opciones de modernización. 	<p>La corriente de gas resultante de la combustión contiene CO₂ diluido¹¹ a presión atmosférica, resultando en baja presión parcial de CO₂:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se requieren rendimientos y/o volúmenes significativamente altos para obtener altos niveles de captura. - CO₂ obtenido a baja presión en comparación con los requerimientos para secuestro.
Pre-combustión	<p>El syngas contiene CO₂ concentrado a alta presión, resultando en alta presión parcial de CO₂:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Separación relativamente más sencilla. - Más tecnologías disponibles para separación. - Reducción potencial de costos de producción. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicación principalmente en nuevas plantas, existen pocas plantas gasificadoras en operación. - Obstáculos comunes para la aplicación comercial de la gasificación: Costo del equipo, disponibilidad y grandes requerimientos de sistemas de soporte.
Oxi-combustión	<ul style="list-style-type: none"> - Muy alta concentración de CO₂ en el gas resultante de la combustión. - Opción tecnológica actualizable incluso para incrementar la capacidad. 	<ul style="list-style-type: none"> - La producción criogénica de grandes cantidades de O₂ podría resultar en exceso costosa. - La recirculación de CO₂ enfriado requiere mantener temperaturas límite de los materiales combustibles. - Se añade carga energética y de costo debido a los procesos auxiliares requeridos.

1.2.1.1 Adsorción

Adsorción se refiere a la captura de las moléculas de CO₂ en la superficie de otro material, por ejemplo, la adhesión de CO₂ en la superficie de las zeolitas. Una clara ventaja de la adsorción es que la energía necesaria para la regeneración del adsorbente es menor a la requerida para los absorbentes. Sus principales desventajas incluyen el desgaste de partículas, el manejo de grandes cantidades de adsorbente y las necesidades térmicas para adsorbentes de gran tamaño.

¹⁰ Tabla 1. Figueroa J. D., Fout T., Plasynski S., Mcllvried H., Srivastava R.D. Advances in CO₂ capture technology—The U.S. Department of Energy’s Carbon Sequestration Program. International Journal of Greenhouse Gas Control. 2008 (2): 9-20. Pag. 12. Traducción de la autora.

¹¹ La concentración típica de CO₂ es de menos de 15 %, con una presión parcial menor a 0.15 atm.

Existen dos tipos de adsorción: física y química. La adsorción física ocurre por fuerzas débiles de Van der Waals, mientras que la adsorción química se da por fuertes uniones covalentes.

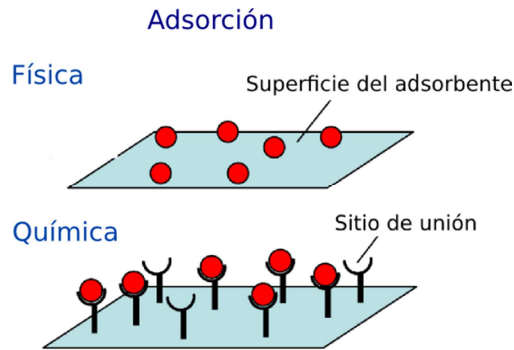


Figura 4. Adsorción química y física.¹²

Se aprecia que la adsorción, ya sea física o química, es un proceso que se lleva a cabo en la superficie del adsorbente. También se les llama Fisisorción y Quimisorción, respectivamente.

Como adsorbentes físicos se suelen usar materiales carbonaceos, zeolitas y sílicas mesoporosas ordenadas. Entre los adsorbentes físicos más modernos se encuentran las *estructuras metal-orgánicas* (MOF¹³), un tipo de materiales híbridos novedosos contruidos de iones metálicos con una coordinación geométrica bien definida y ligantes orgánicos cruzados, cuya alta porosidad permite gran capacidad de almacenamiento de CO₂.

Los adsorbentes químicos suelen ser materiales basados en óxidos metálicos (Ca, MgO), sales metálicas de compuestos metálicos alcalinos (silicatos de litio, zirconatos de litio, compuestos de metales alcalino térreos), hidrotalcitas y sales dobles. Se han impregnado o insertado aminas en óxidos metálicos alcalinos y alcalino térreos, mejorando la capacidad de adsorción y aumentando el índice de transferencia de CO₂. Se utiliza también carbonato de sodio (Na₂CO₃) soportado en adsorbentes para capturar CO₂, al reaccionar en presencia de agua, formando bicarbonato de sodio (NaHCO₃).

La adsorción no es un método adecuado para separar grandes cantidades, no existe un sistema de adsorción de gran escala para recuperar CO₂. Su aplicación es separar componentes minoritarios para purificar la corriente principal, por lo que es útil para obtener las especificaciones deseadas en el CO₂ ya separado.

¹² Global CCS Institute. CO₂ Capture Technologies. Post Combustión Capture. Canberra, 2012. Pag. 10. Trad. a.

¹³ Del inglés Metal Organic Frameworks.

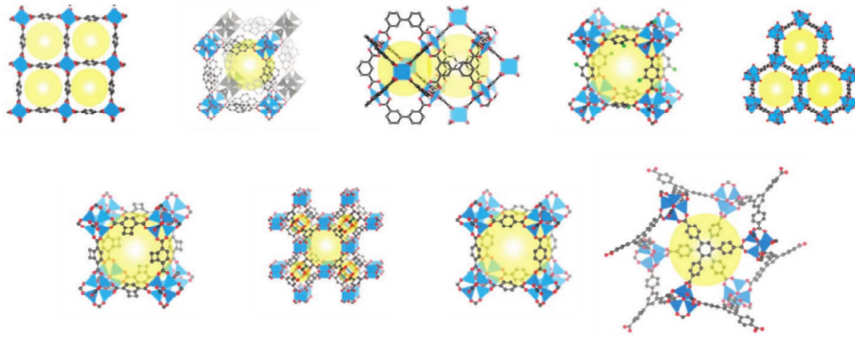
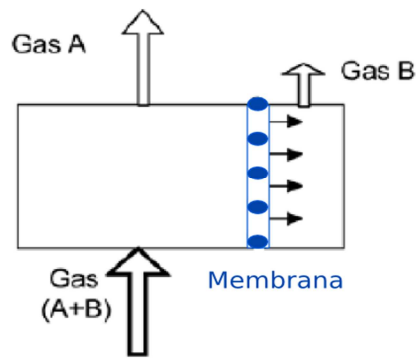


Figura 5. Estructuras cristalinas de varios MOFs.¹⁴

De izquierda a derecha, de arriba a abajo: MOF-2: $Zn_2(BDC)_2$, IRMOF-11: $Zn_4O(HPDC)_3$, MOF-505: $Cu_2(BPTC)$, IRMOF-3: $Zn_4O(NH_2BDC)_3$, MOF-74: $Zn_2(DHBDC)$, IRMOF-6: $Zn_4O(C_2H_4BDC)_3$, $Cu_2(BTC)_2$, IRMOF-1: $Zn_4O(BDC)_3$ y MOF-177: $Zn_4O(BTB)_3$.

1.2.1.2 Membranas

Las membranas son materiales diseñados para permitir la permeabilidad selectiva de un gas a través de ellas. Dicha selectividad está relacionada a la naturaleza del material, pero se ve condicionada por la diferencia de presiones a través de la membrana. Es por ello que éste método se utiliza en corrientes de alta presión.



6. Membranas.¹⁵

Existen muchos tipos de materiales utilizados para hacer membranas: poliméricos, metálicos, cerámicos. En algunos casos, algunos agentes que reaccionan con el CO₂ se añaden a las membranas para aumentar su selectividad por éste gas.

La utilización de membranas se ve afectada por el alto costo de compresión necesaria, ya que las membranas operan a altas presiones. Salvo por dichas condiciones de presión, las membranas requieren menos energía, no requieren un cambio de fase en el proceso y requieren de un bajo costo de mantenimiento.

¹⁴ Millward A. R, Yaghi O. M. Metal-Organic Frameworks with Exceptionally High Capacity for Storage of Carbon Dioxide at Room Temperature. JACS Communications. 2005. Pag. 1. Modificada por la autora.

¹⁵ Working Group III of the Intergovernmental Panel on Climate Change. [Metz B. Davidson O, De Coninck H, Loos M, Meyer L (eds.)]. IPCC Special Report on Carbon Dioxide Capture and Storage. 1ª Ed. Cambridge and New York: Cambridge University Press, 2005. Pag. 110. Trad. a.

1.2.1.3 Destilación criogénica

Un gas puede volverse líquido si es sujeto a una serie de etapas de compresión y enfriado. La destilación criogénica utiliza bajas temperaturas para condensar, separar y purificar CO₂ de los otros gases (el punto de congelación del CO₂ puro es de 195.5 K a presión atmosférica). Se obtiene así CO₂ líquido que puede ser almacenado y secuestrado directamente.

Esta es una tecnología que no utiliza solventes ni otros componentes, que puede ser escalada a nivel industrial. Su mayor desventaja es la cantidad de energía que se requiere para mantener el CO₂ congelado.

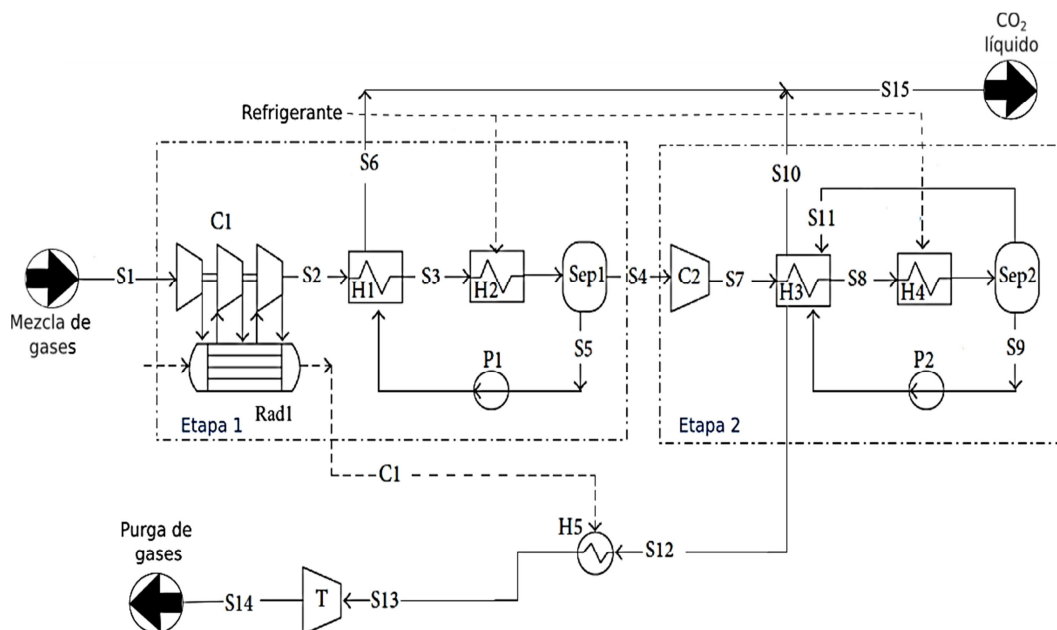


Figura 7. Licuefacción criogénica.¹⁶

En éste método novedoso propuesto por Xu et al., hay dos etapas de compresión, dos etapas de refrigeración y dos etapas de separación, adoptando la recuperación energética en el proceso, reduciendo el consumo energético a 0.395 MJ/kg de CO₂.

1.2.2 Absorción

La absorción es una operación en la que se transfiere materia de una fase a otra, en nuestro caso, de una corriente gaseosa a una líquida. El componente deseado de una mezcla de gases se disuelve al ser puesto en contacto con un absorbente líquido (o solvente), aumentando su volumen. La concentración del gas disuelto aumenta de manera proporcional a la presión parcial de los gases. Es por eso que el CO₂ se absorbe a

¹⁶ Tomada de Xu G, Li L, Yang Y, Tian L, Liu T, Zhang K. A Novel CO₂ Cryogenic Liquefaction and Separation System. Energy. 2012; 42. 522–529. Trad. a.

alta presión y baja temperatura, regenerando el solvente a baja presión y alta temperatura.

En un proceso de absorción, la mezcla de gases que contiene CO₂ entra a un absorbedor (que es donde se encuentra el solvente). Es ahí donde tiene lugar la absorción, pasando el CO₂ de la fase gaseosa a la fase líquida. La solución rica en CO₂ es bombeada al regenerador, donde el CO₂ absorbido es recuperado. El solvente regenerado regresa al absorbedor para continuar con el ciclo.

El solvente que debe tener alta tasa de absorción, despreciable presión de vapor, alta estabilidad térmica, química; y, preferentemente, ser inocuo para las personas que trabajan con él. La interacción entre el solvente y la sustancia absorbida puede ser física o química.

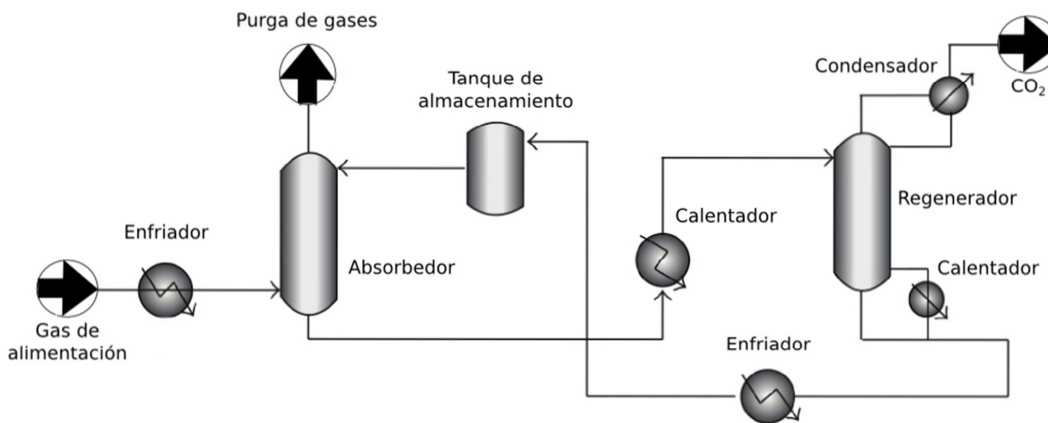


Figura 8. Diagrama de una planta de absorción de CO₂.¹⁷

En la absorción puramente física, las moléculas de gas se encuentran polarizadas, pero sin cambio en su estructura química, por lo que requieren menos energía para su regeneración. Este tipo de absorbentes se caracterizan por tener baja presión de vapor, corrosividad y toxicidad, sin embargo, dependen totalmente de la temperatura y la presión, por lo que no son recomendados para procesos de post-combustión. Encuentran su mayor aplicación en el endulzamiento de gas natural¹⁸, donde atrapan H₂S y CO₂ a altas concentraciones. Entre los absorbentes físicos se encuentran varios glicoles, metanol y compuestos fluorados. Se han propuesto *líquidos iónicos* (LI) como absorbentes físicos por su alta cinética de absorción, alta polaridad y su baja degradación, así como por la posibilidad de absorber la mezcla de gases a altas temperaturas, eliminando la necesidad de enfriar el gas de alimentación.

¹⁷ Songolzadeh M., Soleimani M., Ravanchi M.T., Songolzadeh R. Carbon Dioxide Separation from Flue Gases: A Technological Review Emphasizing Reduction in Greenhouse Gas Emissions. Hindawi Publishing Corporation. The Scientific World Journal. 2014 (2014): 34. Pag. 4. Modificada por la autora.

¹⁸ Proceso mediante el cual se eliminan los gases ácidos del gas natural.

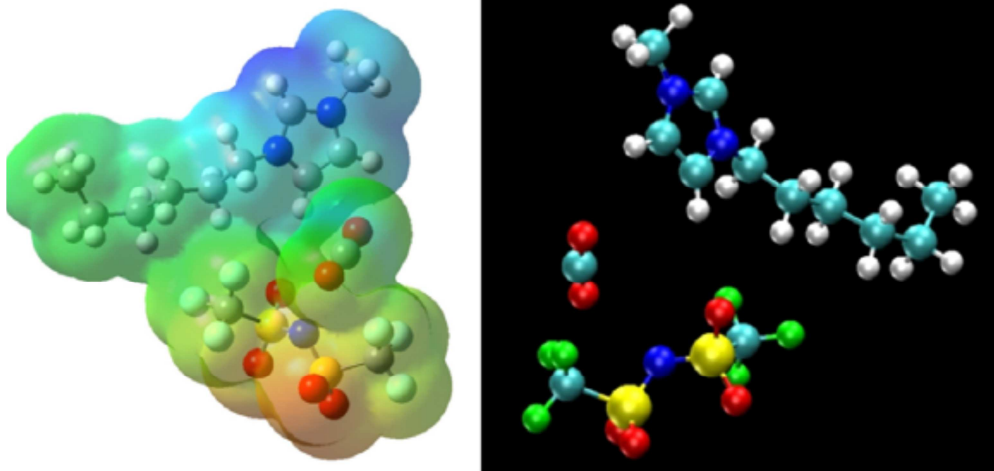


Figura 9. Interacción de un LI con CO₂.¹⁹

Los líquidos iónicos son sales que tienen típicamente un catión orgánico. La región azul muestra las áreas de carga positiva y las rojas las de carga negativa.

En la absorción química, como es de esperarse, tiene lugar una reacción química. Ésta es una tecnología utilizada extensamente en otras industrias, por lo que es la más madura de todas las utilizadas para la captura de CO₂. Su principal ventaja es la alta selectividad a pesar de las bajas presiones parciales de CO₂, lo que la hace la mejor opción a implementar para la captura post-combustión. Este tipo de absorción usualmente depende de una reacción de neutralización ácido-base y la reversibilidad de la misma.

Los absorbentes químicos más usados son aquellos basados en aminas. Se utilizan por su capacidad de absorción a bajas presiones parciales de CO₂ en la corriente de gas.

1.2.2.1 Tecnologías de absorción basadas en aminas

Las aminas son compuestos orgánicos que contienen nitrógeno y reaccionan con CO₂ formando compuestos solubles en agua. Se utilizan en disolución acuosa, atrapando al CO₂ por una reacción ácido-base reversible.

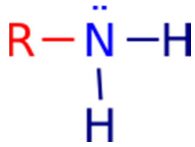
Las aminas pueden ser primarias, secundarias y terciarias²⁰, según el número de radicales a los que esté unido su grupo amino (Tabla 2).

¹⁹ Figueroa J. D., Fout T., Plasynski S., McIlvried H., Srivastava R.D. Advances in CO₂ capture technology—The U.S. Department of Energy's Carbon Sequestration Program. International Journal of Greenhouse Gas Control. 2008 (2): 9-20. Pag. 15.

²⁰ Existen también las aminas cuaternarias, en las cuales el nitrógeno queda con carga positiva, pero por no ser aplicables a los procesos de absorción de CO₂ quedan fuera del alcance de ésta tesis.

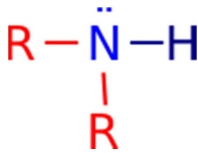
Tabla 2. Aminas primarias, secundarias y terciarias²¹.

Aminas primarias



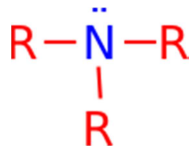
- Las más utilizadas son monoetanolamina (MEA) y diglicolamina (DGA).
- La más destacada es la MEA por ser la más barata de las aminas comerciales, su alta reactividad, menor peso molecular, estabilidad térmica y grado de degradación razonables.

Aminas secundarias



- Las más utilizadas son dietanolamina (DEA) y diisopropanolamina (DIPA).
- La favorita es la DEA por presentar menor degradación, corrosividad, presión de vapor y una entalpía de regeneración menor a la de la MEA²². Sin embargo, su cinética de reacción es menor y esto dificulta el proceso de transferencia de masa.

Aminas terciarias



- Las más utilizadas son metildietanolamina (MDEA) y trietanolamina (TEA).
- No son muy utilizadas debido a su baja reactividad, sin embargo, poseen mayor capacidad de absorción que las primarias o secundarias necesitando una menor energía para su regeneración, por lo que se utilizan en mezclas con ellas.

²¹ Elaboración propia.

²² La entalpía de regeneración MEA: 1950 kJ/kg CO₂, DEA: 1520 kJ/kg CO₂.

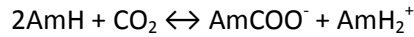
Tabla 3. Comparación entre las tecnologías usadas para captura de CO₂.²³

Tecnología	Ventajas	Desventajas	Escala
Absorción	<ul style="list-style-type: none"> - Reacción rápida. - Altas capacidades de absorción. - Muy flexible. 	<ul style="list-style-type: none"> -Corrosión del equipo. -Gran cantidad de energía para la regeneración. 	Industrial
Adsorción	<ul style="list-style-type: none"> -Bajo consumo energético y costo. -Adecuado para separar CO₂ de una corriente diluida. 	Bajas capacidades de adsorción (a condiciones de los gases de salida del quemador).	Planta piloto
Destilación criogénica	<ul style="list-style-type: none"> -Producción de CO₂ líquido. -No se requieren solvente u otros componentes. -Fácilmente escalable para aplicación industrial. 	Requiere de grandes cantidades de energía.	Planta piloto
Separación por membranas	<ul style="list-style-type: none"> -Proceso simple y limpio. -Tecnología continua de estado estacionario. 	Requiere mucha energía para la captura post-combustión.	Experimental

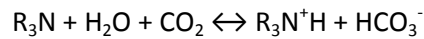
²³ Songolzadeh M., Soleimani M., Ravanchi M.T., Songolzadeh R. Carbon Dioxide Separation from Flue Gases: A Technological Review Emphasizing Reduction in Greenhouse Gas Emissions. Hindawi Publishing Corporation. The Scientific World Journal. 2014 (2014): 34. Pag. 25. Trad. a.

Las primarias y secundarias reaccionan con el CO₂ formando carbamatos (RR`NCOO`R⁺). Las aminas terciarias no reaccionan directamente con CO₂, sino que forman el ion bicarbonato a partir de la hidrólisis del CO₂.

Ecuación 1. Reacción de aminas primarias y secundarias²⁴.



Ecuación 2. Reacción de aminas terciarias.²⁵



La absorción con aminas ha sido utilizada por muchos años, particularmente en el endulzamiento de gas natural, por lo que existe alto grado de confianza en su uso en plantas industriales. Reaccionan rápidamente, su reacción es reversible, son altamente selectivas con los gases ácidos y relativamente baratas. Sin embargo, tienen baja capacidad de absorción y se degradan en presencia de SO₂ y O₂.

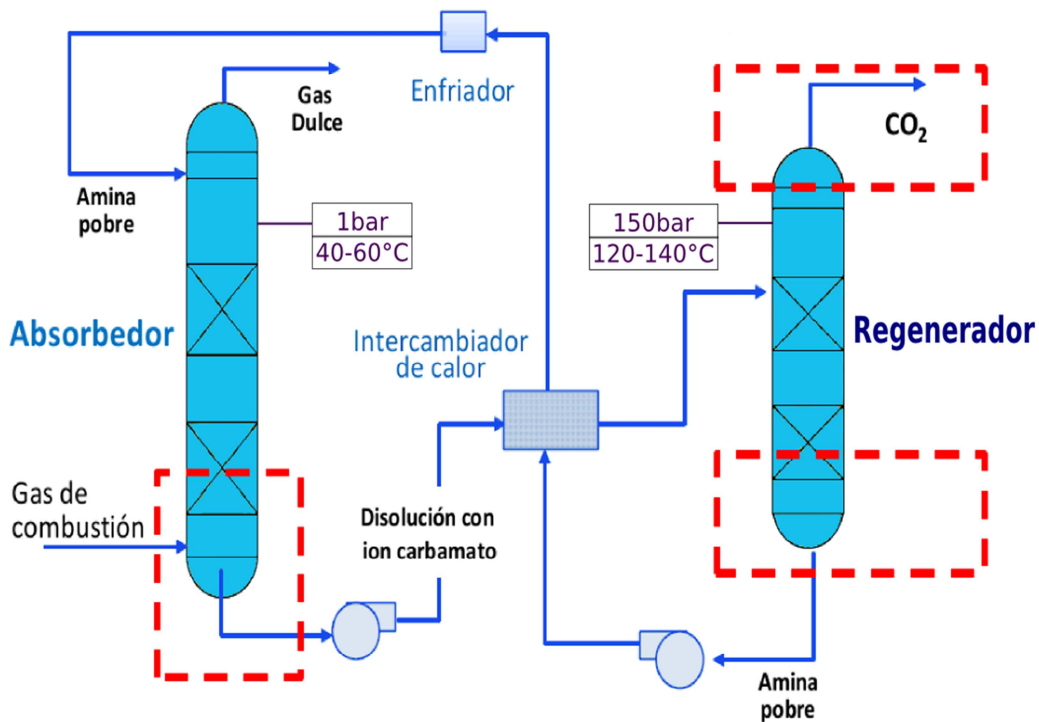


Figura 10. Proceso de absorción con aminas²⁶.

Se incluyen las zonas vulnerables del proceso donde se da la corrosión (líneas punteadas rojas), así como las condiciones de operación en el absorbedor y el regenerador.

²⁴ Vaidya P.D, Kenig E.Y. CO₂-Alkanolamine Reaction Kinetics: A Review of Recent Studies. Chemical Engineering & Technology. 2007; 30 (11): 1467-1474. Pag. 1468.

²⁵ Ídem.

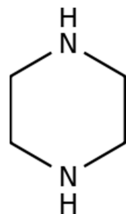
²⁶ Romeo L.M, Bolea I. Captura de CO₂ en procesos postcombustión. Boletín Grupo Español Carbón. Marzo 2015; 35. Pag. 9. Modificada por la autora. Condiciones de operación tomadas de Yu Ch. H, Huang Ch. H, Tan Ch. S. A Review of CO₂ Capture by Absorption and Adsorption. Aerosol and Air Quality Research. 2012; 12. 745-769.

Los dos principales problemas operacionales que se derivan de la utilización de aminas para la captura post-combustión de CO₂ son el alto costo de operación y mantenimiento, como consecuencia de la facilidad con que se degradan las aminas, la formación de sales estables altamente corrosivas y del consumo energético de la etapa de regeneración.

La investigación y desarrollo en los procesos de absorción basados en aminas se orientan hacia la modificación del empaque de las torres para reducir la caída de presión y aumentar el contacto, la integración energética para reducir los requerimientos energéticos, la búsqueda de aditivos que reduzcan la corrosión (permitiendo mayores concentraciones de amina) y la mejora de los procedimientos en la etapa de regeneración. Entre los aditivos propuestos están las aminas estéricamente impedidas y de piperazina (Tabla 4).

Tabla 4. Otras aminas usadas para captura de CO₂.

Piperazina (PZ)



- Es una diamina cíclica utilizada como aditivo para aumentar la cinética de absorción de CO₂ en sistemas con aminas.
- Se utiliza en bajas concentraciones (0.5 M -2.5 M) debido a su baja solubilidad en agua.
- La Universidad de Texas ha encontrado que el sistema K₂CO₃/PZ (2:1) muestra un índice de absorción de 10 - 30 % más rápido que el proceso *Econamine FG Plus*[™].
- Se usa sólo como aditivo debido al alto costo de la PZ y su baja solubilidad.

Aminas estéricamente impedidas



- Son aminas primarias cuyo grupo amino está unido a un carbono terciario o secundarias con un carbono secundario o terciario unido a su grupo amino.
- Las más utilizadas son 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) y 2-piperidinaetanol (PE).
- Son más baratas que las primarias o secundarias, además de tener mayor capacidad de absorción pues el carbamato que forman es poco estable y se propicia la formación de bicarbonato.

Actualmente existen varios procesos basados en aminas para captura de CO₂, así como propuestas para mejorarlos, los cuales se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Estado del arte de la absorción química basada en aminas²⁷.

Empresa	Aportes tecnológicos	Características relevantes
Fluor	Proceso <i>Econamine FG Plus™</i>	Basado en MEA al 30 % masa, al cual se le añaden inhibidores para evitar la corrosión del equipo. Es usado para la obtención de CO ₂ , captando 350 ton/día, que se utilizan para bebidas de la industria alimenticia. ²⁸
Mitsubishi Heavy Industries y Kansai Electric	Proceso <i>KM CDR</i>	Logra menor entalpía de regeneración ²⁹ y minimiza la degradación del solvente sin necesidad de aditivos al usar aminas estéricamente impedidas sintetizadas específicamente (KS-1, KS-2 y KS-3). Sin embargo es el proceso basado en aminas más costoso. ³⁰
Calsol Technologies	Proceso de captura de CO ₂ por etapas DC103®	Basado en diaminas acuosas, propone reducir los costos incorporando la captura de contaminantes en una absorción selectiva secuencial de SO ₂ , NO _x , Hg y CO ₂ . Amina terciaria sintetizada que duplica la capacidad de absorción de la MEA.
Aker Clean Carbon	Proceso de captura de CO ₂ portátil	Desarrollo de un proceso portátil para pruebas en 2010, usado en el Centro de Captura de Wilsonville, Alabama, y en operación desde 2012 en el <i>Centro Tecnológico Statoil</i> en Mongstad (Noruega).
PowerSpan	Proceso <i>ECO2™</i>	A base de mezclas de aminas en solución acuosa, ha demostrado ser viable a escala piloto.
Alstom y Dow Chemical	Proceso <i>UCARSOL FGC-3000™</i>	Desarrollo de un proceso que tiene por objetivo captar una tonelada de CO ₂ por hora.
HTC Pure Energy y Doosan Babcock	Solvente basado en aminas	Sintetizado en la Universidad de Regina, Canadá, promete reducir la energía de regeneración ³¹ .

²⁷ Elaboración propia.

²⁸ Fluor continúa mejorando el proceso: ha logrado bajar su consumo energético de 3700 kJ/kg de CO₂ a 2800 kJ/kg de CO₂, aunque no se ha probado a escala comercial.

²⁹ Hasta 20 % menos que los procesos basados en MEA.

³⁰ Hasta 5 veces el costo de Econamine FG Plus™.

³¹ En un 30 % respecto al proceso Econamine FG Plus™.

1.2.2.2 Alternativas a la absorción con aminas

Con el fin de superar los problemas operacionales derivados del uso de aminas, se ha propuesto utilizar otras moléculas similares para la captura de CO₂. De esta forma, se espera aprovechar la selectividad del grupo amino y eliminar sus inconvenientes. Dos propuestas en este aspecto han sido el amoníaco y los aminoácidos.

1.2.2.2.1 Amoníaco

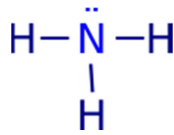


Figura 11. Molécula de amoníaco.

Los procesos de amoníaco se basan en la reacción de éste con CO₂ formando carbonato de amonio, el cual puede volver a reaccionar con CO₂ formando bicarbonato de amonio.

Entre sus ventajas está una menor entalpía de regeneración que los sistemas de aminas, con gran capacidad de absorción de CO₂, resistencia a la degradación por oxígeno y bajo costo, además de la opción de reaccionar con óxidos de azufre o de nitrógeno (que se pueden encontrar como contaminantes en los gases de combustión) formando sulfato de amonio y nitrato de amonio, que pueden de ser vendidos como fertilizantes.

En contra parte hay que tener en cuenta que se trata de un gas tóxico y presenta una alta presión de vapor, por lo que en el proceso hay que enfriarlo a 60 - 80 °F durante la absorción, teniendo pérdidas durante la regeneración.

Alstom ha patentado el *Proceso de Amoníaco Enfriado (CAP)*³² con temperaturas de operación de 32-50 °F, donde se evita la obtención de productos secundarios y el amoníaco regenerado se regresa al absorbedor.

1.2.2.2.2 Aminoácidos

Se ha propuesto como alternativa la utilización de aminoácidos para la captura de CO₂. Los aminoácidos tienen el grupo funcional amino, por lo que tienen un comportamiento similar a las aminas y no se deterioran en presencia de oxígeno.

Los aminoácidos más comunes utilizados en tratamiento de gases son alanina y glicina, junto con algunos derivados como dimetilglicina y dietilglicina. Las investigaciones demuestran que son adecuados para aplicarlos en la absorción de gas son un mejor resultado debido a su resistencia a la degradación.

³² De su nombre en inglés *Chilled Amonia Process*.

Siemens posee un proceso basado en sales de aminoácidos, debido a que no tienen presión de vapor (evitando su evaporación), no son inflamables, tóxicas, explosivas u olorosas (sin riesgo por inhalación). Son químicamente estables (no presentan degradación en presencia de oxígeno), biodegradables y amigables con el medio ambiente (por su presencia en la naturaleza).

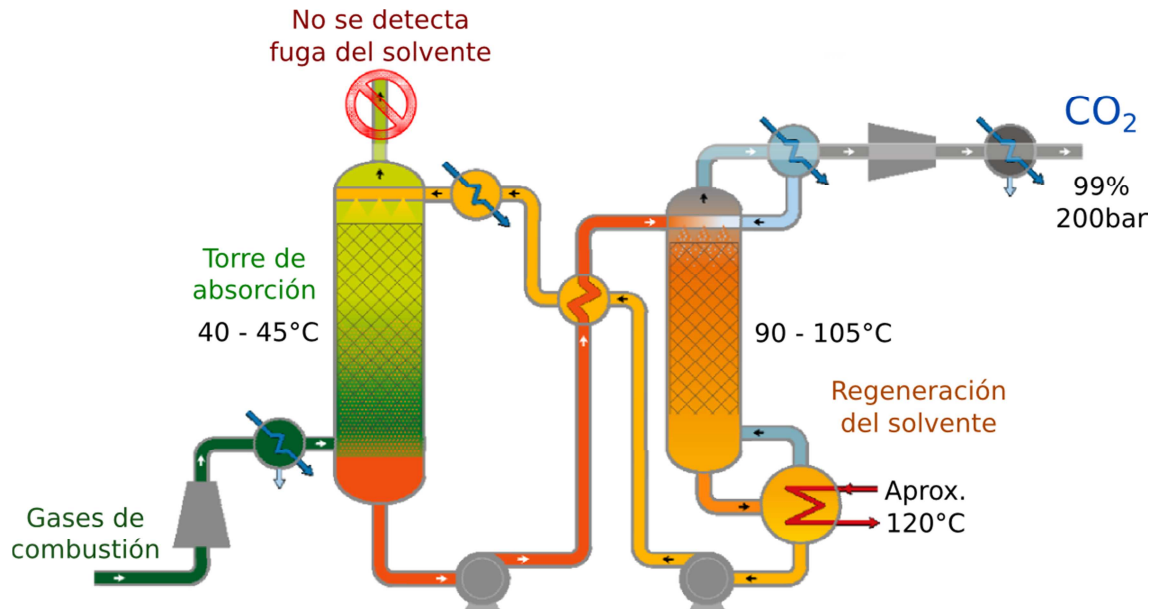


Figura 12. Proceso PostCap™ de Siemens.

El proceso PostCap™ de Siemens fue validado en 2009 en condiciones reales en una estación productora de energía eléctrica de Tampa Electric Company, que posee cuatro unidades quemadoras de carbón que en total producen más de 1800 MW. Se logró la remoción de más del 90 % de CO₂ de la corriente de gases, así como óxidos de azufre, bajando sólo en 6 % la eficiencia del proceso de la planta sin la captura de CO₂. Se obtuvo de un producto potencialmente comerciable: CO₂ con 99 % de pureza a un costo energético de 2.7 GJ/ton de CO₂ capturado. Así mismos, se demostró que la degradación del solvente es menor al 1 % en un año, así como la alta estabilidad térmica del mismo y bajos costos de operación utilizando material de construcción estándar y empaque industrial.

Todo esto nos indica que los solventes basados en aminoácidos son económicos, fáciles de manipular y tienen un bajo impacto ambiental, así mismo son una alternativa tecnológica escalable e implementable a las plantas existentes. Es por ello que hemos decidido explorar ésta alternativa en este trabajo, pero antes de seguir debemos hacer una revisión más amplia acerca de los aminoácidos.

1.3 Aminoácidos

Los aminoácidos son compuestos nitrogenados que presentan un carbono central (también llamado carbono α) unido a un grupo carboxilo, un grupo amino, un hidrógeno y una cadena lateral (Grupo R)³³ (Figura 13).

Los aminoácidos son unidades monoméricas de las proteínas, metabolitos energéticos y muchos de ellos son elementos nutritivos esenciales.

Existen 20 de aminoácidos que son codificados por el ADN para formar proteínas (proteínógenos codificables) por lo que se les considera aminoácidos estándar. De estos pueden surgir aminoácidos proteínógenos no codificables por modificaciones a los aminoácidos estándar (hidroxilación, fosforilación, dimerización, metilación, carboxilación...), aminoácidos no proteínógenos que cumplen funciones importantes (como intermediarios metabólicos, por ejemplo) y multitud de derivados de los mismos con funciones indispensables para la vida (neurotransmisores, reguladores, etc.).

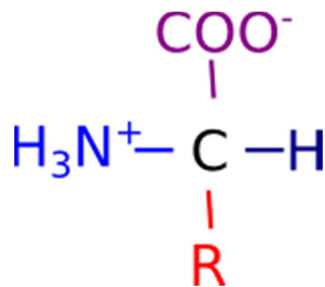


Figura 13. Estructura general de los aminoácidos.

A la izquierda el grupo amino, arriba el grupo carboxilo, último a la derecha se encuentra el hidrógeno y abajo la cadena lateral.

Los aminoácidos estándar o α -aminoácidos se pueden polimerizar formando cadenas peptídicas y proteicas³⁴. Cabe mencionar que las proteínas son las más versátiles de las biomoléculas y son necesarias para funciones cruciales en todos los procesos biológicos. Tomando esto en cuenta, puede inferirse la importancia de los aminoácidos como moléculas indispensables para la vida. A partir de 20 aminoácidos, se pueden producir multitud de combinaciones con los que se fabrican enzimas, hormonas, anticuerpos, proteínas estructurales, etc.

Los aminoácidos estándar son diferentes entre sí por su cadena lateral, la cual varía en estructura, tamaño y carga eléctrica, dándole diferentes características a cada aminoácido. A pesar de éstas diferencias, existen características comunes entre ellos.

³³ La única excepción a ésta definición es la prolina, que es considerada un aminoácido cíclico. Su grupo amino es secundario y es, de hecho, un α -iminoácido, aunque usualmente se le menciona como un aminoácido.

³⁴ Si se unen pocos aminoácidos, se denomina oligopéptido o péptido, si son más se llama polipéptido, término que puede ser intercambiado por el de proteína. Generalmente, los polipéptidos tienen masas moleculares inferiores a 10,000 y las proteínas tienen masas moleculares superiores (entre 5,500 y 220,000).

1.3.1 Propiedades Ácido-Base

Los aminoácidos son anfóteros³⁵. Al disolverse, el aminoácido se encuentra en su forma de ion dipolar o zwitterion³⁶, el cual puede actuar como dador o aceptor de protones.

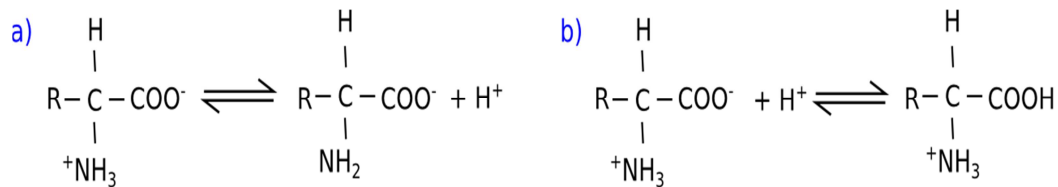


Figura 14. Zwitterion.

Las dos formas que los aminoácidos toman en disolución: a) Ion donador de protones, b) Ion aceptor de protones.

Existe un pH específico para cada aminoácido, donde la carga positiva y la carga negativa son de la misma magnitud y el conjunto de la molécula es eléctricamente neutro. Este es denominado punto isoeléctrico (pI). A cualquier pH por debajo de éste punto se tendrá una carga neta positiva, mientras que a pH mayores al punto isoeléctrico la carga total de la molécula será negativa.

Todos los aminoácidos con un solo grupo α -amino, un solo grupo α -carboxilo y un grupo R no ionizable tienen dos valores de pK_a similares. El pK_a del grupo carboxilo se encuentra entre 1.8 - 2.4, el del grupo amino está entre 8.8 - 11.0. A pH cercanos a estos valores poseen efecto tampón. Los aminoácidos con un grupo R ionizable tienen tres valores de pK_a debidos éste último al grupo ionizable.

Es importante recordar que el pK_a de cualquier grupo funcional se ve fuertemente afectado por su entorno químico. En el intervalo de pH fisiológico tanto los grupos del ácido carboxílico como los del grupo amino se hallan totalmente ionizados³⁷, por lo que en el cuerpo humano, los α -aminoácidos se pueden comportar como ácidos o bases.

1.3.2 Estereoisomería

Los aminoácidos tienen un carbono central (α) de estructura tetraédrica unido a cuatro grupos diferentes: carboxilo, amino, R y un átomo de hidrógeno. Esto hace que el carbono α sea un centro quiral³⁸ y los cuatro grupos pueden tener dos configuraciones espaciales³⁹ diferentes, por lo que presenta estereoisomería.⁴⁰

Al ser estereoisómeros no superponibles entre sí, se denominan enantiómeros. Para nombrarlos, se utiliza el sistema D, L. Históricamente, D y L hacían referencia a levógiro y dextrógiro, según desviaran la luz a la izquierda o a la derecha.⁴¹

³⁵ A menudo se denominan *anfolitos* (electrolitos anfóteros).

³⁶ Un zwitterion es una molécula portadora de grupos cargados con polaridad opuesta. La palabra viene del alemán, significa *ión híbrido*.

³⁷ Voet D. Voet J. G. Aminoácidos. Bioquímica. 3ra Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006. Pag 64.

³⁸ Del griego *chiros* que significa *mano*.

³⁹ Una molécula con un centro quiral puede presentar dos configuraciones espaciales diferentes (dos estereoisómeros), pero si tiene n centros quirales puede tener 2^n estereoisómeros.

⁴⁰ Cabe señalar que la única excepción es la glicina, cuyo grupo R es un hidrógeno, por lo que no presenta estereoisomería.

⁴¹ Los enantiómeros rotan el plano de la luz polarizada en direcciones opuestas.

Por ello cabe aclarar que no todos los L-aminoácidos son levógiros; L y D hacen referencia solamente a la configuración absoluta de los sustituyentes alrededor del carbono quiral.⁴²

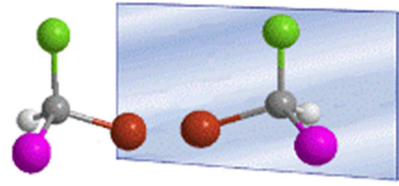


Figura 15. Estereoisómeros.⁴³

Los enantiómeros son dos conformaciones espaciales diferentes de los mismos sustituyentes unidos a un carbono central, conocido como centro quiral.

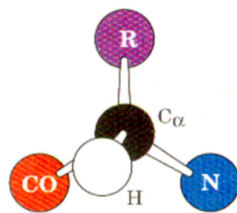


Figura 16. Conformación de los L-aminoácidos⁴⁴.

Un aminoácido puede en principio existir en sus dos formas enantioméricas, pero en la naturaleza lo habitual es encontrar sólo una de ellas. Así pues tenemos que todos los aminoácidos proteicos son L-aminoácidos. La formación de estructuras estables y repetidas de las proteínas requiere de un solo tipo de estereoisómero. Las células son capaces de sintetizar específicamente los isómeros L de los aminoácidos porque los centros activos de las enzimas son asimétricos, por lo que las reacciones catalizadas por ellas son estereoespecíficas.

1.3.3 Clasificación de los aminoácidos

Como se mencionó anteriormente, los aminoácidos se diferencian entre sí por su cadena lateral (-R). Dicha cadena puede ser polar o no polar, por lo que se suele clasificar en 3 grandes grupos a los aminoácidos: apolares, polares sin carga y polares con carga.

Aunque parezca una clasificación simplista, es de importancia resaltar que es la cadena lateral la que hace que varíe el comportamiento de los α -aminoácidos. “Sus características particulares de polaridad, acidez, tamaño, flexibilidad de conformación, capacidad para establecer enlaces entrecruzados, formar enlaces hidrógeno y su reactividad misma, dependen de la cadena lateral.” (Voet, 2006:66)

Existe otra clasificación de los aminoácidos que toma como criterio si es posible sintetizarlos a partir de otros aminoácidos o es necesario ingerirlos en la dieta, que los clasifica en Esenciales y No esenciales.

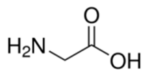
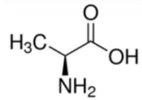
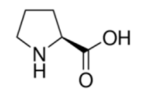
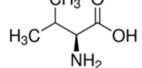
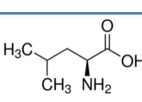
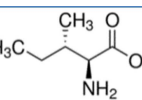
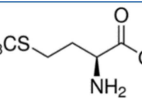
En la Tabla 6, aparecen los 20 aminoácidos estándar clasificados de acuerdo a su cadena lateral. Se indica con un asterisco si se trata de un aminoácido esencial.

⁴² Esta es una convención propuesta por Emil Fischer en 1891, basándose en la configuración absoluta del gliceraldehído: los compuestos que tienen una configuración relacionada con el L-gliceraldehído se designan L y los relacionados con el D-gliceraldehído se denominan D.

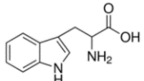
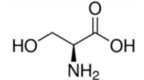
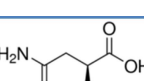
⁴³ Profesor en Línea. Estereoquímica e Isomería. [Página web en internet] 2006.

⁴⁴ Voet D. Voet J. G. Aminoácidos. Bioquímica. 3ra Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006. Pag. 71.

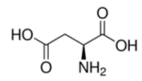
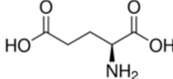
Tabla 6. Clasificación de los 20 aminoácidos estándar por su cadena lateral⁴⁵.

		Aminoácido Símbolo	Cadena lateral	Estructura	pI	pKa
No polares	<p>Alifáticos</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Apolares ➤ Hidrofóbicos ➤ Baja reactividad química <p><i>Capacidad tampón</i> pH≈2-3 pH≈9-10</p>	Glicina Gly, G	H ⁴⁶		5.97	pK ₁ 2.34 pK ₂ 9.60
		Alanina Ala, A	Hidrocarburo alifático		6.01	pK ₁ 2.34 pK ₂ 9.69
		Prolina Pro, P	Pirrolidino (Estructura cíclica distintiva ⁴⁷)		6.48	pK ₁ 1.99 pK ₂ 10.96
		Valina* Val, V	Hidrocarburo alifático		5.97	pK ₁ 2.32 pK ₂ 9.62
		Leucina* Leu, L	Hidrocarburo alifático		5.98	pK ₁ 2.36 pK ₂ 9.60
		Isoleucina* Ile, I	Hidrocarburo alifático		6.02	pK ₁ 2.36 pK ₂ 9.68
		Metionina* Met, M	Éter tiólico		5.74	pK ₁ 2.28 pK ₂ 9.21

⁴⁵ Elaboración propia.⁴⁶ Debido a que su cadena lateral es un hidrógeno, no presenta estereoisomería.⁴⁷ Limitaciones de conformación impuestas por su singular estructura.

		Aminoácido Símbolo	Cadena lateral	Estructura	pl	pKa
No polares (continuación)	Aromáticos ➤ Hidrofóbicos ➤ Absorción ultravioleta <i>Capacidad tampón</i> pH≈2-3 pH≈9-10	Fenilalanina* Phe, F	Fenilo		5.48	pK ₁ 1.83 pK ₂ 9.13
		Triptófano* Trp, W	Indol		5.89	pK ₁ 2.38 pK ₂ 9.39
Polares sin carga	Polares sin carga ➤ Poco solubles en agua <i>Capacidad tampón</i> pH≈2-3 pH≈9-10	Serina Ser, S	Hidroxilo		5.68	pK ₁ 2.21 pK ₂ 9.15
		Treonina* Thr, T	Hidroxilo		5.87	pK ₁ 2.11 pK ₂ 9.62
		Cisteína ⁴⁸ Cys, C	Tiol		5.07	pK ₁ 1.96 pK ₂ 10.28 pK ₃ 8.18
		Tirosina Tyr, Y	Fenólico		5.66	pK ₁ 2.20 pK ₂ 9.11 pK ₃ 10.07
		Asparagina Asn, N	Amida		5.41	pK ₁ 2.02 pK ₂ 8.80
		Glutamina Gln, Q	Amida		5.65	pK ₁ 2.17 pK ₂ 9.13

⁴⁸ Con frecuencia forma un enlace disulfuro con otra molécula de cisteína. A este dímero se le conoce como *cistina*.

		Aminoácido Símbolo	Cadena lateral	Estructura	pI	pKa
Polares con carga	Carga Positiva ➤ Hidrofílicos <i>Capacidad tampón</i> pH≈2-3 pH≈9 ➤ pH≈10.5-12.5 <i>Capacidad tampón Histidina</i> pH≈2-3 pH≈6 pH≈9-10	Lisina* Lys, K	Butilamonio		9.74	pK ₁ 2.18 pK ₂ 8.95 pK ₃ 10.53
		Arginina* Arg, R	Guanidino		10.76	pK ₁ 2.17 pK ₂ 9.04 pK ₃ 12.48
		Histidina* His, H	Imidazolio		7.59	pK ₁ 1.82 pK ₂ 9.17 pK ₃ 6.00
Polares con carga (continuación)	Carga Negativa ➤ Hidrofílicos <i>Capacidad tampón</i> pH≈2-4 pH≈9-10	Ácido Aspártico ⁴⁹ Asp, D	Ácido carboxílico		2.77	pK ₁ 1.88 pK ₂ 9.60 pK ₃ 3.65
		Ácido Glutámico ⁵⁰ Glu, E	Ácido carboxílico		3.22	pK ₁ 2.19 pK ₂ 9.67 pK ₃ 4.25

⁴⁹ En su forma de ión se le llama *aspartato*.⁵⁰ En su forma iónica se le conoce como *glutamato*.

1.3.4 Aminoácidos en la industria

Los aminoácidos se utilizan como aditivos en la industria alimenticia, en medicamentos, como suplementos alimenticios para animales y para mejorar las cosechas. El glutamato es utilizado en la industria como ablandador de carne y para fabricar glutamato monosódico, un potenciador de sabor. Fenilalanina y aspartato se utilizan como endulzantes, glicina en alimentos con edulcorante, cisteína para mejorar la calidad del pan, alanina para enriquecer el sabor de los zumos de fruta (junto con el aspartato), triptófano e histidina como antioxidantes, lisina como complemento en pan tipo japonés y metionina también como complemento para productos base soya. Para complementos de la alimentación de animales de consumo se encuentran disponibles lisina, metionina, triptófano, treonina, valina, isoleucina, histidina y arginina.

La mayoría de los procesos industriales para obtener aminoácidos se realizan mediante biocatálisis, es decir, mediante la acción de microorganismos. En estos procesos, se utiliza un sustrato hidrocarbonado⁵¹ en presencia de una fuente de nitrógeno. En la naturaleza, los microorganismos rara vez producen exceso de aminoácidos más allá de sus propias necesidades, debido a mecanismos de retroalimentación que inhiben la producción de éstos. Es por ello que la producción industrial de aminoácidos depende de una selección de microorganismos mutantes o de la manipulación genética.

Los procesos de biocatálisis no son los únicos usados para producir aminoácidos. A partir de propileno, metanol y amoníaco es posible sintetizar químicamente DL-Met, usando como reactivos óxido de calcio y ácido 2-hidroxi 4-metiltiobutanoico se produce DL-hidroximetionina, y se obtiene DL-Trp haciendo reaccionar éster acetaminomalonico y fenilhidracina. Otra forma de sintetizar aminoácidos se basa en la hidrólisis controlada de proteínas de origen animal o vegetal, donde la materia prima se descompone en péptidos de cadena corta, cadena larga y, por supuesto, aminoácidos libres. La desventaja al utilizar procesos de síntesis química es que se vuelve necesario separar la mezcla de enantiómeros D y L. Sólo interesan los L-aminoácidos para la mayoría de sus aplicaciones, por no tener función biológica el isómero D. Para su uso como complementos alimentarios, existen algunos animales que poseen las enzimas necesarias para usar los D-aminoácidos, tales como la metionina y el triptófano.⁵² Es de resaltar que la síntesis mediante microorganismos tiene una notable ventaja, pues se desean los L-aminoácidos en aplicaciones de la industria alimentaria, y los microorganismos los sintetizarán selectivamente.

⁵¹ Azúcares, almidón, melaza...

⁵² El D-Trp se puede utilizar en ganado porcino, pero en aves sólo se aprovecha 55-85 % del mismo.

1.4 Espectroscopia

1.4.1 Fundamentos

La luz es energía radiante transportada a través de fotones y emitida por un campo ondulatorio. Se considera que la luz tiene una naturaleza dual y se puede describir en términos de partículas y ondas. Las ondas de luz constan de campos eléctricos y magnéticos, que oscilan en campos perpendiculares entre sí.

Longitud de onda (λ) es la distancia entre las crestas de dos ondas. Frecuencia (ν) es el número de oscilaciones completas de una onda por unidad de tiempo. Una oscilación por segundo se llama hertzio (Hz). Frecuencia y longitud de onda tienen una relación:

$$\nu\lambda = c$$

Donde c es la velocidad de la luz, 2.998×10^8 m/s en el vacío.

En un medio distinto al vacío, la velocidad de la luz es c/n , siendo n el índice de refracción del medio. La luz se propaga más lentamente a través de la materia que en el vacío, por lo que $n > 1$. Cuando la luz atraviesa dos medios diferentes, la frecuencia permanece constante mientras varía la longitud de onda.

Desde el punto de vista de la energía, la luz se concibe como partículas llamadas fotones. Cada fotón transporta una cantidad de energía (E) que viene dada por:

$$E = h\nu$$

Siendo h la constante de Planck, 6.62618×10^{-34} J·s.

Esta ecuación afirma que la energía es proporcional a la frecuencia. Si combinamos las dos ecuaciones anteriores, obtenemos:

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

Tomando en cuenta que el inverso de la frecuencia es el número de onda ($\tilde{\nu}$), se puede escribir también como:

$$E = hc\tilde{\nu}$$

La energía es inversamente proporcional a la longitud de onda, pero directamente proporcional al número de onda. Por ejemplo: la luz roja, con una longitud de onda mayor a la luz azul, es menos energética que ésta última.

La figura 17 muestra distintas regiones del espectro electromagnético. Se aprecia que la luz visible representa sólo una pequeña fracción del espectro electromagnético⁵³. No hay cambios fundamentales bruscos en las características de la radiación electromagnética al pasar de una región a otra.

Se debe tener en cuenta que diferentes regiones del espectro electromagnético provocan diferentes efectos sobre las moléculas. La radiación de microondas estimula el movimiento rotacional de las moléculas. La radiación infrarroja (IR) estimula el movimiento vibracional de las moléculas. La radiación visible y ultravioleta (UV) hacen que los electrones pasen a niveles electrónicos de mayor energía. Los rayos X y UV lejanos rompen los enlaces químicos, ionizando las moléculas.

Estos efectos diferentes y característicos de cada región del espectro electromagnético nos permiten obtener diferente información de la sustancia a la que se le va a realizar el análisis. Por ejemplo, en la región de IR se estimula el movimiento vibracional de los enlaces intermoleculares, por lo que un análisis de ésta región nos brinda información sobre los tipos de enlaces presentes, ayudando a identificar el compuesto al conocer sus grupos funcionales.

1.4.2 Espectrofotometría y la ley de Lambert-Beer

Toda sustancia que absorbe luz visible aparece coloreada cuando absorbe o transmite la luz. Se absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca y nuestros ojos detectan las longitudes que no fueron absorbidas, así que observamos el color complementario al absorbido.

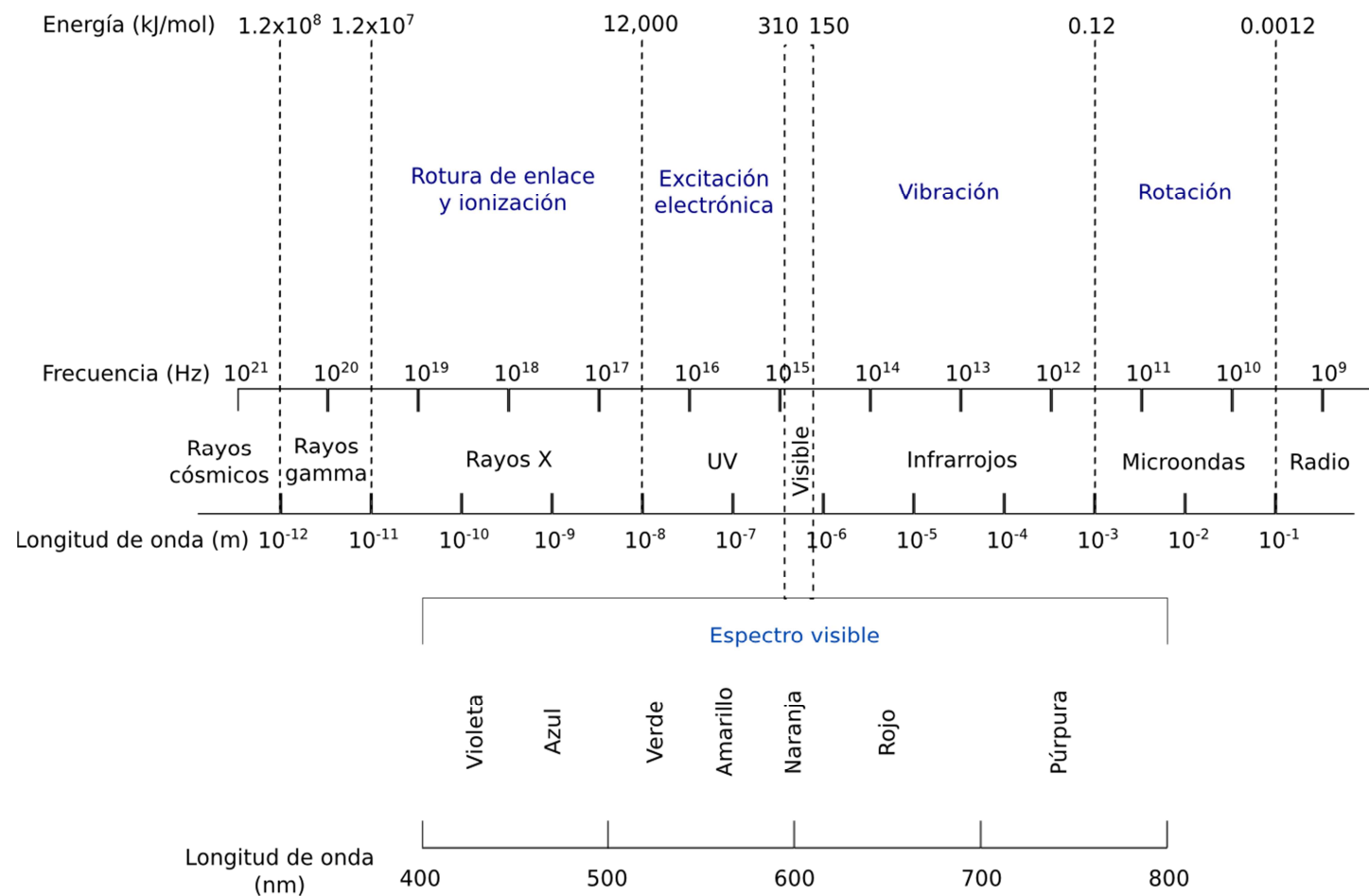
Tabla 7. Longitud de onda de los colores visibles⁵⁴.

Longitud de onda de máxima absorbancia (nm)	Color absorbido	Color observado
380-420	Violeta	Amarillo verdoso
420-440	Azul violáceo	Amarillo
440-470	Azul	Naranja
470-500	Verde azulado	Rojo
500-520	Verde	Púrpura
520-550	Verde amarillento	Violeta
550-580	Amarillo	Azul violáceo
580-620	Naranja	Azul
620-680	Rojo	Verde azulado
680-780	Púrpura	Verde

⁵³ El espectro visible va de una longitud de onda de 380 a 780nm.

⁵⁴ Harris D. C. Análisis Químico Cuantitativo. 2da Ed. Barcelona: Reverté S. A; 2001. Pag. 505.

Figura 17. Regiones del espectro electromagnético.⁵⁵



⁵⁵ Harris D. C. Análisis Químico Cuantitativo. 2da Ed. Barcelona: Reverté S. A; 2001. Pag. 501.

Esta propiedad de absorber ciertas longitudes de onda (sean visibles o no), se pueden utilizar para medir concentraciones químicas. La experiencia inicia cuando luz, procedente de una fuente continua pasa a través de un monocromador (prisma, red de difracción o un filtro)⁵⁶, que selecciona una estrecha banda de longitudes de onda del haz incidente (Figura 18). Esta luz “monocromática” atraviesa una muestra con un paso óptico (b), y se mide la potencia de luz radiante que emerge.

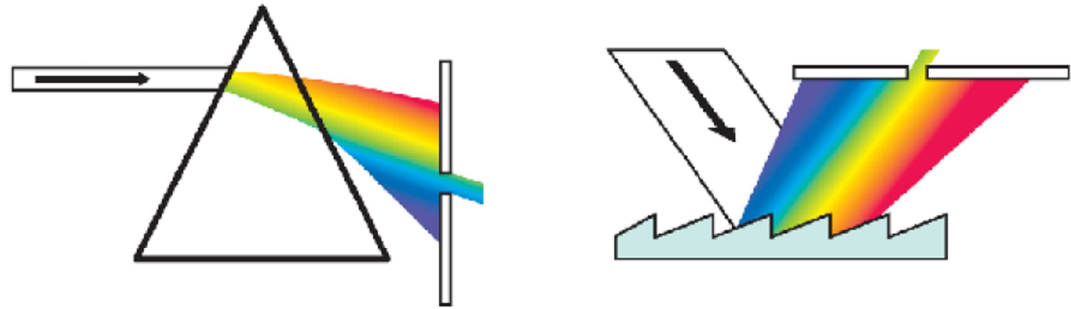


Figura 18. Función de un monocromador al escoger un intervalo de longitudes de onda.⁵⁷

Cuando una muestra absorbe luz, la potencia radiante (P) del haz de luz disminuye. Así que cuando luz monocromática, con una potencia radiante P_0 incide en la muestra de longitud b , la potencia radiante del haz que emerge por el lado opuesto de la muestra será P y, como la muestra puede haber absorbido algo de luz, $P \leq P_0$ (Figura 19).

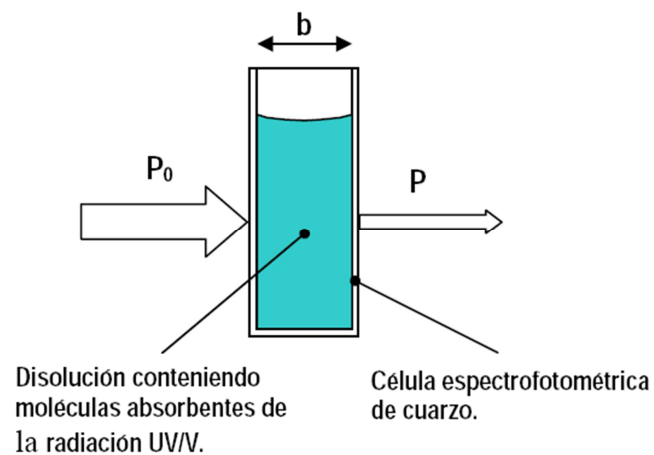


Figura 19. Atenuación de un haz de radiación por una solución absorbente.⁵⁸

⁵⁶ La luz monocromática tiene “un solo color” (longitud de onda). Aunque es imposible producir luz monocromática, cuanto mejor es el monocromador más estrecho es el intervalo de longitudes de onda del haz emergente.

⁵⁷ Cerón Camacho R. Espectroscopia Aplicada a Síntesis Química. [Presentación digital] México: Instituto Mexicano del Petróleo; 2015

⁵⁸ Departamento de Química-Física. Espectroscopia Ultravioleta/Visible (U/V). [Página Web en Internet]. España: Universidad de Granada.

Transmitancia (T) es la fracción de luz incidente que pasa a través de la muestra. Puede tomar valores de 0 a 1. Se suele expresar también el porcentaje de transmitancia, que es $100 \cdot T$.

$$T = \frac{P}{P_0}$$

Por otra parte, absorbancia (A)⁵⁹ se define como:

$$A = \log_{10} \left(\frac{P_0}{P} \right) = -\log_{10} T$$

Es adimensional, pero algunos escriben “unidades de absorbancia” (u.a.) después de ella.

Absorbancia es importante porque es directamente proporcional a la concentración (C) de la especie que absorbe luz en la muestra. Cuando no se absorbe luz, $P=P_0$ y $A=0$. Si se absorbe el 90 % de la luz, se transmite el 10 % y $P=P_0/10$. Este cociente vale $A=1$.

Este es el fundamento de la espectrometría tal y como se utiliza en química analítica. Se le llama Ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon b C$$

Donde:

C es la concentración de la muestra, suele darse en mol/L (M).

b es el paso óptico, usualmente en cm.

ϵ es la absorptividad molar⁶⁰, es característica de cada sustancia y nos indica cuánta luz absorbe a una longitud determinada. Cuando mayor es la absorptividad molar, mayor es la absorbancia. Sus unidades son M/cm.

Es importante recordar que la ley de Lambert-Beer es válida para la radiación monocromática⁶¹ que atraviesa una solución diluida⁶², cuando la especie absorbente no participa en un equilibrio que depende de su concentración.

En disoluciones concentradas, las moléculas de soluto interaccionan entre sí debido a su proximidad. Cuando esto ocurre, sus propiedades (incluyendo la absorptividad molar) varían. A concentraciones muy altas, los solutos se convierten prácticamente en disolventes. Las propiedades de una molécula no son las mismas en diferentes solventes. Los solutos que no absorben también pueden interactuar con especies absorbentes y alterar la absorptividad molar.

Si la molécula absorbente participa en un equilibrio químico que depende de la concentración, la absorptividad molar cambia con la concentración. Para comprenderlo,

⁵⁹ También se suele llamar a la absorbancia “densidad óptica”.

⁶⁰ Antiguamente se le llamaba “Coeficiente de extinción”.

⁶¹ La absorbancia y la absorptividad molar dependen de la longitud de onda.

⁶² Aproximadamente ≤ 0.01 M para la mayoría de las sustancias.

tomemos como ejemplo, un ácido HA. En disolución concentrada predomina la especie no disociada HA. Si se diluye, aumenta la disociación. Si la absorptividad molar de A⁻ no es la misma que HA, no obedecerá la ley de Lambert-Beer al ser diluida.

1.4.3 Consideraciones generales al realizar mediciones espectroscópicas

En la práctica, al realizar un análisis espectrofotométrico, no se mide directamente la potencia radiante incidente (P_0). Lo que se mide es la potencia radiante de luz que pasa a través de una celda de referencia que contiene al disolvente puro (sin la muestra) siendo ésta P_0 , pues compensa la reflexión, dispersión y absorción debida a la celda y al disolvente.

Se recomienda escoger la longitud de onda de máxima absorbanza. Esto es porque la curva es relativamente aplanada alrededor del máximo, de manera que la absorbanza apenas varía si deriva un poco el monocromador o si varía algo la longitud de banda escogida. Otra razón para escoger el máximo de absorbanza es que se consigue la máxima respuesta para una concentración dada de analito, es decir, la sensibilidad es máxima.

La concentración de la muestra se debe ajustar de forma que caiga en un intervalo medio de absorbanza. Si presenta demasiada absorbanza, pasará muy poca luz y será difícil medir la intensidad. Si, por el contrario, hay poca absorbanza, será difícil medir la diferencia entre la muestra y la referencia.

En espectroscopia visible y UV se coloca normalmente una muestra líquida en una celda que tiene paredes de sílice fundida (SiO₂). El vidrio es adecuado para espectroscopia visible pero no para UV, pues absorbe radiación. Usualmente las celdas miden 1cm de longitud de paso óptico.

En mediciones de IR las células normalmente se construyen con NaCl o KBr. Para la región de IR lejano (400 – 50 cm⁻¹) el polietileno es una ventana transparente. De ordinario, las muestras sólidas se trituran hasta conseguir polvo fino, que se mezcla con un aceite mineral (hidrocarburo viscoso llamado *nujol*) para dar una dispersión que se llama *mul* y se presiona entre dos placas de KBr. El espectro del analito no se puede observar con claridad en las regiones en las que el aceite mineral absorbe radiación IR. También se puede triturar la muestra sólida con el KBr hasta obtener un polvo fino, con 1 % peso de muestra, y formar una pastilla por prensado a 600 atm aproximadamente.

Los sólidos y los polvos también se pueden analizar por reflectancia difusa⁶³, en la que se observa la radiación IR reflejada, en lugar de la transmitida. Las longitudes de onda absorbidas por la muestra no son reflejadas del mismo modo que las demás. A ésta técnica sólo es sensible la superficie de la muestra. Los resultados de un análisis espectroscópico se representan en un espectro de absorción. Éste nos permite conocer como una sustancia determinada absorbe selectivamente las radiaciones de diferentes

⁶³ Existen muchos tipos de mediciones de IR: de transmitancia y reflectancia especular, de reflectancia difusa, reflectancia total atenuada, reflexiones múltiples, entre otros. Sin embargo, estas técnicas salen del alcance de este trabajo.

longitudes de onda. Su representación más frecuente es mediante un gráfico bidimensional cuya variable independiente es un parámetro que caracterice la radiación (frecuencia, longitud de onda o número de onda), siendo la variable dependiente algún parámetro que nos indique cuán intensamente es absorbida la radiación (absorbancia, transmitancia, absorptividad molar etc.). Para UV-Visible se utiliza la longitud de onda o número de ondas vs absorbancia o absorptividad molar. En la región IR se utiliza comúnmente número de ondas y % de transmitancia.

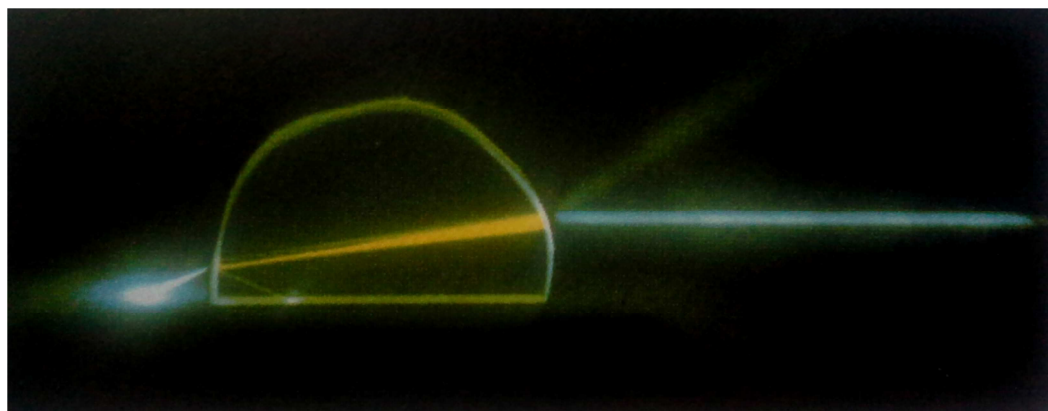


Figura 20. Transmisión, reflexión, refracción, absorción y luminiscencia⁶⁴

1.5 Espectroscopia de fluorescencia

Se han revisado los fundamentos de la espectrofotometría en general. En esta sección nos ocuparemos de la espectrofluorometría. Como su nombre lo indica, se basa en el fenómeno de fluorescencia y es una técnica utilizada en investigación con distintas aplicaciones debido a su alta sensibilidad. Esta sensibilidad es debida al hecho innegable de que en vez de medir la luz absorbida se mide la luz emitida.

¿Por qué la fluorescencia presenta tan alta sensibilidad al ser comparada con las espectroscopias de absorción? La respuesta es simple: la fluorescencia es superior por la forma en que se mide, relativa a un fondo oscuro y no como una comparación con el haz de luz brillante de referencia. Recordemos que la absorción de luz es cuantificada como la diferencia entre la intensidad de la luz que pasa a través de la referencia (P) y la de la muestra (P_0). En fluorescencia, la intensidad se mide directamente, sin necesidad de una referencia, por ello es relativamente más simple detectar bajos niveles de luz (la mayoría de los detectores pueden medir incluso un solo fotón). Por ejemplo, consideremos una solución de 10^{-10} M con un coeficiente de extinción molar⁶⁵ de 10^5 M⁻¹cm⁻¹. La absorbancia es de 10^{-5} por cm, lo que equivale a un porcentaje de transmisión de

⁶⁴ Harris D. C. Análisis Químico Cuantitativo. 2da Ed. Barcelona: Reverté S. A.; 2001. Pag. 485.

⁶⁵ El coeficiente de extinción molar o absorptividad (ϵ) define que tanta luz absorbe de una sustancia por unidad de trayectoria de luz por unidad de concentración de la sustancia.

99.9977 %. Aún con dispositivos ópticos y electrónicos excepcionales, será muy difícil detectar el pequeño porcentaje de luz absorbida (0.0023 %). Y debe tomarse en cuenta que, en caso de que fuera posible medirla, el error debido a alguna variación en la transmisión o a que las celdas reflejan un poco de luz en su superficie, probablemente sería mayor que la absorbancia de 10^{-5} .

(Lakowicz, 2006: 623)

1.5.1 Fenómenos de fotoluminiscencia

Las sustancias pueden absorber luz, la absorción de un fotón de luz ultravioleta o visible es capaz de elevar a una molécula a estados de mayor energía⁶⁶. Para volver a su estado fundamental, lo más común es que se lleven a cabo procesos no radiativos. Sin embargo, en el caso específico de la fotoluminiscencia⁶⁷, una molécula absorbe luz, pasa a un estado excitado y luego emite fotones para volver a su estado fundamental.

Según el estado electrónico excitado desde el cual emitan, es posible distinguir dos tipos de fotoluminiscencia: fluorescencia y fosforescencia (de los cuales la fluorescencia es la que nos interesa). Para comprender lo que ocurre en éstos fenómenos, es de gran utilidad el diagrama de Jablonski⁶⁸, como el que se muestra a continuación (Fig. 21)

Antes de la incidencia de luz, la molécula se encuentra en un estado fundamental (S_0). Como consecuencia de la absorción de un fotón, se produce la transición electrónica en la que un electrón se mueve a otro orbital de mayor energía, es decir, pasa a un estado excitado.

Los estados electrónicos pueden ser singuletes⁶⁹, si poseen electrones con spin opuesto al segundo electrón del estado fundamental, o tripletes⁷⁰, si sus electrones no están apareados. Ambos pueden presentarse tanto para estados electrónicos en estado fundamental como para estados electrónicos excitados

⁶⁶ Como se mencionó anteriormente, las radiaciones infrarroja y de microondas no tienen energía suficiente para inducir transiciones electrónicas, pero pueden modificar el estado vibracional o rotacional de la molécula.

⁶⁷ Se conocen como fenómenos de luminiscencia aquellos en los que una sustancia presenta emisión de luz desde un estado electrónico excitado. Pueden darse dos tipos de fenómenos de luminiscencia, en esta tesis nos ocuparemos sólo de la llamada fotoluminiscencia. El otro tipo, el de la quimioluminiscencia (en el que a partir de una reacción química se genera un producto en estado excitado que presenta emisión de luz) escapa a los límites de nuestro tema.

⁶⁸ Estos diagramas deben su nombre al profesor Alexander Jablonski, padre de la espectroscopia de fluorescencia.

⁶⁹ Singlet (traducción usada en Harris D. C. Análisis Químico Cuantitativo. 2da Ed. Barcelona: Reverté S. A.; 2001).

⁷⁰ Triplet (Ídem).

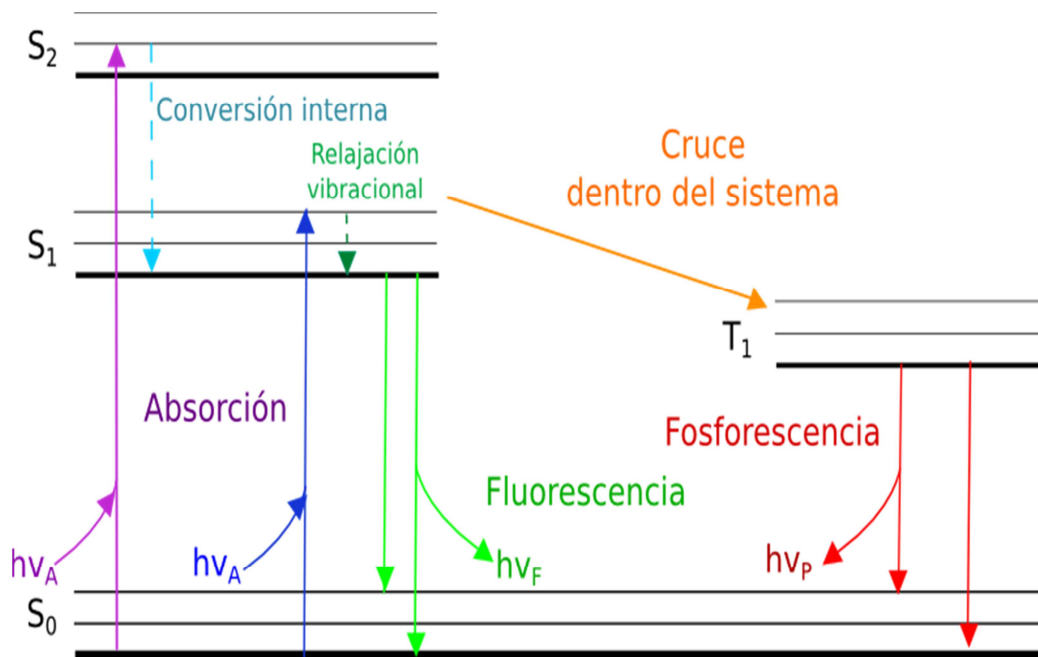


Figura 21. Diagrama de Jablonski.

La transición electrónica se da en un lapso de 10^{-15} s. El principio de Franck Condon dicta que es posible la transición de un electrón desde un estado electrónico a otro de mayor energía debido a que la masa nuclear de la molécula es mayor que la masa del electrón, por lo que la transición electrónica es más rápida que los movimientos vibracionales de los núcleos⁷¹ y éstos últimos se consideran insignificantes. Cabe resaltar que esta transición es tan rápida que el electrón tiene el mismo spin en el estado excitado que en el estado fundamental.

Una vez que ha sido promovido, el electrón se relaja rápidamente al nivel vibracional de menor energía del estado excitado, en un lapso aproximado de 10^{-14} s (este proceso se denomina “relajación vibracional”). Si se da el caso en que el electrón fue excitado a un nivel de excitación singulete más alto (S₂), ocurre una “conversión interna”, en un orden de tiempo de 10^{-12} s, donde se relaja hasta el nivel de excitación singulete de menor energía (S₁). Ambos procesos, relajación vibracional y conversión interna, son no radiativos y tienen lugar antes de la emisión de luz.

Menos probable es el caso en que suceda un “cruce dentro del sistema”⁷² desde el nivel de excitación singulete de menor energía (S₁) hasta un estado electrónico excitado triplete (T₁) desde el que ocurre la emisión de luz. Es más probable que éste proceso se dé en moléculas que contengan átomos pesados⁷³ porque las interacciones entre el momento cinético del electrón sobre sí mismo y alrededor del núcleo atómico se vuelven importantes y el cambio de spin es favorecido. Precisamente, es la necesidad de un cambio de dirección en el giro del spin lo que vuelve poco probable la emisión de luz desde un estado triplete, y cuando se da, ocurre más lento. Éste es el caso del fenómeno de fosforescencia, cuya emisión de luz entonces dura más de 10^{-8} s: milisegundos, segundos, hasta incluso varios minutos.

⁷¹ Una vibración nuclear se lleva a cabo en un lapso de tiempo del orden de 10^{-13} s.

⁷² Intersystem crossing (Íbidem).

⁷³ Iodo y Bromo en moléculas orgánicas, iones metálicos en inorgánicas.

En la mayoría de los casos, la emisión de fotones se da desde éste nivel S_1 y, si así sucede, el fenómeno será conocido como fluorescencia. El tiempo de vida típico para la fluorescencia es de 10 ns.

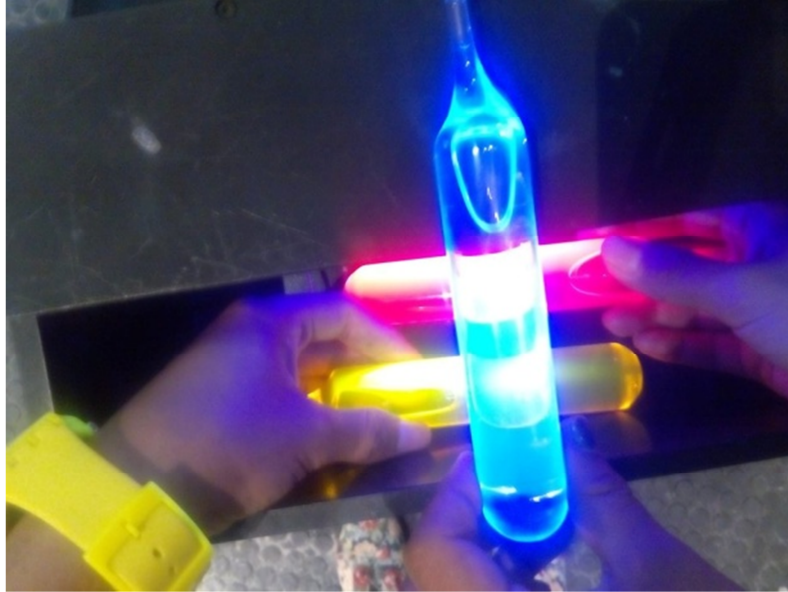


Figura 22. Fluorescencia: brillo de colores.

Rodamina B, piridina 6 y POPOP son sustancias que presentan fluorescencia, en la imagen se observan brillando de color rojo, amarillo y azul, respectivamente.

1.5.2 Sustancias que presentan fluorescencia y su importancia en investigación

En los átomos, absorber un fotón de luz involucra la promoción de un electrón de la capa externa hacia un orbital externo. En las moléculas, un electrón es promovido del mayor orbital molecular ocupado (HOMO⁷⁴) al menor orbital molecular desocupado (LUMO⁷⁵). La energía del fotón de luz absorbido debe ser la diferencia de energía entre el estado fundamental de nuestra sustancia y la energía de su estado excitado, lo que implica que ciertas longitudes de onda son absorbidas selectivamente por las sustancias. A las sustancias que emiten luz se les da el nombre de *luminóforos*, “Portadores de luz”⁷⁶. De aquí en adelante nos referiremos a las sustancias que presentan fluorescencia como *fluoróforos*.

El tiempo que dura la emisión de luz, la longitud de onda que se requiere para realizar los experimentos, así como la información que se puede obtener de estos, son determinadas por el fluoróforo. Existe una gran cantidad de fluoróforos con diferentes propiedades, que son utilizadas para obtener diferente información. Los fluoróforos

⁷⁴ Highest Occuped Molecular Orbital.

⁷⁵ Lowest Unoccupied Molecular Orbital.

⁷⁶ Del griego “luminis” = luz y “foro” = llevar.

que presentan anisotropía se utilizan para realizar mediciones de difusión rotacional, mientras que los que son sensibles al pH pueden ser usados para medirlo. Para medir fluorescencia de tejidos, se utilizan fluoróforos que tienen una larga longitud de onda de excitación y emisión, pues muchos tejidos muestran fluorescencia por sí mismos a ondas cortas. En mediciones que dependen del tiempo, el tiempo de vida del fluoróforo a utilizar debe ser suficiente como para la escala de tiempo del experimento.



Figura 23. Ajolote con sangre fluorescente.

Investigadores de la Universidad de Florida usaron al ajolote, modificado para tener sangre fluorescente, para estudiar como estos anfibios sanan sin tener cicatrices. El ajolote de la figura es casi translúcido por una mutación natural.⁷⁷

De forma general, podemos clasificar en dos grupos a los fluoróforos: intrínsecos y extrínsecos. Aquellos llamados intrínsecos serán los que ocurran de manera natural y los extrínsecos serán los que se añadan a la muestra en cuestión como una fuente de fluorescencia donde no la había.

⁷⁷ Sherburne M. *UF Researchers Look Into Salamanders for Human Wound Scarring Clues*. Florida: Sun Coast News; 2014.

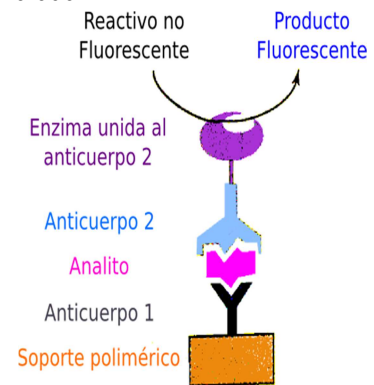


24. Piel de las piernas en luz visible y ultravioleta.

Residuos de aceite Corexit® aceleran la absorción de toxinas en la piel. Los resultados no son visibles (izquierda) pero la contaminación produce manchas fluorescentes fácilmente reconocibles en luz UV (derecha).⁷⁸

Los fluoróforos extrínsecos también son de gran importancia en la ciencia. Una de las aplicaciones más importantes está los *ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas* (ELISA⁸¹). Para detectar un antígeno⁸², se une su anticuerpo correspondiente a una enzima que da lugar a un producto fluorescente. Que el producto sea fluorescente amplifica la señal para su análisis químico, siendo la sensibilidad de estos ensayos menores a un nanogramo de analito. Son de gran utilidad en el análisis de muestras ambientales, ya que pueden realizarse rápidamente y en el sitio mismo, necesitando menos de 1 mL de muestra. Actualmente, los ELISA se usan para detectar pesticidas, contaminantes industriales, explosivos y toxinas microbianas en aguas subterráneas, suelos y alimentos en cantidades que van desde partes por millón hasta partes por trillón⁸³.

Un ejemplo de fluoróforos intrínsecos son los aminoácidos tirosina, fenilalanina y triptófano, que dan origen a la fluorescencia natural de las proteínas. Dicha fluorescencia es muy sensible a cualquier cambio en su ambiente, lo que brinda información sobre cambios conformacionales de la proteína, enlace de ligantes, asociaciones entre proteínas y desdoblamiento de las mismas a nivel molecular. Los fluoróforos intrínsecos también son útiles a nivel macroscópico, especialmente al estudiar tejidos. La fluorescencia de tejidos queratinosos como la piel, es utilizada en dermatología para hacer diagnósticos rápidos y seguros⁷⁹. Otros fluoróforos intrínsecos se utilizan en análisis espectroscópicos de fluorescencia para establecer la presencia de hongos, fármacos, bacterias y otras muchas enfermedades de la piel y el cuero cabelludo, e incluso para conocer la extensión de lesiones y su profundidad⁸⁰.



25. ELISA.⁸⁴

El anticuerpo 1 se enlaza a un soporte polimérico y se trata con la muestra. Las moléculas no enlazadas se lavan y a continuación se trata la muestra con el anticuerpo 2, que está unido covalentemente a una enzima. Esto da un producto fluorescente fácilmente medible.

⁷⁸ James H "Rip" Kirby III, Surfrider Foundation, tomada de Eldred S.M. *BP Mix of Toxins Soaked Up by Wet Skin*. Discovery News; 19 de abril del 2012.

⁷⁹ El análisis conocido como "Lámpara de Wood" consiste en una lámpara de luz UV con un filtro que permite el paso sólo de las longitudes de onda de 380-330nm, la cual se coloca cerca de la piel del paciente.

⁸⁰ La emisión de fluorescencia de la dermis es más fuerte que la de la epidermis.

⁸¹ Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

⁸² Un anticuerpo es una proteína producida por el sistema inmune de un animal en respuesta a una molécula extraña, a la que se le denomina antígeno.

⁸³ La sensibilidad es de suma importancia en el análisis de residuos de bases militares desmanteladas, riesgosos a la salud humana aún en cantidades de partes por billón.

1.5.3 Espectros de fluorescencia

El espectro de emisión de fluorescencia es el resultado de graficar la intensidad de la fluorescencia contra las longitudes de onda. Una de las características del fenómeno de fluorescencia es el llamado “desplazamiento de Stokes”, que consiste en el desplazamiento que se observa entre el espectro de absorción del fluoróforo y el de emisión del mismo. Esto se debe a que no se emite toda la energía que se absorbe, siempre hay pérdidas de energía que se traducen en una emisión lumínica a mayor longitud de onda.

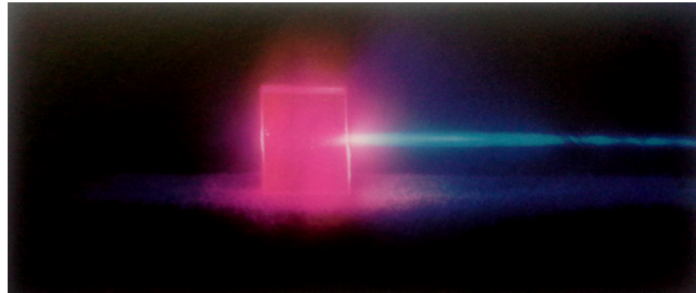


Figura 26. Desplazamiento de Stokes.⁸⁵

Cristal verde de granate de aluminio e itrio que contiene una pequeña cantidad de Cr³⁺, que al ser irradiado con luz azul emite luz roja de menor energía.

Otra característica que debemos mencionar es la “Regla de Kasha”, mejor conocida como “Regla del espejo” que establece que el espectro de emisión es generalmente independiente de la longitud de onda a la que se realiza la excitación. Se debe a que la conversión interna se lleva a cabo rápidamente (10^{-12} s) y la energía sobrante se vuelve energía vibracional hasta llegar al nivel S₁, produciendo un espectro que es la imagen reflejo de su propio espectro de absorción. Cabe mencionar que ésta imagen es reflejo sólo de la absorción que se da de S₀ a S₁ y no de todo el espectro de absorción

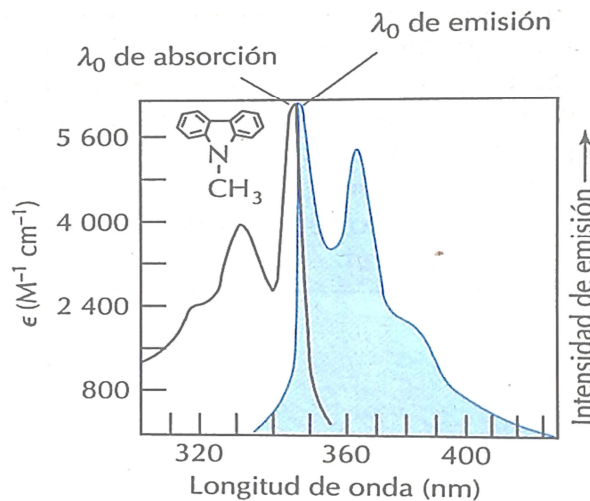


Figura 27. Regla de Kasha⁸⁶.

Espectros de absorción (línea negra) y de emisión (azul) de una disolución de N-metilcarbazol en ciclohexano, en los que se puede apreciar la regla de Kasha.

⁸⁴ Harris D. C. Análisis Químico Cuantitativo. 2da Ed. Barcelona: Reverté S. A.; 2001. Pag. 542.

⁸⁵ *Luminiscencia*. Lámina en color 16 (a). Tomada de Harris D. C. Análisis Químico Cuantitativo. 2da Ed. Barcelona: Reverté S. A.; 2001. Pag. 484.

⁸⁶ Harris D. C. Análisis Químico Cuantitativo. 2da Ed. Barcelona: Reverté S. A.; 2001. Pag. 517.

Hay dos tipos diferentes de espectros que nos interesan en espectrofluorimetría: el de emisión y el de excitación. Para el espectro de emisión, se establece una longitud de onda de excitación (la longitud de onda de excitación usada es usualmente aquella que presenta mayor absorbancia) y se registra la emisión de luz; mientras que para el espectro de excitación, se establece la longitud de onda de emisión (que puede ser cualquiera que corresponda a un pico de emisión en el espectro de emisión) y se registra la excitación.

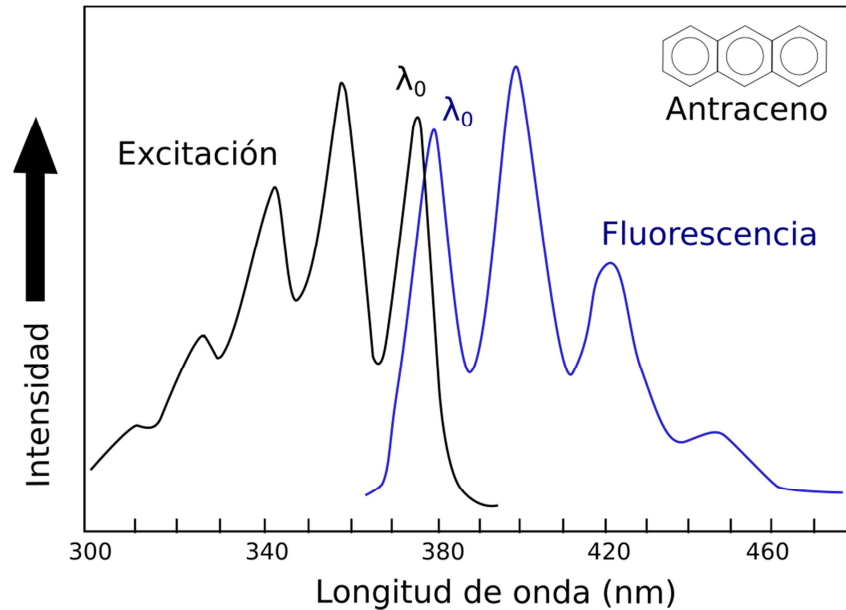


Figura 28. Espectros de excitación y emisión del antraceno.⁸⁷

1.5.4 Amortiguación⁸⁸ de la fluorescencia

Como ya se ha revisado, fluorescencia es un fenómeno que se da para que la molécula deje el estado excitado, pero no es el único camino. Existen además, otros procesos no radiativos que ocurren para que el electrón regrese a su estado fundamental, que compiten con el fenómeno de fluorescencia. La mayoría de estos procesos son de transferencia de energía al solvente o a algún soluto no luminiscente. Involucran pérdidas de calor infinitesimales, que no pueden ser medidas pero que encuentran su evidencia en el abatimiento de la intensidad de emisión de luz.

Entre estos procesos de amortiguación de la fluorescencia, podemos distinguir dos tipos:

- *Estático*: El amortiguador forma un complejo con el fluoróforo y reduce la cantidad de fluoróforos disponibles, disminuyendo la intensidad de la fluorescencia.

⁸⁷ Ídem. Pag. 519.

⁸⁸ Quenching.

- **Dinámico:** El fluoróforo excitado choca con el amortiguador, transfiriéndole la energía de excitación, disminuyendo su tiempo de vida y, por tanto, la intensidad de la luz.

Existe una forma de amortiguación de la fluorescencia que no involucra las transiciones radiativas y no radiativas, por lo que no se le considera entre los dos tipos de amortiguación antes citados. Se le conoce como *amortiguación por filtro interno*⁸⁹ y se da cuando la absorbancia total de la solución es alta (mayor a 0.1), lo que genera una reducción en la intensidad de la radiación que genera la excitación de las moléculas. Como ejemplo claro se encuentra la quinina, que sólo emite luz azul en la superficie.



Figura 29. Fluorescencia de quinina. Se puede apreciar un brillo intenso en la superficie y la amortiguación de la fluorescencia en el centro de la solución.

La quinina absorbe luz de una longitud de onda desde 280nm hasta 380nm para poder ser excitada. Cuando así sucede, la mayor parte de la luz perteneciente a ese intervalo de longitud de onda es absorbida por las moléculas superficiales de quinina, por lo que no hay luz que logre pasar hacia las demás moléculas (toda fue absorbida en la superficie). Como no hay luz disponible, no hay excitación de las demás moléculas de quinina y no brillarán, por lo que la quinina solo presenta emisión de fotones desde las moléculas superficiales.

1.5.5 Excímeros y monómeros

Existen casos en los que durante el estado excitado de la molécula se dan algunas reacciones, generando espectros que no cumplen con la regla de Kasha. Como ejemplo podemos citar al espectro de emisión de antraceno en presencia de dietilanilina (Figura 30). La emisión a menor longitud de onda es estructurada y corresponde a la imagen reflejo del espectro de absorción de antraceno. La emisión sin estructura a longitudes de onda mayores se debe a la formación de un complejo de transferencia de carga entre el estado excitado del antraceno y dietilanilina

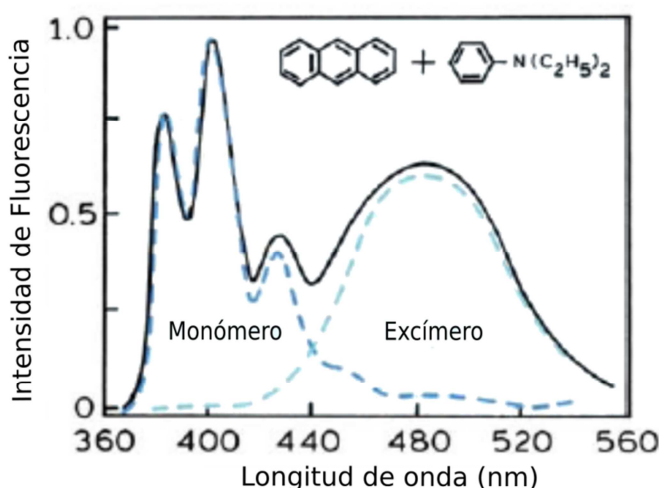


Figura 30. Espectro de emisión de antraceno disuelto en tolueno con 0.2 M de dietilanilina.⁹⁰

⁸⁹ Inner-filter quenching.

⁹⁰ Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3ra Ed. New York: Springer; 2006.

Las líneas punteadas muestran los espectros de emisión del antraceno y del excíplejo formado con dietilanilina.

Muchos hidrocarburos policíclicos aromáticos, como el pireno y el perileno, forman complejos de transferencia de carga con aminas. A estos complejos de estado excitado se les conoce como excíplejos.

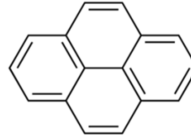


Figura 31. Molécula de pireno.

Algunos fluoróforos forman excíplejos consigo mismos. El ejemplo mejor conocido es el pireno. A bajas concentraciones el pireno muestra emisiones bien estructuradas, pero a concentraciones más altas la emisión invisible del pireno se vuelve visible (470nm). Esta emisión a mayor longitud de onda es debida a la formación de un dímmero de estado excitado, al que se le conoce como *excímero*.

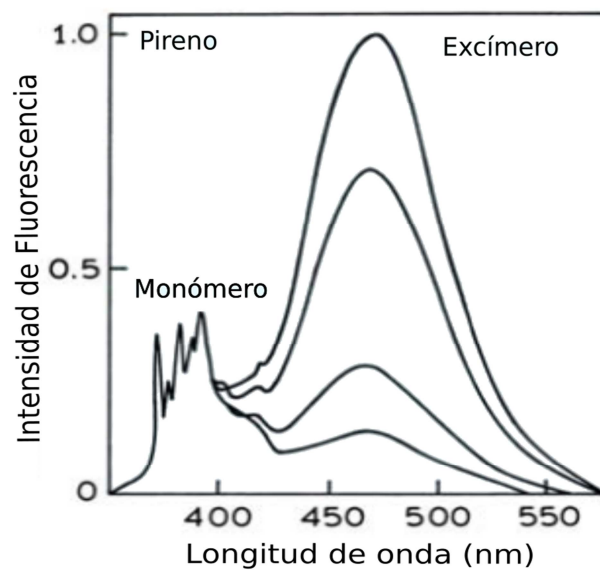


Figura 32. Espectro de emisión de pireno y su excímero.⁹¹

La intensidad relativa del pico del excímero (470 nm) decrece a medida que la concentración baja, desde la concentración de 6×10^{-3} M (más alta) hasta 0.9×10^{-4} M (más baja).

Podemos notar que la emisión del monómero de pireno tiene una estructura definida y su perfil de emisión es independiente de la concentración (a concentraciones menores o iguales a 10^{-5} M). Por otro lado, el espectro producido por el excímero no posee una estructura definida, emite a mayor longitud de onda (desplazamiento del espectro hacia el rojo⁹²) y su intensidad se incrementa con la concentración.

El pireno no tiende a formar dímeros en su estado basal. La formación de un excímero requiere de una molécula de pireno electrónicamente excitada (M^*) con una en su

⁹¹ Ibídem.

⁹² También llamado desplazamiento *batocrómico*.

estado fundamental (M). Para que esto se dé, ambas moléculas deben estar suficientemente separadas para que sólo una absorba luz. En su estado excitado, se promueve un electrón a un orbital electrónico de mayor energía; por lo que ahora sí resulta conveniente la formación de un dímero, pero sólo con una molécula que no se encuentre en el estado excitado (Figura 33).

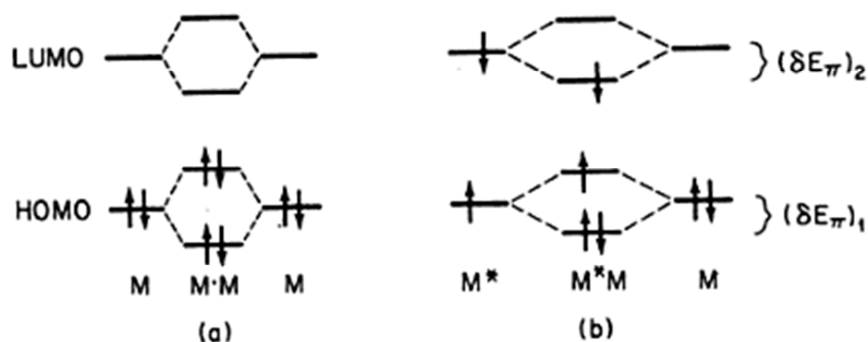


Figura 33. Formación de excímeros.⁹³

- (a) No hay estabilización para el dímero M·M formado por dos moléculas en su estado fundamental.
- (b) Estabilización correspondiente al excímero M*·M.

El excímero solo existe hasta que haya emisión de luz. Una vez ocurrida, la molécula antes excitada vuelve a su estado fundamental y se encuentran juntas dos moléculas en estado fundamental (M+M) en una situación comprimida de alta energía. En el espectro de fluorescencia no se aprecia estructura vibracional debido a que el estado fundamental se forma en una situación inestable que se rompe en dos moléculas.

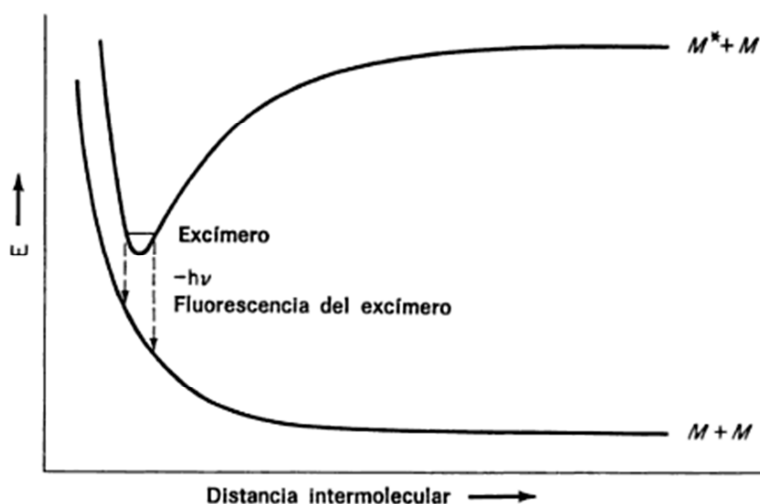


Figura 34. Formación y fluorescencia de un excímero.⁹⁴

La fluorescencia abarca un cierto intervalo de longitudes de onda debido a que el intervalo geométrico que abarca el estado de menor energía del excímero (indicado por la línea horizontal) se corresponde con un intervalo de diversas energías para el estado de transición.

⁹³ Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3ra Ed. New York: Springer; 2006. Pag. 521.

⁹⁴ Dewar J. S., Dougherty R. C. Teoría de las Perturbaciones de los Orbitales Moleculares en Química Orgánica. Barcelona: Reverté; 1980. Pag. 522.

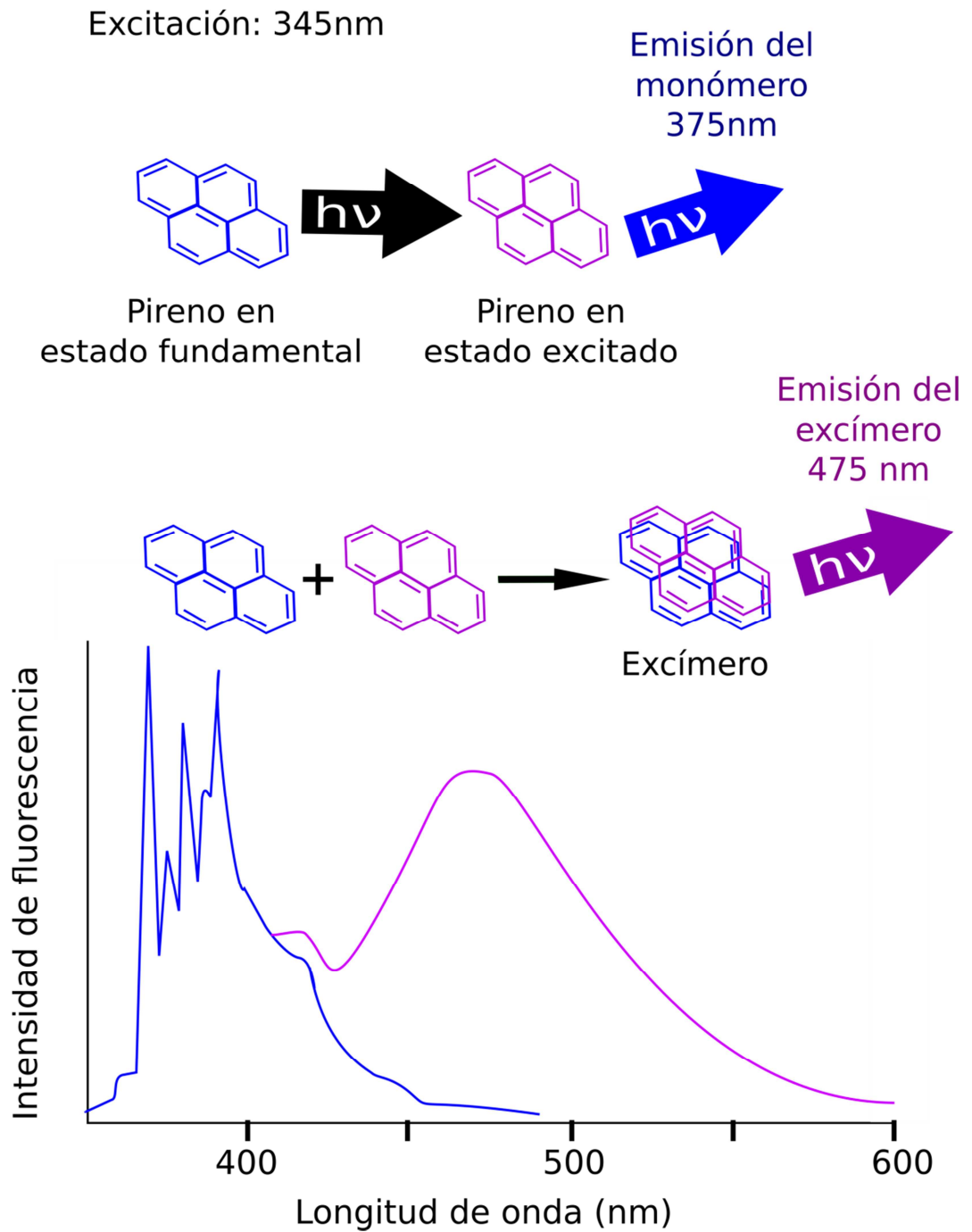


Figura 35. Formación de excímero y espectros de emisión de éste y el monómero.⁹⁵

⁹⁵ Gias Uddin y Zafrul Azam, 2013. A Novel Oligo-DNA Probe Carrying Non-nucleosidic Silylated Pyrene Derivatives: Synthesis and Excimer Forming Ability. American Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 3: 175-181. Modificada por la autora.

Estas moléculas son muy sensibles a cambios en su microentorno, lo cual es de gran utilidad en investigación. El excímero muestra un desplazamiento batocrómico debido a su naturaleza más polar que la del monómero. Al comparar los espectros de excitación del monómero y del excímero, es posible saber si existe interacción entre las moléculas que lo rodean, así como la naturaleza de ésta (polar o no polar).

Para realizar saber si existe una interacción, se comparan ambos espectros, restando el espectro del monómero al del excímero. Se considera que la interacción es específica si la diferencia es de mínimo 2 nm, de ser menor, se considera irrelevante.

Para hacer la comparación entre ambos espectros (monómero y excímero) es conveniente calcular el *centro espectral de masas* (CEM⁹⁶).

Ecuación 3. CEM

$$CEM = \frac{\int \lambda I_{\lambda} d\lambda}{\int I_{\lambda} d\lambda}$$

Donde:

λ es la longitud de onda.

I_{λ} es la intensidad de la excitación a la longitud de onda dada.

El CEM relaciona los cambios en la intensidad de excitación con la longitud de onda a la que se dan en todo un rango establecido, a diferencia de otros parámetros como la longitud de onda a la que se verifica sólo a la máxima intensidad de excitación. Es un indicador de los cambios en el medio del fluoróforo, por lo que es afectado con la polaridad del solvente y la temperatura.

1.5.6 Efecto de la concentración en la fluorescencia

A bajas concentraciones, hay pocas moléculas de pireno que, al recibir energía en forma de luz, pasan del estado fundamental a un estado excitado, desde el cual emiten luz (Fig. 36). Al estar en estado excitado, las moléculas también pueden formar excímeros (con otra molécula de pireno en estado fundamental) y emitir luz.

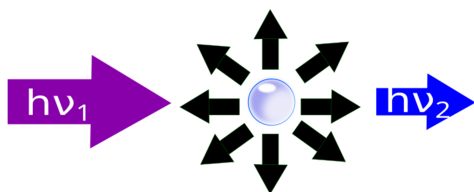


Figura 36. Fluorescencia del monómero a bajas concentraciones.

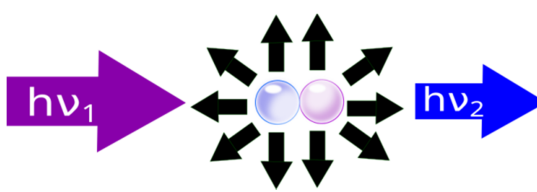


Figura 37. Emisión del excímero a bajas concentraciones.

La emisión de luz de la fluorescencia no puede nunca igualar la energía inicial que recibió, por lo que la luz emitida siempre será menor a la luz recibida ($h\nu_1 > h\nu_2$).

Si la concentración aumenta, habrá más moléculas y lógicamente aumentará la energía emitida en forma de luz ($h\nu_1 > h\nu_2$).

⁹⁶ En inglés *Spectral Center of Mass* (SCM).

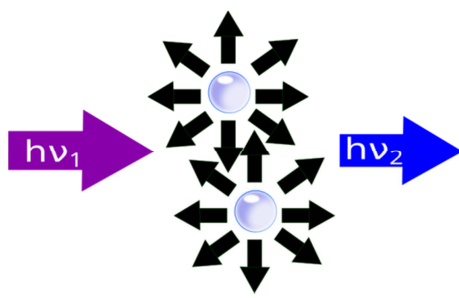


Figura 38. Aumento de fluorescencia del monómero al aumentar la concentración.

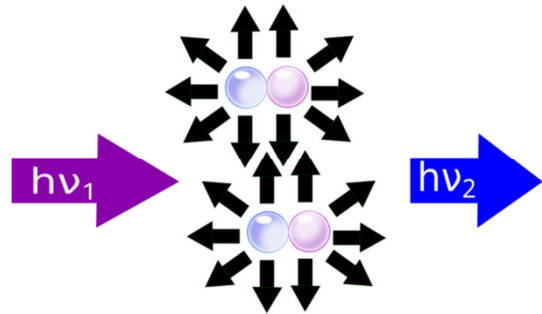


Figura 39. Aumento de fluorescencia del excímero al aumentar la concentración.

Sin embargo, llegará una concentración en que la intensidad de fluorescencia disminuirá, debido al exceso de moléculas. La energía será absorbida y emitida por algunas moléculas, pero esa luz emitida será absorbida de nuevo por otras moléculas y, dado que la energía emitida siempre es menor que la recibida, la intensidad de la fluorescencia se verá abatida ($h\nu_1 \gg h\nu_2$).

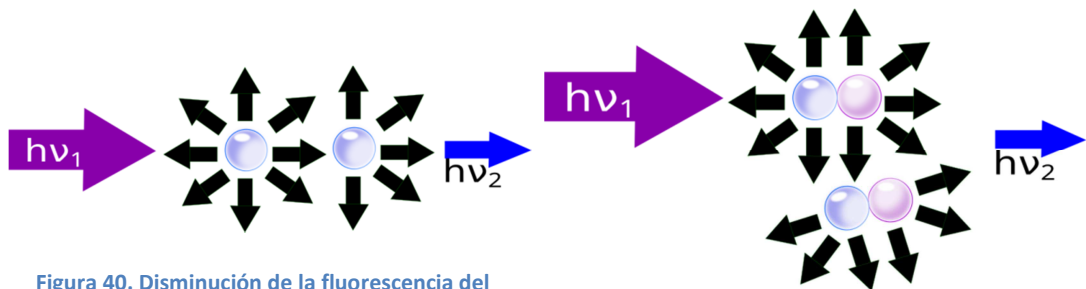


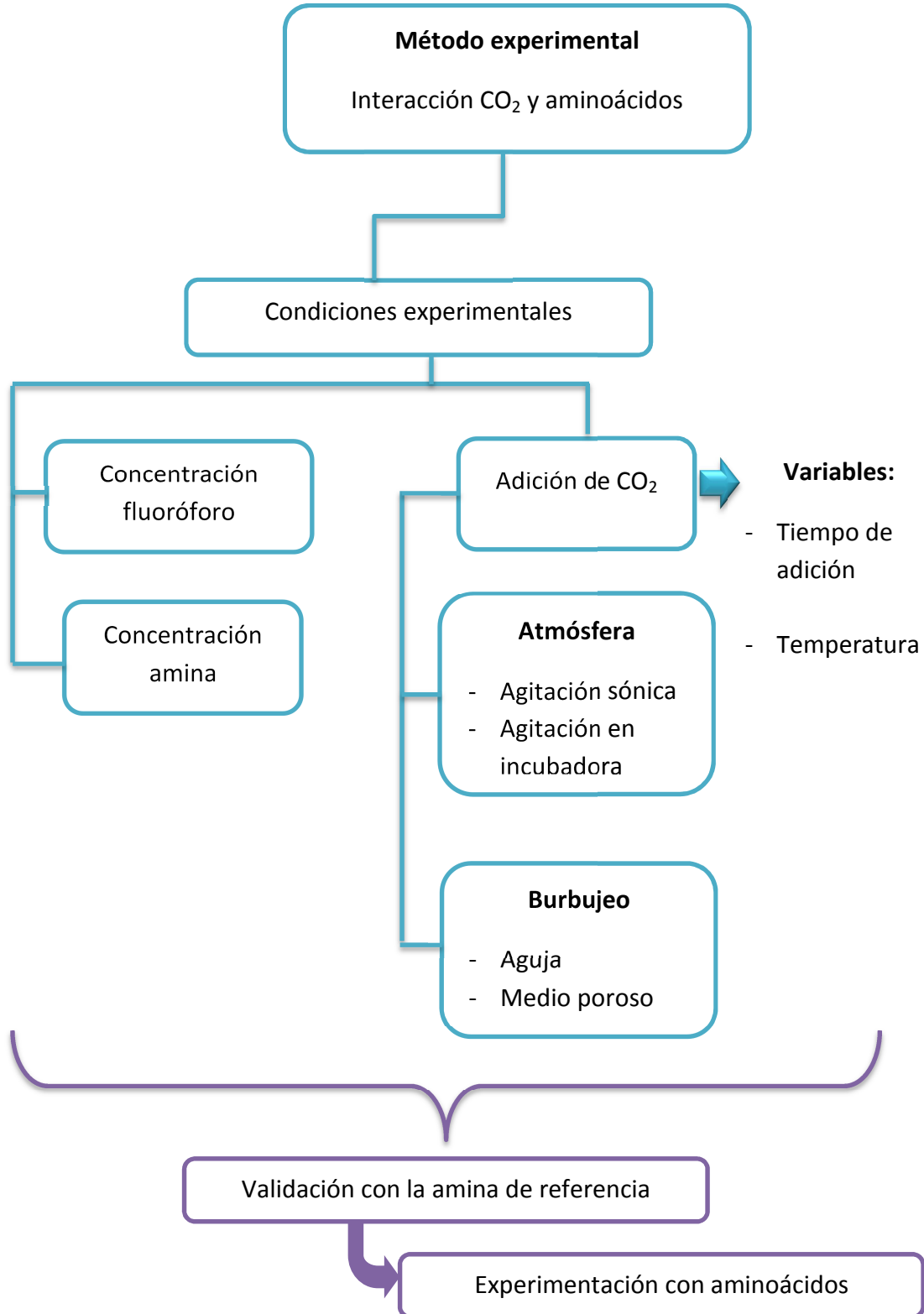
Figura 40. Disminución de la fluorescencia del monómero al aumentar la concentración.

Figura 41. Disminución de la fluorescencia del excímero al aumentar la concentración.

Si continuamos aumentando la concentración, la intensidad volverá a aumentar, debido al aumento de moléculas emisoras, hasta que la cantidad de moléculas vuelva a ser demasiada y se abata la intensidad de la fluorescencia. Es por ello que, al graficar la concentración contra la intensidad de fluorescencia obtenemos una gráfica escalonada

CAPITULO 2. Desarrollo experimental

Diagrama General



Se desarrolló un método experimental que muestra las interacciones entre dióxido de carbono y los aminoácidos seleccionados, el cual fue validado usando MEA como amina de referencia. El fluoróforo requerido para mostrar dichas interacciones fue el pireno que debido a la formación de excímeros es extremadamente sensible a cambios en su entorno. Se determinaron las condiciones del método experimental comenzando por la óptima concentración del fluoróforo y la amina, se probaron cinco métodos de adición de CO₂ para asegurar que se favorecía la interacción deseada, variando el tiempo de adición y por último se determinó la temperatura de operación.

2.1 Reactivos y equipo

2.1.1. Reactivos

- Acetonitrilo, Fermont, Grado HPLC, Pureza 99.97 %.
- Agua destilada.
- Alcohol isopropílico, Fermont, Grado HPLC, Pureza ≥ 99.7 %.
- D,L-Triptófano, Sigma-Aldrich, Grado TLC, Pureza ≥ 99 %.
- Glicina, Sigma-Aldrich, Grado TLC, Pureza ≥ 99 %.
- L- Ácido aspártico, Across Organics, Pureza > 98 %.
- L-Ácido glutámico, Sigma-Aldrich, Grado TLC, Pureza 99 %.
- L- Alanina, Sigma-Aldrich, Grado TLC, Pureza ≥ 98 %.
- L-Arginina, Sigma-Aldrich, Grado RA, Pureza ≥ 98 %.
- L- Asparragina, Sigma-Aldrich, Grado TLC, Pureza ≥ 98 %.
- L- Glutamina, Sigma-Aldrich, Grado HPLC, Pureza ≥ 99 %.
- L- Histidina, Sigma-Aldrich, Grado TLC, Pureza ≥ 99 %.
- L- Lisina, Across Organics, Pureza 98 %.
- L- Valina, Sigma-Aldrich, Grado TLC, Pureza ≥ 98 %.
- MEA, Sigma-Aldrich, Pureza ≥ 98 %.
- Pireno, Sigma-Aldrich, Pureza ≥ 99 %.

2.1.2 Equipo

- Espectrofluorómetro de estado basal, Shimadzu, modelo RF-5301. (Ver anexo II)
- Instalación de acero inoxidable (tubería, válvulas, sensores) para proporcionar y regular el flujo de CO₂.

2.2 Métodos experimentales

2.2.1 Preparación de las muestras

Las muestras con amina o alguno de los aminoácidos de la Tabla 33 se prepararon en proporción de 90 % agua destilada y 10 % disolvente. El fluoróforo sensor (pireno) se encuentra disuelto en acetonitrilo (el disolvente), mientras que la amina de referencia o el aminoácido a analizar debe estar disuelto en agua destilada. Ambos están a concentraciones muy bajas, debido a la alta sensibilidad de la técnica.

Para la obtención de los espectros de emisión y excitación se usó el espectrofluorofotómetro de estado basal Shimadzu RF- 5301, introduciendo las muestras en disolución en una celda de cuarzo, especial para este tipo de análisis, con capacidad para 3 mL. Se tiene especial cuidado para obtener la lectura, limpiando la celda antes de cada espectro, manipulándola con guantes, cuidando que no contenga burbujas y que el tapón se encuentre bien puesto para evitar contaminación. El fenómeno de fluorescencia depende de la temperatura, por lo que el sujetador de la muestra del espectrofluorómetro cuenta con un dispositivo para asegurar la temperatura de las muestras, al que se conecta un baño de temperatura con recirculación. Antes de realizar las mediciones se asegura que la muestra tenga la temperatura deseada y se cierra bien el compartimiento para la muestra para evitar fuentes de luz exterior.

2.2.2 Obtención de los espectros de emisión y excitación

Los espectros de emisión y excitación del fluoróforo se obtuvieron mediante el software del espectrofluorómetro (*Panorama Fluorescence Spectroscopy*).

Los parámetros utilizados para obtener el espectro de emisión del pireno fueron los siguientes:

Espectro de emisión

Rango: 340-700 nm

Longitud de onda de excitación: 335 nm

Slit de apertura: 1.5

Del espectro de excitación se obtienen dos diferentes espectros, uno para el monómero y otro para el excímero de pireno, para los cuales se utilizaron los parámetros:

Espectro de excitación	
Monómero	Excímero
Rango: 340-380 nm	Rango: 340-380 nm
Longitud de onda de emisión: 394 nm	Longitud de onda de emisión: 470 nm
Slit de apertura: 1.5	Slit de apertura: 3

2.2.3 Determinación de interacciones específicas

El *centro espectral de masas* (CEM) es un valor que relaciona los cambios en la intensidad con la longitud de onda a la que se dan, en un rango establecido de longitudes de onda. Es un valor que nos ayuda a caracterizar el espectro obtenido, lo que es de gran utilidad. Recordemos cómo se calcula:

Ecuación 4. CEM

$$CEM = \frac{\sum[(\lambda)(I_{\lambda})]}{\sum I_{\lambda}}$$

Donde:

λ es la longitud de onda.

I_{λ} es la intensidad de la excitación a la longitud de onda dada.

En este trabajo, el CEM se calculó para los espectros de excitación del monómero y del excímero, con el fin de compararlos, usando la siguiente expresión:

Ecuación 5. Diferencia entre espectros de excitación del monómero y el excímero.

$$\Delta_{CEM} = CEM_E - CEM_M$$

Donde:

CEM_E es el centro espectral de masas del excímero.

CEM_M es el centro espectral de masas del monómero.

Si la diferencia es mayor a 2 nm, la interacción entre moléculas se considera específica.

2.2.4 Determinación de linealidad

Para determinar la bondad de ajuste de los datos a una recta, se calculó el *coeficiente de determinación* (r^2).

Ecuación 6. Diferencia entre espectros de excitación del monómero y el excímero.

$$r^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

Donde:

$\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$ es la suma de los cuadrados de los datos explicada por el modelo lineal

$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$ es la suma de cuadrados de los datos

El valor máximo para r^2 es 1, lo que significa que todos los puntos están sobre la recta de regresión. Entre más cercano a 1 sea el valor, mejor ajuste tendrá a un modelo lineal.

2.2.5 Porcentaje de error

El error de las mediciones se calculó con *coeficiente de variación*⁹⁷, una medida de dispersión relativa expresada en porcentaje.

Para su cálculo, se utilizaron las siguientes expresiones⁹⁸:

Media aritmética (\bar{x}) de los datos:

Ecuación 7. Media aritmética.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^k x_i}{n}$$

Donde:

$\sum_{i=1}^k x_i$ Es la suma de todos los valores obtenidos, desde $i=1$ hasta el k ésimo valor

x_i es cada valor obtenido

n es el tamaño de la muestra

Desviación estándar⁹⁹ (s) de los datos:

Ecuación 8. Desviación estándar.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Donde:

$\sum(x_i - \bar{x})^2$ es la suma de los cuadrados de la diferencia del calor obtenido menos la media aritmética

x_i es cada valor obtenido

\bar{x} es la media aritmética

n es el tamaño de la muestra

Coeficiente de variación (CV):

Ecuación 9. Coeficiente de variación.

$$CV = \left(\frac{s}{\bar{x}}\right) 100$$

Donde:

s es la desviación estándar de la muestra

⁹⁷ También llamado *coeficiente de variación de Pearson* (r) y *Relative Standard Deviation* (RSD).

⁹⁸ Las abreviaturas y expresiones matemáticas fueron tomadas de Marques Dos Santos María José. *Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico Biológicas*. 2da Ed. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; 2004.

⁹⁹ También llamada "desviación típica".

\bar{x} es la media aritmética

Los valores del coeficiente de variación pueden llegar hasta un máximo de 30 % para ser aceptados, para valores mayores hay demasiada variabilidad y la media deja de ser representativa.

2.2.5 Método experimental para determinar interacción específica mediante fluorometría de estado basal en aminoácidos

1. Preparación de 10 mL de muestra a 10 μ M de aminoácido (disuelto en agua destilada) y 6 μ M de pireno (disuelto en acetonitrilo) en un sistema 90 % agua destilada y 10 % acetonitrilo, colocados en frascos de vidrio de 35 mL (8.5 cm de altura, 2.3 cm de diámetro).
2. Obtención de los espectros de emisión y excitación (del monómero y excímero) de la muestra.
3. Adición de CO₂ a la muestra durante 15 min a 100 mL/min, mediante burbujeador de vidrio sinterizado (tamaño de poro 20 Å, diámetro de 1 cm).
4. Obtención de los espectros de emisión y excitación (del monómero y excímero) de la muestra.
5. Cálculo de CEM (para monómero y excímero) y Δ CEM correspondiente.

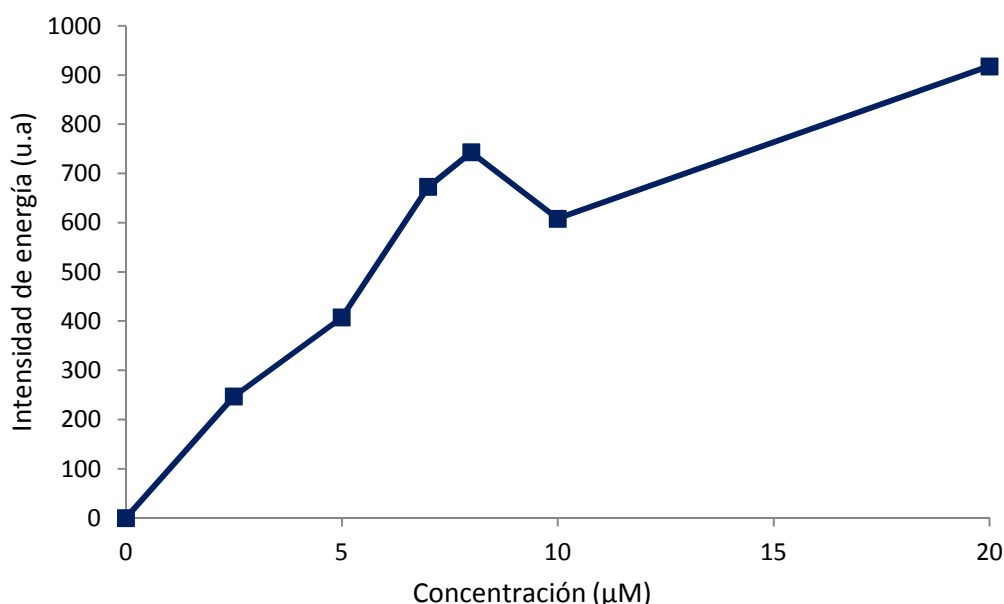
CAPITULO 3. Resultados y discusión

A continuación se presentarán los resultados obtenidos durante el desarrollo del método experimental, con los cuales se determinaron las óptimas condiciones del mismo, y en seguida los resultados correspondientes a los once aminoácidos evaluados.

3.1 Determinación de la concentración del fluoróforo

Se realizaron espectros de emisión y excitación para el monómero y excímero (Gráficos 1 y 2) para determinar la concentración adecuada del fluoróforo, en un rango de 0 - 20 μM .

Gráfico 1. Concentración de fluoróforo vs intensidad de emisión.

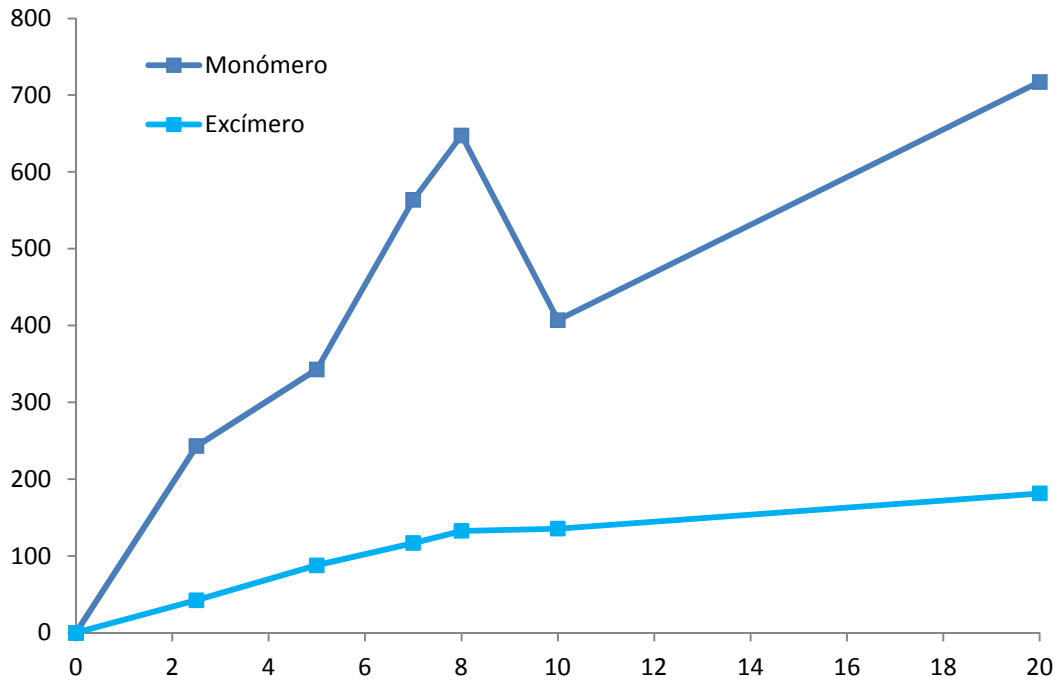


Se busca trabajar en una región de concentración en la que se aprecie linealidad (Ley de Lambert-Beer, ver página 30), en el gráfico 1 se puede apreciar que la emisión de fluorescencia decae al llegar a 10 μM de concentración de pireno. Es un comportamiento esperado; al aumentar la concentración, llega un punto en que las moléculas emisoras de luz interfieren con su propia emisión y la intensidad de la fluorescencia disminuye (Ver página 45).

La región de interés al tomar en cuenta el efecto de la concentración del fluoróforo en la intensidad de emisión es de 2.5 – 8 μM de concentración.

A continuación, se muestra el gráfico con la intensidad de energía de excitación para el monómero y excímero al variar la concentración de fluoróforo usando los mismos puntos.

Gráfico 2. Concentración del fluoróforo contra intensidad de excitación.



En ambos espectros, se observa una caída en la señal de excitación a 10 μM de concentración de pireno, así como en la intensidad de emisión (Gráfico 1).

En los gráficos 1 y 2 se aprecia posible comportamiento lineal de 2.5 hasta 8 μM , por lo que se realizó el cálculo para corroborar la tendencia lineal de emisión de luz para los espectros de emisión y excitación de monómero y excímero en un rango de 2.5 – 8 μM . (Gráficos 3, 4 y 5).

Gráfico 3. Concentración del fluoróforo vs intensidad de emisión. Tendencia.

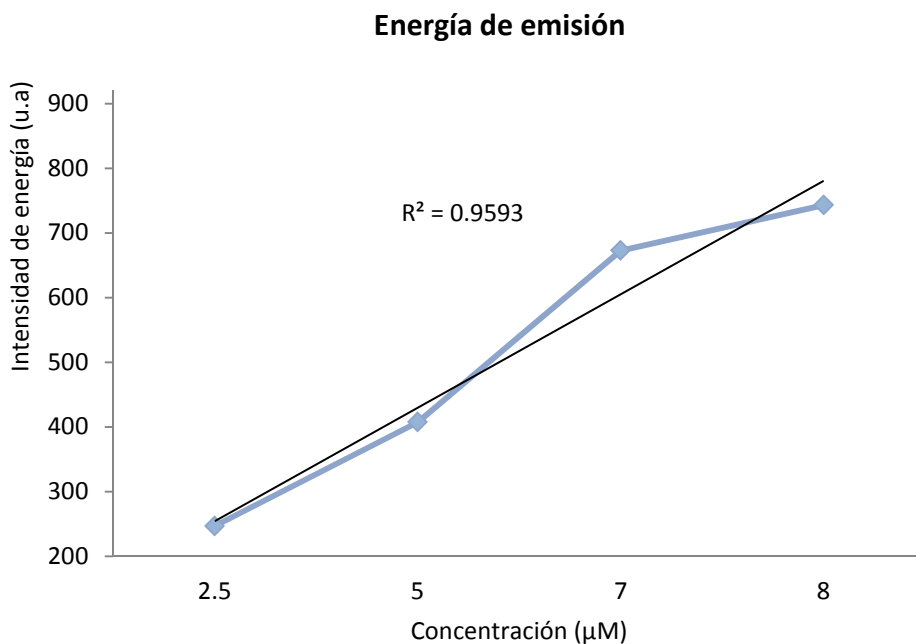
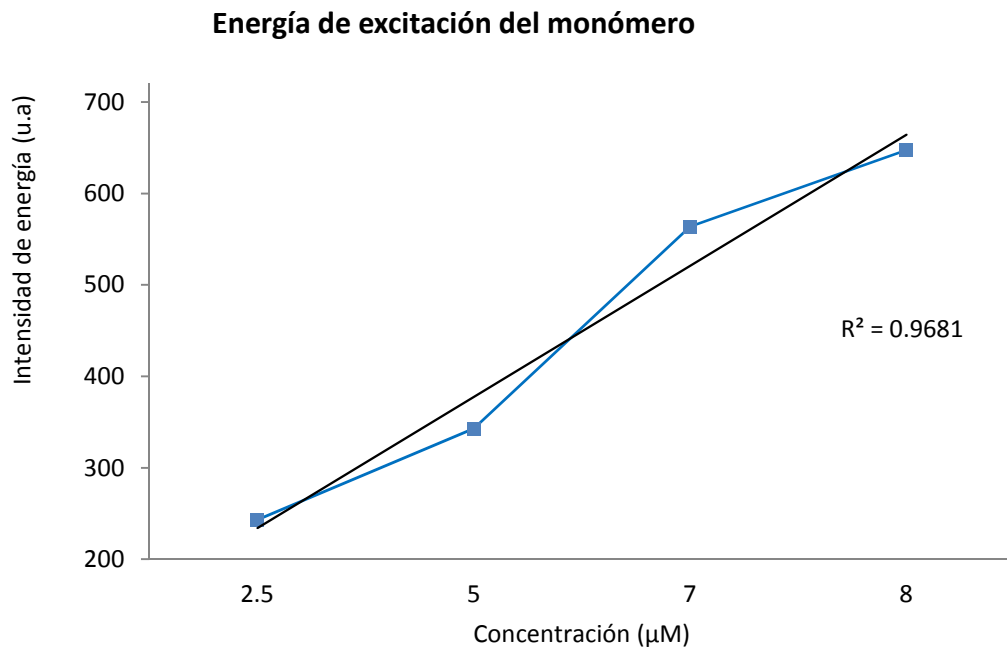
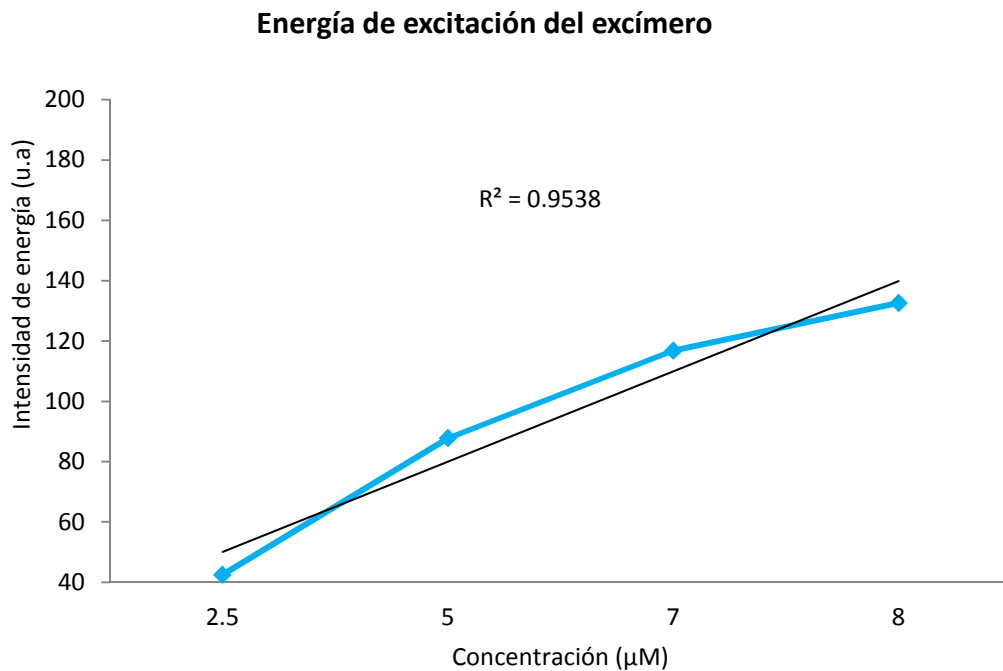


Gráfico 4. Pireno. Concentración contra intensidad de excitación. Monómero. Tendencia.



Se muestra en todas las gráficas el valor del coeficiente de determinación lineal (r^2), parámetro usado para saber si los datos se ajustan a una recta. Todos los valores son mayores a 0.9, por lo que se confirma el ajuste¹⁰⁰.

Gráfico 5. Concentración fluoróforo contra intensidad de excitación. Excímero. Tendencia



¹⁰⁰ Valor máximo para r^2 es 1.0

Confirmada la linealidad de la región, cualquier concentración que caiga dentro de la misma, es decir, entre 2.5 y 8 μM , será apropiada para realizar los experimentos subsiguientes. Se seleccionó 5 μM de pireno por caer dentro de la región de tendencia lineal.

3.2 Determinación de interacción específica entre el fluoróforo y amina de referencia

El método experimental debe verificar las interacciones específicas entre la molécula de dióxido de carbono y los aminoácidos seleccionados, por lo que cualquier otra interacción sería una interferencia.

Para verificar que no exista interacción entre el fluoróforo y la amina de referencia, se obtuvieron los espectros del excímero y el monómero para cada una de las concentraciones a las que se planea trabajar.

Se seleccionó un rango de 2.5 - 50 μM de MEA para realizar dichos espectros, además de una muestra que sólo contenía pireno (para comprobar que no existan interacciones específicas pireno-pireno a esa concentración). Las muestras se realizaron con 5 μM de pireno, como fluoróforo sensor, calculando el CEM para un rango de 300-380 nm.

Tabla 8. Interacciones pireno-MEA.

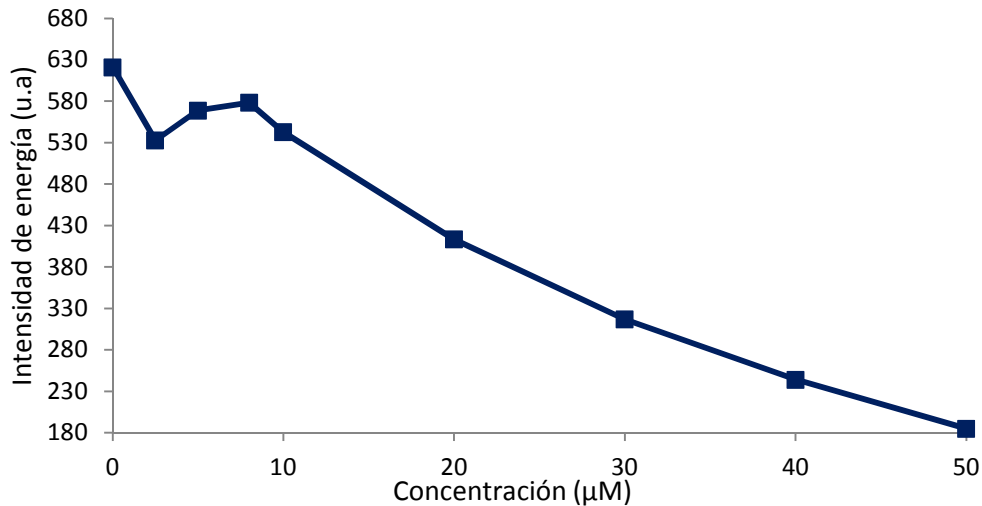
Concentración de MEA (μM)	CEM (nm)		ΔCEM (nm)	Interacción específica
	Monómero	Excímero		
0	326.43	326.30	-0.14	No
2.5	326.42	325.95	-0.47	No
5	326.40	325.73	-0.67	No
8	326.44	325.73	-0.75	No
10	326.53	325.69	-1.12	No
20	326.32	325.41	-1.08	No
30	326.20	325.25	-1.44	No
40	326.09	324.76	-1.33	No
50	326.10	324.51	-1.59	No

Los valores experimentales obtenidos como CEM de monómero y excímero se compararon para mostrar interacción específica (Ver pag. 50). Ninguna interacción fue mayor a 2 nm, por lo que no se presenta interacción específica entre el fluoróforo y la amina de referencia. Estos resultados nos indican que el fluoróforo seleccionado y la amina de referencia son adecuados para realizar la validación del método experimental, por lo que se procede a establecer una concentración adecuada de MEA en este rango en el que no existe interacción específica entre la amina y el fluoróforo sensor.

3.3 Determinación de la concentración adecuada para la amina de referencia

Para determinar la concentración adecuada de MEA se realizaron espectros de emisión y excitación de monómero y excímero, graficando la intensidad de la energía contra la concentración. Los espectros se realizaron a muestras que contenían 5 μM de pireno, variando la concentración de MEA en un rango de 0 - 50 μM , obteniendo los resultados mostrados en el gráfico 6.

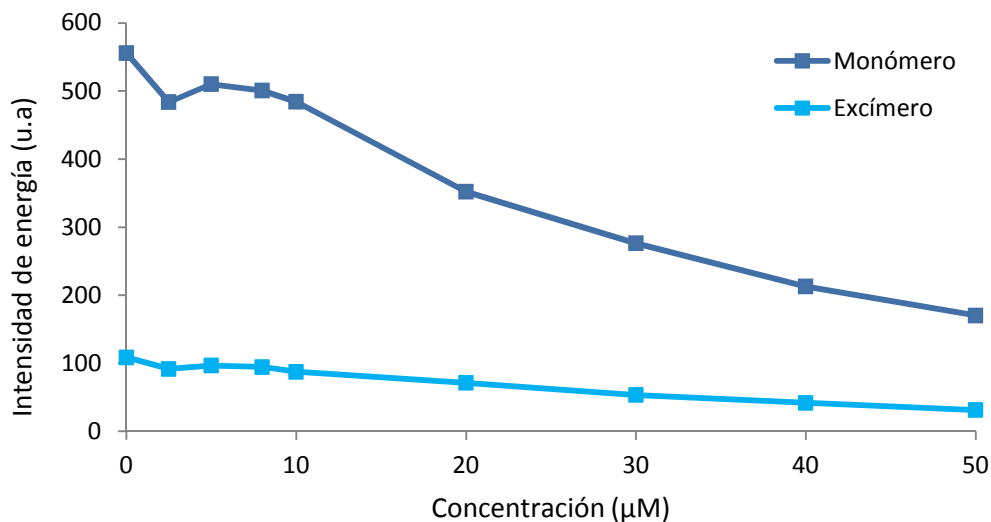
Gráfico 6. Concentración de la MEA vs intensidad de emisión.



Se observa que la intensidad de emisión sin MEA es mayor y conforme se aumenta la concentración de MEA se pierde intensidad, es decir, la adición de la amina produce disminución en la intensidad de energía medida. Se trata de un comportamiento esperado, amortiguación de la fluorescencia, donde las moléculas de MEA absorben la luz antes que llegue a las moléculas de fluoróforo (Ver página 40).

Después de 10 μM se observa el mayor decaimiento, se obtuvieron los espectros del monómero y excímero para corroborar este comportamiento.

Gráfico 7. Concentración la MEA vs intensidad de excitación.



Los resultados, gráfico 7, confirman que para todos los espectros hay un considerable abatimiento en la intensidad después de 10 μM de MEA.

Se busca trabajar a la máxima concentración de MEA con la menor pérdida de intensidad, por lo que se determinó que la concentración óptima a trabajar es de 10 μM de MEA por ser la mayor concentración antes de que exista una disminución importante en la intensidad de energía.

3.4 Determinación del método de adición de CO₂ a la muestra y tiempo de adición

Se probaron cinco métodos de adición de dióxido de carbono para hallar uno que favoreciera la interacción entre éste y la amina.

3.4.1 Por atmósfera de CO₂

El primer método de adición a probar fue el contacto con atmósfera de CO₂. Se prepararon muestras a 5 μM pireno y concentración variable de MEA (rango: 0 - 10 μM), exponiéndolas durante 5 min a atmósfera de CO₂ y empleando agitación sónica durante 10 min.

Se realizaron los espectros correspondientes y se realizó el cálculo de CEM (300-380 nm) para cada muestra, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 9. Atmósfera de CO₂, agitación sónica.

Concentración de MEA (μM)	CEM (nm)		ΔCEM (nm)
	Monómero	Excímero	
0	327.04	330.27	3.23
2.5	327.02	329.94	2.93
5	326.65	326.30	-0.35
8	326.61	326.10	-0.51
10	326.54	325.78	-0.76

Los resultados muestran interacción específica entre las moléculas de dióxido de carbono y pireno: en la muestra a la que no se añadió la amina de referencia la diferencia entre CEM del monómero y excímero muestran una diferencia mayor a 2 nm. También se observa interacción específica a 2.5 μM de MEA, pero los resultados indican que es debida a la interacción pireno-CO₂. A mayores concentraciones de MEA, los valores de ΔCEM son negativos y no muestran ninguna interacción específica.

Como la interacción favorecida con la agitación sónica, CO₂ - pireno, no es la interacción que se desea medir con el método experimental, se hizo necesario probar con otro tipo de agitación, esta vez en una incubadora.

Las muestras, 5 μM de pireno y una concentración variable de MEA (en un rango de 0 - 10 μM), fueron dejadas en atmósfera de CO₂ durante 5 min para después someterlas a agitación en incubadora a 140 rpm durante 5 min. Se añadió una muestra que contenía sólo 5 μM de pireno, con el fin de analizar si existe interacción específica entre las moléculas del fluoróforo. Se obtuvieron los respectivos espectros y se realizaron los cálculos para obtener CEM.

Tabla 10. Atmósfera CO₂ agitación en incubadora a 140 rpm.

Concentración de MEA (μM)	CEM (nm)		ΔCEM (nm)
	Monómero	Excímero	
Sin CO ₂	326.60	330.32	3.72
0	326.63	326.84	0.21
2.5	326.48	326.16	-0.32
5	326.58	327.46	-0.88
8	326.47	325.79	-0.69
10	326.48	325.81	-0.66

Se observa en los resultados interacción específica entre moléculas de pireno, pero no entre pireno-CO₂ ni a ninguna concentración de MEA. La agitación que pretendía un mayor contacto CO₂-amina, añadió energía que favoreció la formación de productos inestables (en nuestro caso, excímeros), por lo que la interacción pireno-pireno se destaca en los resultados, sin permitirnos observar la interacción que compete a nuestros fines.

3.4.2 Burbujeo con aguja

De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió buscar otro método de adición, más cercano a lo que ocurre en los procesos industriales, que favorezca la interacción MEA – CO₂: el burbujeo. Las muestras se prepararon con 5 μM de pireno y concentraciones variables de MEA (0 - 2.5 μM), en frascos de vidrio de 5 mL, a los que se les puso un tapón de clorobutilo y fueron engargoladas usando un contrasello de aluminio. Para añadir CO₂ a la muestra, se colocó una aguja hueca de acero inoxidable de 21x32, 0.8 mm de diámetro interno con un bisel de 40 mm de largo, conectada a una fuente de CO₂ mediante una manguera de silicona, la cual se introdujo en el frasco de vidrio de 5 mL (Véase Figura 42).

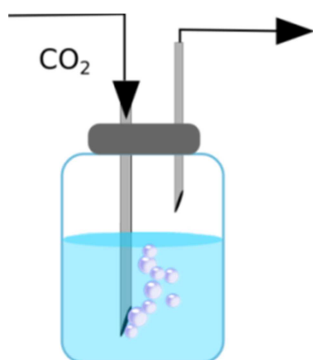


Figura 42. Sistema de burbujeo con aguja.

Las muestras se burbujearon por éste método durante 5 min, obteniendo los siguientes resultados mostrados en la tabla 11.

Tabla 11. Burbujeo con aguja. MEA variable.

Concentración de MEA (μM)	CEM (nm)		ΔCEM (nm)
	Monómero	Excímero	
Sin CO ₂	326.79	325.77	-1.02
0	326.74	326.06	-0.68
2.5	326.65	326.04	-0.60
5	326.61	325.71	-0.91
8	326.63	325.78	-0.86
10	326.59	325.66	-0.93

No se aprecia ninguna interacción específica entre el CO₂ y la amina, por lo que se decidió variar el tiempo de burbujeo. Las muestras se prepararon de la misma forma, a una concentración 10 µM de MEA, 5 µM de pireno y variando el tiempo de burbujeo desde cero hasta 60 min.

Tabla 12. Burbujeo con aguja. Tiempo variable.

Tiempo de burbujeo (min)	CEM (nm)		ΔCEM (nm)
	Monómero	Excímero	
0	326.52	325.74	-0.78
10	326.71	325.42	-1.28
15	327.07	325.80	-1.27
40	326.94	327.09	0.15
45	327.23	326.36	-0.88
60	326.23	326.54	0.31

Los resultados obtenidos muestran que el tiempo de burbujeo no tuvo efecto en la interacción deseada. No se obtuvo ninguna interacción específica, por lo que la adición de CO₂ mediante burbujeo con aguja no es un método adecuado para favorecer la interacción específica entre CO₂ y MEA.

3.4.3 Burbujeo a través de medio poroso

Se decidió aumentar el área de contacto para favorecer la interacción fluoróforo – MEA. Se ideó un sistema de burbujeo mediante un material poroso, mediante un filtro de vidrio sinterizado con capacidad para 10ml de muestra, a través del cual se hizo pasar una corriente de CO₂. El sistema se tapó con material plástico, con el fin de evitar pérdida de muestra por evaporación, teniendo cuidado de dejar un venteo para evitar el exceso de presión (Figura 43).

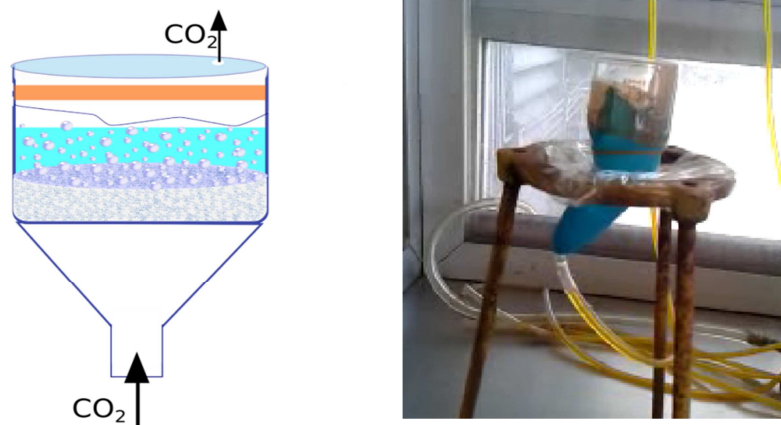


Figura 43. Sistema de burbujeo a través de material poroso.

Las muestras se prepararon a 10 µM de MEA y 5 µM de pireno, variando el tiempo (0 - 90 min) de adición de CO₂, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 13. Burbujeo a través de medio poroso. Tiempo variable

Tiempo de burbujeo (min)	CEM (nm)		ΔCEM (nm)
	Monómero	Excímero	
0	326.44	325.68	-0.77
5	326.74	326.55	-0.19
10	326.54	325.82	-0.73
15	326.60	325.95	-0.65
20	326.69	325.71	-0.98
30	326.66	329.45	2.79
60	326.63	326.31	-0.32
90	325.78	327.23	1.45

Los resultados muestran interacción específica entre CO₂ y la amina de referencia a 30 min de burbujeo mediante este sistema. Este fue un resultado clave, que nos dio la pauta para validar el procedimiento de adición de CO₂.

Debido a que la interacción específica se observó a 30min y éste es un tiempo excesivo, se procedió a modificar la temperatura a la que se realiza la adición de CO₂, añadiendo modificaciones al procedimiento de burbujeo.

3.5 Método de burbujeo experimental

El método de adición de CO₂ se modificó, con la adquisición de un burbujeador de vidrio sinterizado, tamaño de poro 20 Å¹⁰¹, diámetro de 1 cm, el cual se conecta a la fuente de CO₂ mediante una manguera de silicona, introduciendo el extremo poroso en los frascos de vidrio que contienen a las muestras.

Los frascos para las muestras se cambiaron por unos más largos (8.5 cm de altura, 2.3 cm de diámetro) donde a pesar del burbujeo no existía pérdida de muestra, reteniéndose dentro de las paredes del mismo.

Se burbujearon las muestras a 100 mL/min durante 10 min, para después obtener sus respectivos espectros, cuidando siempre de mantener la temperatura a la que se realizan las mediciones.

Todas las muestras se realizaron por duplicado.

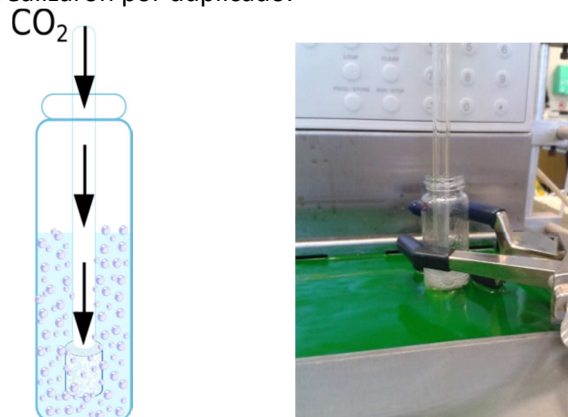


Figura 44. Sistema de burbujeo experimental.

¹⁰¹ 1 Å= 1x10⁻¹⁰ m.

3.5.1 Determinación de la temperatura a la que se realizará el procedimiento

Los procesos industriales basados en aminas, operan sus absorbedores de CO₂ en un intervalo que se encuentra entre 40 °C - 60 °C (Ver pag. 31), por lo que se determinó variar la temperatura en un rango de 25 °C a 60 °C con el fin de propiciar la interacción CO₂ – amina acortando los tiempos de burbujeo.

Se prepararon 10 mL de cada muestra a 10 μM de MEA y 5 μM de pireno en frascos de vidrio, obteniendo sus respectivos espectros a cada temperatura y calculando el CEM del monómero y el excímero para cada temperatura, antes y después de realizar el burbujeo. Se espera encontrar la temperatura que favorezca la interacción específica CO₂- MEA. Los resultados se muestran en las tablas 14 y 15.

Tabla 14. Sin CO₂. Temperatura vs ΔCEM.

Temperatura (°C)	CEM (nm)		ΔCEM (nm)
	Monómero	Excímero	
25	326.91	333.87	6.95
40	326.67	326.16	-0.51
50	326.76	325.83	-0.93
60	326.83	325.91	-0.92

Tabla 15. CO₂. Temperatura vs ΔCEM.

Temperatura (°C)	CEM (nm)		ΔCEM (nm)
	Monómero	Excímero	
25	327.35	333.76	6.41
40	327.13	328.95	1.82
50	326.93	326.81	-0.13
60	327.10	326.85	-0.25

Los resultados muestran que con el método de burbujeo experimental existe interacción específica antes de añadir CO₂ a la muestra. Dicha interacción puede ser entre las moléculas de fluoróforo o entre el fluoróforo y la amina de referencia, pero ninguna de las dos es útil para el propósito que nos ocupa.

Por otro lado, los resultados a 40 °C son mucho más interesantes: antes de la adición de CO₂ la diferencia entre centros espectrales de masa es incluso negativa, lo que nos indica una disminución en las interacciones pireno – pireno, mientras que después de la adición de CO₂ se obtuvo una diferencia positiva (claro indicador de la naturaleza polar de las interacciones pireno - pireno) y muy cercana a los 2 nm, parámetro limitante para concluir que la interacción entre las moléculas es específica.

Este método de adición de CO₂ ha sido el único en que se ha observado interacción específica no deseada antes de la adición de CO₂ a la muestra a 25 °C, por lo que se consideró necesario verificar los resultados.

Se repitió el experimento por duplicado: 10 mL de cada muestra a 10 μM de MEA y 5 μM de pireno burbujeados durante 10 min con CO₂ a 100 mL/min, para las temperaturas de 25 °C y 40 °C, obteniendo sus espectros respectivos y calculando las diferencias de CEM.

Tabla 16. 25 °C y 40 °C, repetición. Temperatura vs ΔCEM.

Temperatura (°C)		CEM (nm)		ΔCEM (nm)
		Monómero	Excímero	
25	Sin CO ₂	326.86	331.24	4.38
	CO ₂	327.33	332.17	4.84
40	Sin CO ₂	326.58	326.71	0.13
	CO ₂	327.02	328.41	1.40

Los resultados obtenidos en la repetición del experimento confirman la interacción no deseada antes de la adición de CO₂ a la muestra: el nuevo sistema de burbujeo no nos permite observar las interacciones de nuestro interés a 25 °C. Esto puede explicarse por las circunstancias en que se da el método de adición experimental, el cual requirió de un laboratorio con las instalaciones adecuadas para el controlar el flujo de gases, el cual no se encuentra en el mismo edificio donde se realizan las mediciones con el espectrofluorómetro. Ya antes se había observado que la agitación favorecía interacciones no deseadas y el traslado entre ambos laboratorios originó agitación involuntaria.

Para conocer la fiabilidad de los resultados, se calculó el porcentaje de error de las mediciones (Tablas 17 y 18).

Tabla 17. 25 °C y 40 °C. Porcentaje de error del CEM del monómero.

	CEM Monómero			
	25°C		40°C	
	Sin CO ₂	CO ₂	Sin CO ₂	CO ₂
\bar{x} (nm)	326.86	327.33	326.58	327.02
s (nm)	0.24	0.17	0.11	0.14
CV (%)	0.07	0.05	0.04	0.04

Tabla 18. 25 °C y 40 °C. Porcentaje de error del CEM del excímero.

	CEM Excímero			
	25°C		40°C	
	Sin CO ₂	CO ₂	Sin CO ₂	CO ₂
\bar{x} (nm)	331.24	332.17	326.71	328.41
s (nm)	3.07	1.85	1.23	1.22
CV (%)	0.93	0.56	0.38	0.37

Las tablas 17 y 18 muestran que el mayor error en los datos fue de 0.93 % correspondientes a los espectros de excitación de excímero. El porcentaje de error no es mayor al 1 %, por lo que se concluye que las variaciones son mínimas y atribuibles a la gran sensibilidad de la técnica.

Teniendo la seguridad los resultados obtenidos, se decidió realizar los siguientes experimentos a 40 °C. Al establecer una nueva temperatura, es necesario volver a determinar la concentración adecuada de fluoróforo, la amina y el tiempo de adición de CO₂, por lo que se procedió a realizar los experimentos correspondientes.

3.5.2 Determinación de la concentración del fluoróforo a 40 °C

Es importante trabajar a una concentración dentro de una región de comportamiento lineal para el fluoróforo. Se realizaron los espectros correspondientes para las concentraciones de 5 – 10 µM, todos por duplicado, y se graficaron los resultados obteniendo el coeficiente de determinación lineal (r^2). (Gráficos 8 - 10).

Gráfico 8. Pireno 40 °C. Concentración contra intensidad de emisión.

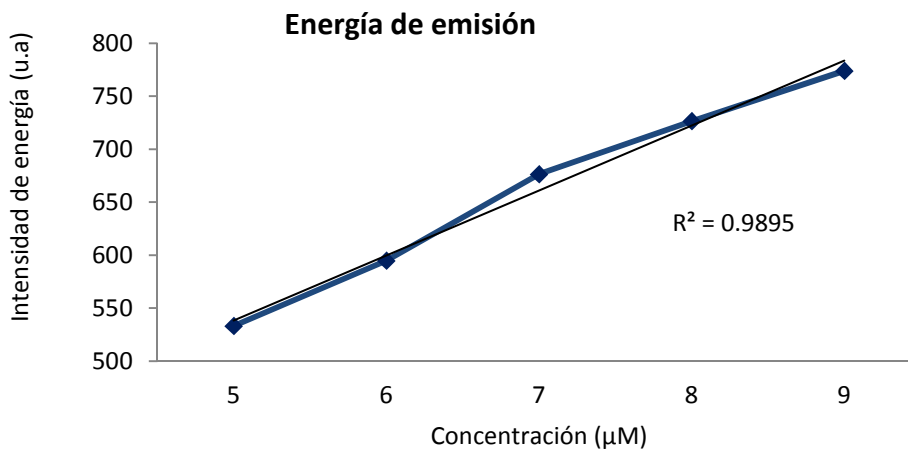


Gráfico 9. Pireno 40 °C. Concentración contra intensidad de excitación. Monómero, Tendencia.

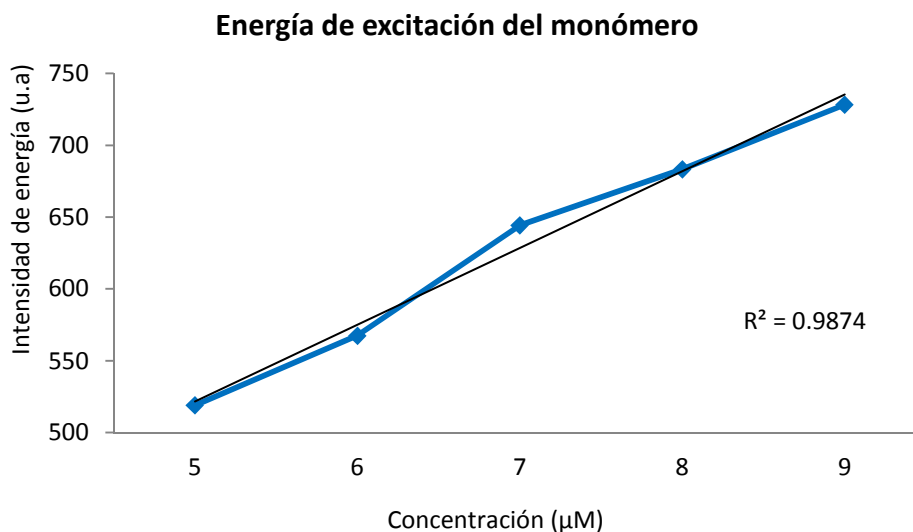
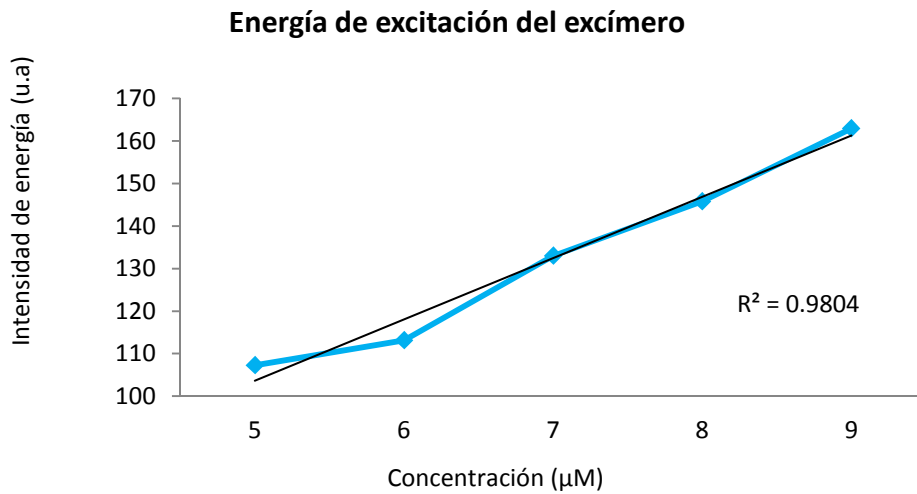


Gráfico 10. Pireno 40 °C. Concentración contra intensidad de excitación. Excímero. Tendencia.

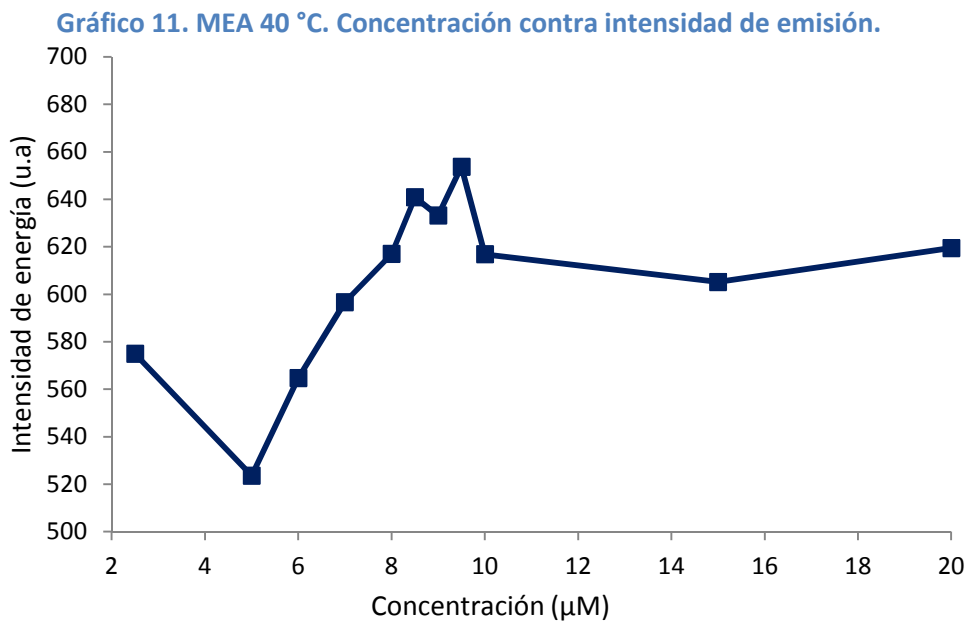


Las gráficas tienen un coeficiente de determinación lineal mínimo de 0.98, por lo que se puede afirmar que se ajustan a un comportamiento lineal y se puede trabajar a cualquier concentración que caiga en esa región.

3.5.3 Determinación de la concentración adecuada para la amina de referencia a 40 °C

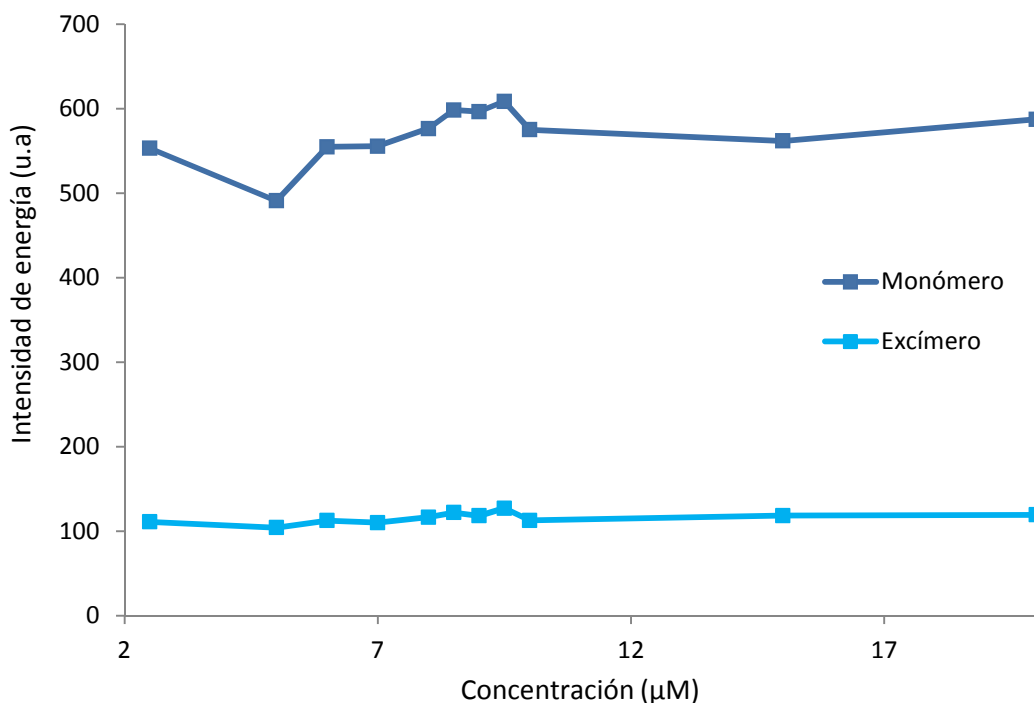
Una vez determinada la concentración del fluoróforo, que fue 6 µM se procedió a determinar la concentración adecuada de la amina de referencia.

Se realizaron los espectros de emisión y excitación para el monómero y excímero en el rango de 2.5 - 20 µM de concentración de MEA a 40 °C, para conocer el efecto del cambio de concentración de MEA en la intensidad de energía del fluoróforo, el cual se agregó en una concentración de 6 µM (que cae dentro de la región de comportamiento lineal previamente comprobada). Todos los experimentos se realizaron por duplicado, obteniendo los gráficos 11 y 12.



A 5 μM de MEA se observa la menor emisión de fluorescencia, la cual aumenta hasta 9.5 μM de MEA, la que parece ser que la concentración más idónea para trabajar.

Gráfico 12. MEA 40 °C. Concentración vs intensidad de excitación.



El comportamiento observado en la emisión de fluorescencia se repite para la energía de excitación. A partir de 10 μM la energía de excitación decrece para el monómero, mientras la gráfica del excímero presenta un comportamiento más uniforme.

Parece ser que la concentración más adecuada será de 9.5 μM de MEA, para conocerlo se calculó la diferencia de CEM teniendo como objetivo verificar que a la concentración elegida la amina no presente interacción específica con el fluoróforo. (Tabla 19)

Tabla 19. Interacciones pireno-MEA.

Concentración de MEA (μM)	CEM (nm)		ΔCEM (nm)	Interacción específica
	Monómero	Excímero		
2.5	326.53	326.14	-0.38	No
5	326.70	329.04	2.34	Sí
6	326.59	327.64	1.05	No
7	326.70	327.34	0.64	No
8	326.78	327.46	0.68	No
8.5	326.79	327.15	0.36	No
9	326.76	326.46	-0.30	No
9.5	326.74	327.58	0.85	No
10	326.81	326.81	0.00	No
15	326.89	328.91	2.02	Sí
20	326.80	326.51	-0.28	No

En efecto, a 9.5 μM de concentración de MEA no se presenta interacción específica entre la amina de referencia. La tabla 19 nos muestra un interesante resultado a 10 μM de MEA, en donde la diferencia de centro espectrales de masas es cero. Los resultados negativos nos indican interacción no polar, los resultados positivos evidencian el carácter polar de las mismas, pero exactamente cero es un valor que apunta a la inexistencia de interacción alguna (específica o no). A 10 μM de la amina de referencia, la intensidad es baja, pero no la menor. Puesto que es la concentración que no presenta interacción alguna entre moléculas se decidió que ésta era la mejor concentración para realizar los experimentos sucesivos.

3.5.4 Determinación del tiempo de adición de dióxido de carbono a 40 °C

Para determinar el tiempo de adición óptimo, las muestras con 10 μM de MEA y 6 μM de pireno, se sometieron a un flujo de 100 mL/min de dióxido de carbono con el método de burbujeo experimental, variando el tiempo de adición de 1 - 20 min. Los experimentos se realizaron a 40 °C por duplicado, obteniendo sus correspondientes espectros y calculando la diferencia de CEM. (Tabla 20)

Tabla 20. Interacciones a 40°C variando tiempo de adición de CO₂.

Tiempo de adición de CO ₂ (min)	CEM (nm)		ΔCEM (nm)
	Monómero	Excímero	
1	327.01	328.13	1.12
5	327.03	327.86	0.84
10	327.11	328.10	0.99
15	327.20	329.68	2.48
20	327.25	328.892	1.68

Los resultados muestran interacción específica sólo a 15 min de adición de CO₂. Para comprobar que esta interacción no fuera debida a las moléculas de CO₂- pireno, se burbujeó con el método antes descrito CO₂ durante 15 min a través de vidrio poroso muestras que contenían pireno a una concentración 6 μM . Las muestras se burbujearon en las mismas condiciones con nitrógeno como gas inerte, todas por duplicado a 40°C, obteniendo los resultados mostrados en la tabla 21.

Tabla 21. Interacciones pireno-CO₂ a 40 °C.

	CEM (nm)		ΔCEM (nm)
	Monómero	Excímero	
Inicial	326.72	328.55	1.83
Nitrógeno	326.99	328.90	1.90
Dióxido de carbono	327.20	327.33	0.13

Los resultados muestran que a 40 °C el fluoróforo interactúa consigo mismo y con las moléculas de nitrógeno sin que dicha interacción sea específica. La interacción específica CO₂- fluoróforo a 40 °C quedó descartada.

Para mostrar con mayor claridad las interacciones entre moléculas, se resumen los sistemas evaluados a 40 °C y las diferencias de CEM en la tabla 22.

Tabla 22. Interacciones 40 °C.

Sistema	CEM (nm)		ΔCEM (nm)
	Monómero	Excímero	
Pireno-Pireno	326.72	328.55	1.83
Pireno-MEA	326.81	326.81	0.00
Pireno- CO ₂	327.20	327.33	0.13
Pireno-MEA-CO ₂	327.20	329.68	2.48

A 40 °C, 10 μM de MEA y 6 μM de pireno, burbujeados durante 15 min con CO₂ a 100 mL/min, es posible observar interacción específica entre la amina de referencia y el gas que nos interesa captar. Dado que no existe interacción específica en ninguno de los otros casos, se acepta que la interacción específica que se muestra en el sistema pireno-MEA-CO₂ es la correspondiente a la amina de referencia y dióxido de carbono, por lo que estas son las condiciones adecuadas para establecer nuestro método experimental (Ver sección 2.2.5).

3.5.5 Resultados del método experimental establecido

Validado el método experimental con la amina de referencia, se realizó a las temperaturas de 25 °C y 40 °C a once aminoácidos polares y no polares con carga, es decir, ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), glicina (Gly), glutamina (Gln), histidina (His), lisina (Lys), triptófano (Trp) y valina (Val), todos con una pureza de al menos 98 %. (Ver sección 2.1.1).

Los valores de ΔCEM antes y después de la adición de dióxido de carbono para ambas temperaturas se muestran en las tablas 23 – 26. Las interacciones específicas encontradas se remarcan en negro.

Todas las muestras se realizaron por duplicado y se obtuvo el porcentaje de error. (Gráficos 15 y 16).

Tabla 23. 25 °C Aminoácidos

		Aminoácidos											
		MEA	Asp	Glu	Ala	Arg	Asn	Gly	Gln	His	Lys	Trp	Val
CEM (nm)	Monómero	327.06	326.88	326.97	326.91	326.83	326.98	326.88	326.84	326.72	326.99	327.14	326.84
	Excímero	333.22	327.83	330.49	331.57	329.05	331.16	327.89	329.39	326.71	330.50	333.02	330.38
Δ CEM (nm)		6.16	0.95	3.52	4.66	2.22	4.18	1.01	2.55	-0.01	3.52	5.87	3.53

Tabla 24. 25 °C Aminoácidos y CO₂

		Aminoácidos + CO ₂											
		MEA	Asp	Glu	Ala	Arg	Asn	Gly	Gln	His	Lys	Trp	Val
CEM (nm)	Monómero	327.39	327.39	327.41	327.38	327.30	327.33	327.36	327.23	327.28	327.38	327.36	327.28
	Excímero	331.38	330.08	330.15	331.10	328.56	330.17	330.28	328.05	327.80	331.21	330.23	328.00
Δ CEM (nm)		3.98	2.69	2.73	3.72	1.25	2.84	2.92	0.82	0.51	3.83	2.87	0.72

A 25 °C, observa interacción específica entre el fluoróforo y MEA, ácido glutámico (Glu), alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), glutamina (Gln), lisina (Lys), triptófano (Trp) y valina (Val).

También se observa interacción específica entre CO₂ y MEA, ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), alanina (Ala), asparagina (Asn), glicina (Gly), lisina (Lys) y triptófano (Trp).

Los aminoácidos para los que se observó interacción específica al añadir CO₂, pero que a su vez mostraron interacción específica previa con el fluoróforo quedan descartados, pues la diferencia de centros espectrales de masas observada pudo deberse a la interacción aminoácido – pireno en vez de dióxido de carbono – aminoácido.

Descartados ácido glutámico (Glu), alanina (Ala), asparagina (Asn), lisina (Lys) y triptófano (Trp), a 25 °C se observa interacción específica con CO₂ para el ácido aspártico (Asp) y glicina (Gly).

Tabla 25. 40 °C Aminoácidos

		Aminoácidos											
		MEA	Asp	Glu	Ala	Arg	Asn	Gly	Gln	His	Lys	Trp	Val
CEM (nm)	Monómero	326.81	327.27	327.16	326.76	326.89	326.92	327.30	326.84	327.05	327.32	327.30	326.94
	Excímero	326.81	331.25	329.81	326.84	327.32	327.40	331.20	327.41	330.03	329.72	327.57	328.37
Δ CEM (nm)		0.00	3.98	2.65	0.08	0.43	0.48	3.90	0.56	2.97	2.40	0.27	1.44

Tabla 26. 40 °C Aminoácidos y CO₂

		Aminoácidos + CO ₂											
		MEA	Asp	Glu	Ala	Arg	Asn	Gly	Gln	His	Lys	Trp	Val
CEM (nm)	Monómero	327.20	327.77	327.67	327.32	327.34	327.34	327.64	327.27	327.41	327.70	327.64	327.16
	Excímero	329.59	331.38	328.90	329.49	329.04	328.24	329.48	328.86	330.04	329.55	328.24	326.54
Δ CEM (nm)		2.39	3.61	1.23	2.17	1.70	0.90	1.85	1.59	2.64	1.85	0.60	-0.61

A 40 °C se observa interacción específica entre fluoróforo y ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), histidina (Hys) y lisina (Lys). Así mismo, se observa interacción específica al añadir CO₂ al sistema para MEA, ácido aspártico (Asp), alanina (Ala) e histidina (Hys). Ácido aspártico (Asp) e histidina (Hys) fueron descartados, la interacción específica observada en el sistema aminoácido – CO₂ – fluoróforo pudo ser debida a la previamente obtenida en el sistema fluoróforo –aminoácido.

Los resultados a 40 °C indican que la interacción específica con la molécula de CO₂ existe para la amina de referencia usada para validar el método experimental y para alanina (Ala).

Sara Carolina Huerta Guerrero

Gráfico 13. % Error Aminoácidos 25 °C

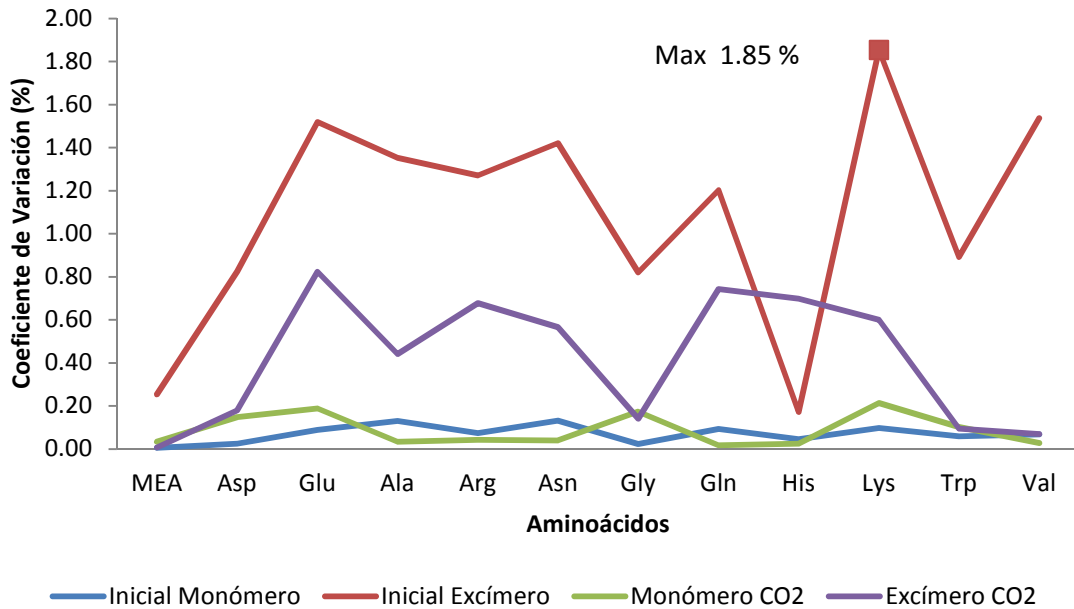
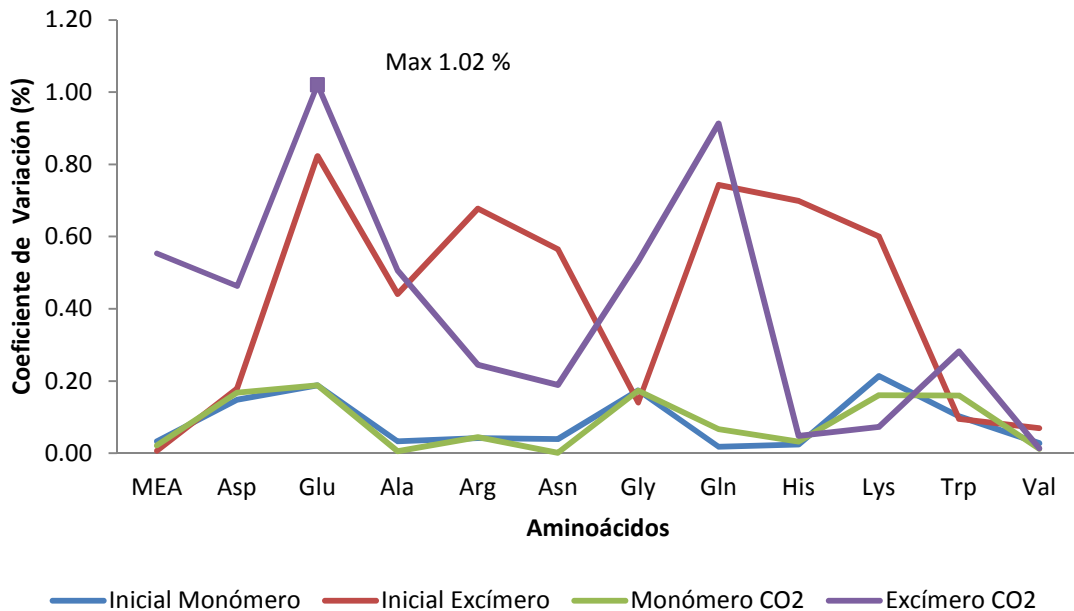


Gráfico 14. % Error Aminoácidos 40 °C



Los gráficos 16 y 17 contienen los resultados obtenidos al calcular el porcentaje de error en las mediciones, los cuales muestran un error máximo de 1.85 % a 25 °C y 1.02 % a 40 °C. Se trata de un error menor al 2 %, por lo que podemos concluir que el método experimental es robusto y la variabilidad de los datos es aceptable.

Los aminoácidos que mostraron interacción específica con CO₂, de acuerdo a la diferencia de CEM, se enlistan en la tabla 27, siendo estos los mejores captosres de CO₂.

Tabla 27. Aminoácidos que presentan interacción específica con CO₂

25 °C	40 °C
Ácido Aspártico	Alanina
Glicina	

Conclusiones

Se logró desarrollar un método experimental que aprovecha la espectrofluorometría para evaluar la interacción entre biomateriales y CO₂, proporcionando una herramienta para la rápida selección de aminoácidos captosres de CO₂. El método experimental desarrollado fue validado usando como control monoetanolamina (MEA), ya que es el grupo amino de los aminoácidos el que los hace candidatos como biomateriales captosres de CO₂. Para conocer el error del método desarrollado, se calculó el coeficiente de variación, siendo el máximo obtenido 1.85 %, por lo que se considera que el método obtenido es confiable.

En la determinación de las condiciones experimentales del método, se estableció la concentración adecuada de fluoróforo y del aminoácido, así como el método de adición de CO₂ y la temperatura de operación que favorece las interacciones deseadas a 40°C. Esta temperatura coincide con las condiciones de operación reportadas de los absorbedores que trabajan con aminas.

De los aminoácidos evaluados con el método experimental, mostraron interacción específica con CO₂ a 25 °C ácido aspártico y glicina, así como alanina a 40 °C. La interacción específica con las moléculas de dióxido de carbono se obtuvo midiendo la diferencia de centros espectrales de masas del fluoróforo sensor.

Los aminoácidos que mostraron interacción específica con dióxido de carbono, son los mejores candidatos para desarrollar un proceso a escala industrial. El método experimental desarrollado nos indica las condiciones de operación que serían necesarias para las pruebas piloto, por lo que se concluye que los objetivos de esta tesis se han cumplido.

Bibliografía

1. Aburto J., Le Borgne S. *Selective Adsorption of Dibenzothiophene Sulfone by an Imprinted and Stimuli-Responsive Chitosan Hydrogel*. *Macromolecules*. 2004; (37) 2938-2943.
2. Berg. J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. *Biochemistry*. 5ta ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2002. Pags. 83-100.
3. Brock, Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. *Biología de los Microorganismos*. 10^a ed. Madrid: Pearson-Prentice Hall, 2003. Pags. 958-971.
4. Cerón Camacho R. *Espectroscopia Aplicada a Síntesis Química*. [Presentación digital] México: Instituto Mexicano del Petróleo; 2015.
5. Dewar J. S., Dougherty R. C. *Teoría de las Perturbaciones de los Orbitales Moleculares en Química Orgánica*. Barcelona: Reverté; 1980.
6. Dovale T. *Air Quality Control Siemens Carbon Capture Technology*. Siemens Energy Inc. 2010.
7. Figueroa J. D, Fout T, Plasynski S, Mcllvried H, Srivastava R.D. *Advances in CO₂ capture technology—The U.S. Department of Energy's Carbon Sequestration Program*. *International Journal of Greenhouse Gas Control*. 2008 (2): 9-20.
8. Garduño R. *¿Qué es el efecto invernadero?* En Martínez J, Fernández A, Osnaya P. *Cambio Climático: Una Visión Desde México*. 1^a Ed. D.F.: Instituto Nacional de Ecología. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2004.
9. Global Carbon Capture and Storage Institute. *CO₂ Capture Technologies. Post Combustión Capture*. Canberra, 2012.
10. Harris D. C. *Análisis Químico Cuantitativo*. 2da Ed. Barcelona: Reverté S. A.; 2001. Pags. 495-622.
11. *Instructions for the Operation of the Nicolet 380 FT-IR*. Thermo Electron Scientific Instruments LLC. Madison, WI USA. 2009.
12. Jaramillo V.J. *El Ciclo Global del Carbono*. En Martínez J, Fernández A, Osnaya P. *Cambio Climático: Una Visión Desde México*. 1^a Ed. D.F.: Instituto Nacional de Ecología. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2004.
13. Kremer H. *Carbon Capture and Storage*. Siemens. European Future Energy Forum. 2010.
14. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3ra Ed. New York: Springer; 2006.
15. Lehninger A.L, Nelson D. L., Cox M. M. *Principios de Bioquímica*. 4ta ed. Barcelona: Omega; 2005. Pags 16-89.
16. Lifshitz C., Märk T. D. *Ionization Theory*. Academic Press; 1999. En Lindon J. C., Tranter G. E., Holmes J. L. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Academic Press; 2000.
17. Marques Dos Santos María José. *Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico Biológicas*. 2da Ed. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; 2004.
18. Martínez M. T., Moctezuma C.L. *Espectrofluorimetría*. México: Universidad Autónoma de México; 2006.
19. Millward A. R, Yaghi O. M. *Metal-Organic Frameworks with Exceptionally High Capacity for Storage of Carbon Dioxide at Room Temperature*. *Journal of the American Chemical Society Communications*. 2005; 127 (51).

20. Murillo J.A., García I., López S., Durán C., Domínguez J.M., Aburto J. *Aggregation Behaviour of Heavy Crude Oil-Ionic Liquids Solutions by Fluorescence Spectroscopy*. Energy Fuels. 2009; (23) 4584-4592.
21. Omary M. A., Patterson H. H. *Luminescence Theory*. Orono: Academic Press; 1999. En Lindon J. C., Tranter G. E., Holmes J. L. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Academic Press; 2000.
22. Pérez Montiel Héctor. *Física General*. 3ra Ed. México: Grupo Editorial Patria; 2007. Pags. 310-595.
23. Quiroga Venegas L., Acosta Milián G. *Geografía*. 1ª Ed. D.F.: ST Editorial, 2007. Pags. 83-118.
24. Romeo L.M, Bolea I. *Captura de CO₂ en procesos postcombustión*. Boletín Grupo Español Carbón. Marzo 2015; 35. 8-11.
25. SEMARNAT. *Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero 1990-2010*. 1ªEd. México: SEMARNAT. INECC, 2013. SEMARNAT.
26. Shear J. B. *Biochemical Applications of Fluorescence Spectroscopy*. Texas: Academic Press; 1999. En Lindon J. C., Tranter G. E., Holmes J. L. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Academic Press; 2000.
27. Siemens. *Carbon Capture Technology*. 2012.
28. Siemens. *Slipstream Development & Testing of Post-Combustion CO₂ Capture and Separation Technology for Existing Coal-Fired Plants*. 2011.
29. Songolzadeh M, Soleimani M, Ravanchi M.T, Songolzadeh R. *Carbon Dioxide Separation from Flue Gases: A Technological Review Emphasizing Reduction in Greenhouse Gas Emissions*. Hindawi Publishing Corporation. The Scientific World Journal. 2014 (2014): 34.
30. *Spectrofluorophotometer Manual*. Shimadzu Deutschland GmGH. Duisburg, 2008.
31. Syngenta. *Isabión® Informe Técnico*. Madrid: Syngenta Agro S.A.; 2012.
32. Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. *Microbiology. An Introduction*. 11va Ed. Boston: Ed.Pearson; 2013. Pags. 810-811.
33. Vaidya P.D, Kenig E.Y. *CO₂-Alkanolamine Reaction Kinetics: A Review of Recent Studies*. *Chemical Engineering & Technology*. 2007; 30 (11): 1467-1474.
34. Voet D. Voet J. G. *Aminoácidos. Bioquímica*. 3ra Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006. Pags. 61-77.
35. Xu G, Li L, Yang Y, Tian L, Liu T, Zhang K. *A Novel CO₂ Cryogenic Liquefaction and Separation System*. Energy. 2012; 42. 522-529.
36. Yu Ch. H, Huang Ch. H, Tan Ch. S. *A Review of CO₂ Capture by Absorption and Adsorption*. *Aerosol and Air Quality Research*. 2012; 12. 745-769.

Referencias electrónicas

1. Agrinos. *L-aminoácidos- Impacto en la Plantación*. [Página Web en Internet]. Noruega: Agrinos [Consulta 30 de junio del 2015]. Disponible en: [http://mx.agrinos.com/es/L-amino%C3%A1cidos impacto en la plantaci%C3%B3n](http://mx.agrinos.com/es/L-amino%C3%A1cidos%20impacto%20en%20la%20plantaci%C3%B3n)
2. Aker. *Aker Clean Carbon*. Noruega. 2010. [Consulta 26 de noviembre del 2015]. Disponible en: www.akercleancarbon.com

3. Carrera de Especialista en Dermatología. *Métodos Auxiliares Diagnósticos en Dermatología*. Argentina; Facultad de Ciencias Médicas de la UNCUYO; 2008. Consulta 6 de septiembre del 2015]. Disponible en:
http://www.fcm.uncu.edu.ar/medicina/posgrado/dermatologia/teoricos/Metodos_diagnostico.pdf
4. Carrión M. *Efecto Invernadero Natural*. [Blog en internet]. El blog de Mónica en Agustinas. [Consulta 19 de octubre del 2015]. Disponible en:
<http://agustinasnaturales.webnode.es/album/tema-1/efecto-invernadero-natural-2-jpg/>
5. Chemistry 125. *MO Interactions (HOMO/LUMO)*. [Página Web en Internet]. New Haven: Yale University; 2011. [Consulta 1 de septiembre de 2015]. Disponible en:
<https://webpace.yale.edu/chem125/125/quantum/homolumo/homolumo.htm>
6. Clínica Benzaquén. *Luz de Wood*. [Página Web en Internet]. Málaga. [Consulta 6 de septiembre del 2015]. Disponible en:
<http://www.clinicabenzaquen.com/luz-de-wood.html>
7. Clínica de la piel. *Procedimientos Auxiliares de Diagnóstico en Dermatología*. [Página Web en Internet]. Caracas. [Consulta 6 de septiembre del 2015]. Disponible en:
<http://www.clinicadelapiel.com.ve/diagnostico.html>
8. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. *pH y Equilibrios Ácido-Base. 3. Aminoácidos. Propiedades Ácido-Base*. [Open Course Ware de la Universidad de Salamanca en Internet]. Salamanca: Universidad de Salamanca; 2013 [Consulta 22 de junio del 2015]. Disponible en:
http://ocw.usal.es/ciencias-biosanitarias/bioquimica-ph-equilibrios-acido-2013-base/contenidos/3%20AminoacidosPropiedadesAcidoBase_2012.pdf
9. Departamento de Química-Física. *Espectroscopia Ultravioleta/Visible (U/V)*. [Página Web en Internet]. España: Universidad de Granada [Consulta 7 de abril del 2015]. Disponible en:
http://www.ugr.es/~olopez/estruct_macromol/UV_V/UV_V.pdf
10. Departamento de Química-Física. *Forma de las bandas. Principio de Franck Condon. Espectroscopia UV-Visible*. [Página Web en Internet]. Cuba: Universidad de La Habana; 2012. [Consulta 7 de abril 2015]. Disponible en:
http://www.fq.uh.cu/dpto/%23qf/docencia/pregrado/estruc_2/uv/descargas/uv_2.pdf
11. Departamento de Química-Física. *Introducción a las Espectroscopias de Absorción*. [Página Web en Internet]. Cuba: Universidad de La Habana; 2012. [Consulta 8 de junio del 2015]. Disponible en:
http://www.fq.uh.cu/dpto/%23qf/docencia/pregrado/estruc_2/curso_08_09/1_1_Introduccion.pdf
12. Eldred S.M. *BP Mix of Toxins Soaked Up by Wet Skin*. [Página web en Internet]. Discovery News; 19 de abril del 2012. [Consulta 6 de septiembre del 2015]. Disponible en:
<http://news.discovery.com/earth/corexit-bp-120419.htm>
13. FEDNA. *Aminoácidos de origen industrial*. [Página Web en Internet]. España: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal [Consulta 22 de junio del 2015]. Disponible en:
http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/amino%C3%A1cidos-de-origen-industrial
14. Gias Uddin, Zafrul Azam. *A Novel Oligo-DNA Probe Carrying Non-nucleosidic Silylated Pyrene Derivatives: Synthesis and Excimer Forming Ability*. American Journal of

- Biochemistry and Molecular Biology: 4 de octubre del 2012. [Consulta 1 de octubre del 2015]. Disponible en:
<http://scialert.net/abstract/?doi=ajbmb.2013.175.181>
15. Hernández Ramirez R. *Tecnologías de Captura de CO₂. Análisis de las Tecnologías de Reducción Efectiva las Emisiones de CO₂ en Plantas de Producción de Potencia*. Universidad de Sevilla. 2007. [Consulta 14 de diciembre del 2015]. Disponible en:
<http://bibing.us.es/proyectos/abreproy/4355/fichero/ANALISIS+DE+LA+TECNOLOGIA+DE+REDUCCION+EFFECTIVA+DE+EMISIONES+DE%25252F3.+TECNOLOGIA+DE+CAPTUR+A+DE+CO2.pdf>
 16. McMullen R. L., Chen S., Moore D. J. *Fluorescencia de los Tejidos Queratinosos*. Int. J. Morphol. [Internet]. 2012. [Consulta 6 de septiembre del 2015]. Disponible en:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022012000300032
 17. Navas Méndez J. Departamento de Biología Molecular. *Bioquímica Estructural y Metabólica. Tema 2. Aminoácidos*. [Open Course Ware de la Universidad de Cantabria en Internet] Cantabria: Universidad de Cantabria; 2011 [Consulta 22 de junio del 2015]. Disponible en:
<http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/bioquimica-estructural-y-metabolica/materiales-de-clase/Tema%202.%20Aminoacidos.pdf>
 18. Organic Chemical Industry Integrated Pollution and Prevention Control. *European Commission Reference Document on Best Available Techniques in the Large Volume*. 2003. [Consulta 17 de febrero del 2015]. Disponible en:
http://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/BREF/lvo_bref_0203.pdf
 19. Profesor en Línea. *Ciclo del Carbono*. [Página web en Internet]. Santiago, Chile: Querelle y Cia Ltda. [Consulta 18 de octubre del 2015]. Disponible en:
www.profesorenlinea.cl
 20. Sherburne M. *UF Researchers Look Into Salamanders for Human Wound Scarring Clues*. [Página web en Internet]. Florida: Sun Coast News; 9 de octubre de 2014. [Consulta 17 de septiembre del 2015]. Disponible en:
<http://www.suncoastnews.com/su/list/pasco-press/uf-researchers-look-into-salamanders-for-human-wound-scarring-clues-20141009/>
 21. Suárez C. *Análisis Capilar. Equipos de diagnóstico*. [Presentación en Internet]. Islas Canarias: IES Cruz de Piedra; 2013. [Consulta 6 de septiembre del 2015]. Disponible en:
<http://es.slideshare.net/chussm/analisis-capilar-15923989>
 22. Twarita Chakraborty. *Fluorescence Spectroscopy: History, Principle and Application – Part-I*. ReseaPro. [Blog en Internet]. 13 de septiembre del 2013. [Consulta 28 de septiembre del 2015]. Disponible en:
<http://blog.reseapro.com/2013/09/fluorescence-spectroscopy-history-principle-and-application/>
 23. Vekshin, Nikolai. (1991). *Transformation of the excitation energy in excimers and exciplexes of aromatic hydrocarbons*. Journal of Applied Spectroscopy. 1991. 54. 17-22. 10.1007/BF00659782. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/226724803_Transformation_of_the_excitation_energy_in_excimers_and_exciplexes_of_aromatic_hydrocarbons

ANEXOS

I. Emisiones de CO₂ en México

Los cálculos de emisiones de GEI se realizan para seis categorías en el INEGEI: Energía; Procesos Industriales; Agricultura; Uso del Suelo, Cambio del Uso del Suelo y Silvicultura (USUCUSS); Desechos y Solventes. En el caso de México, no se presentaron resultados para la categoría de Solventes, pues ésta sólo emite gases precursores de ozono (O₃).

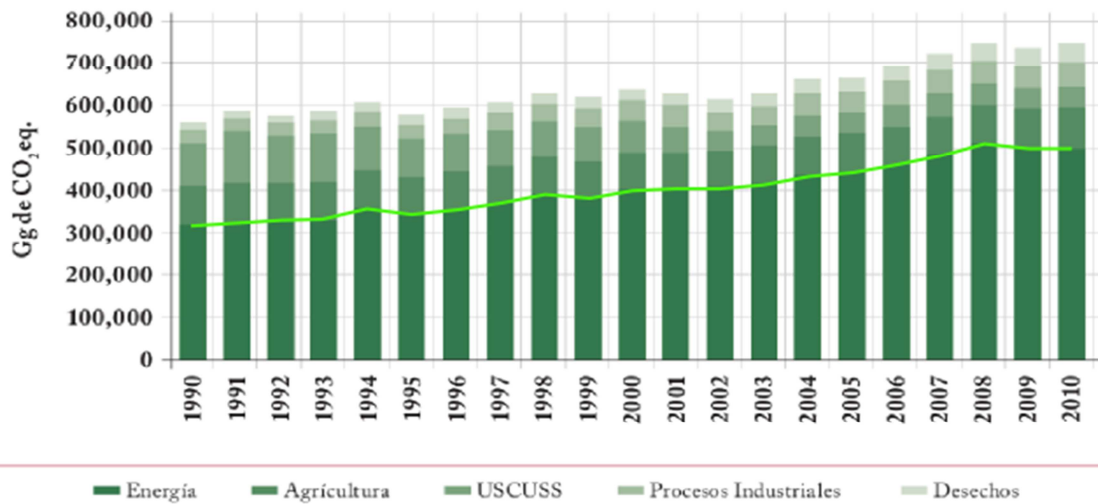
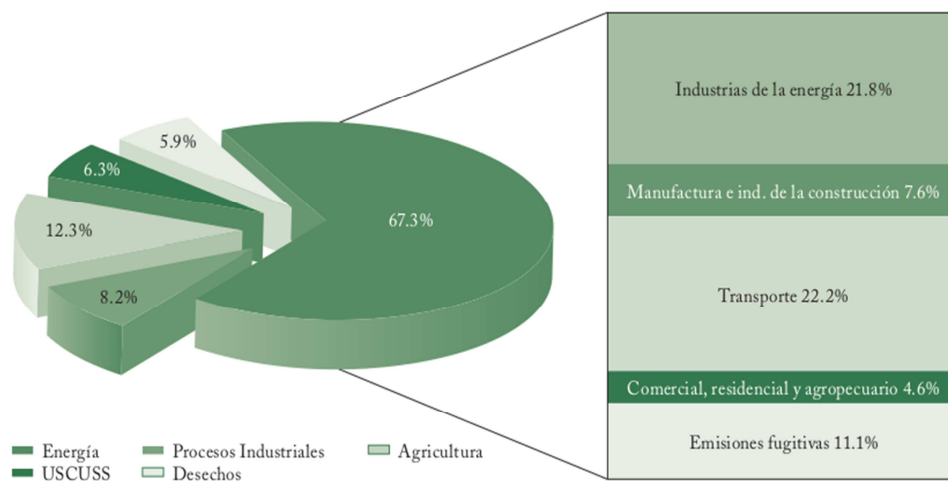


Gráfico 15. Tendencia de las emisiones de GEI (1990-2010)¹⁰²

Los resultados del último INEGEI (Gráfico 26) demuestran que las emisiones de GEI en 2010 (un total de 748 millones de toneladas de CO₂ equivalente) fueron 33.4 % más que las emisiones de 1990, siendo el sector de Energía responsable del 67.3 % de las mismas (Gráfico 18).

Gráfico 16. Contribución de emisiones de GEI por categoría (2010)¹⁰³

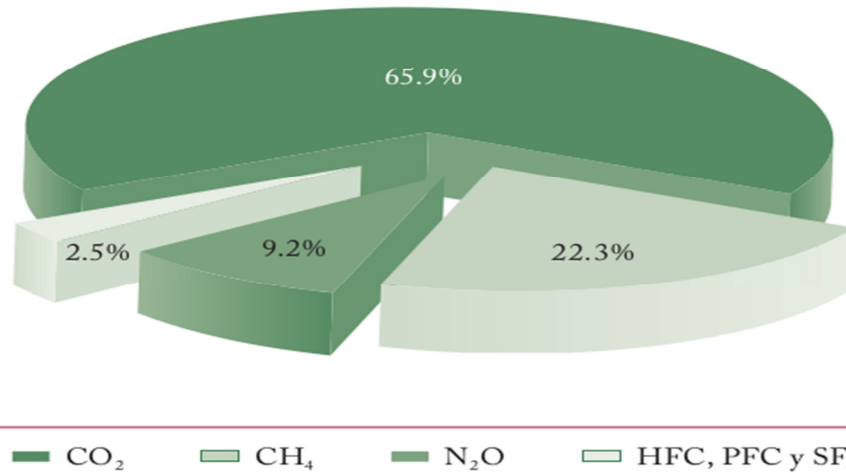


¹⁰² SEMARNAT. Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero 1990-2010. 1ªEd. México: SEMARNAT. INECC, 2013. Pag. 23. Modificada por la autora para mostrar la tendencia del sector Energía.

¹⁰³ Fig. 1. Íbidem Pag. XVIII.

Del total de emisiones de GEI, 65.9 % fueron de CO₂ en 2010 (Ver Gráfico 19). La categoría de Energía aportó el 82.1 % del total de CO₂ emitido a la atmósfera en 2010.

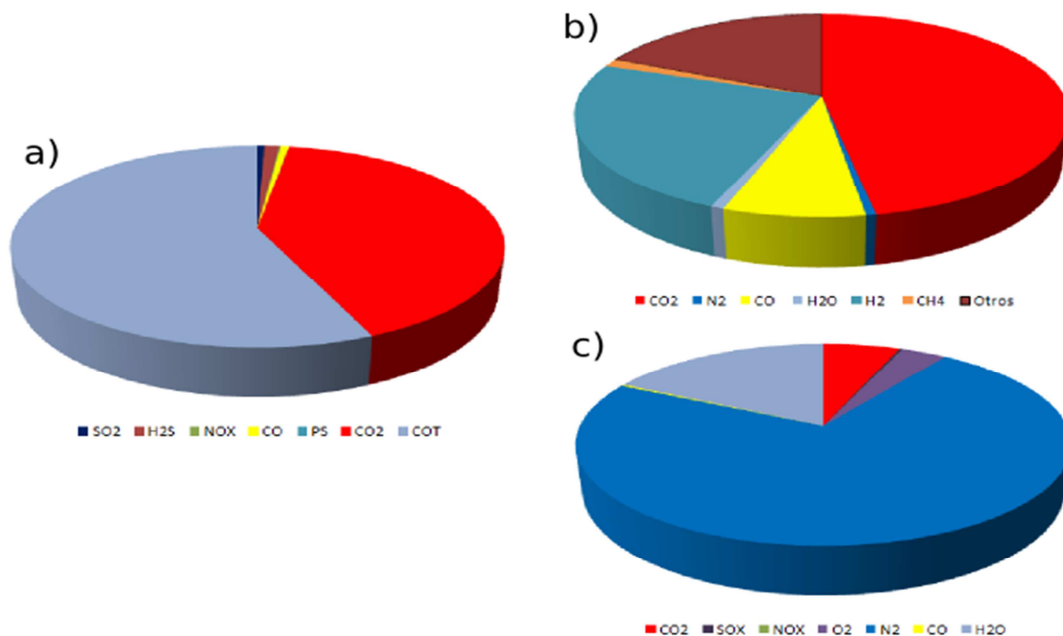
Gráfico 17. Contribución de emisiones de GEI por gas (2010)¹⁰⁴



En ese mismo año, la extracción, refinación y producción de petróleo y gas aportó un 16.57 % de las emisiones totales de GEI (Gráfico 20). Según datos obtenidos de PEMEX, una parte considerable de sus emisiones corresponden a CO₂.

Gráfico 18. Porcentaje de emisiones de CO₂ en PEMEX.¹⁰⁵

Composición de las emisiones, resaltando el porcentaje de CO₂ (en rojo), procedentes de a) Venteo de quemador (CO₂ 41.15 %). B) Plantas reformadoras de hidrógeno (CO₂ 47.06 %). C) Hornos de pirólisis en plantas de etileno (CO₂ 6 %).



¹⁰⁴ Ídem. Pag. XX

¹⁰⁵ PEMEX Exploración y Producción (PEP) 2015, cortesía de Jesús Reyes Ávila, Instituto Mexicano del Petróleo.

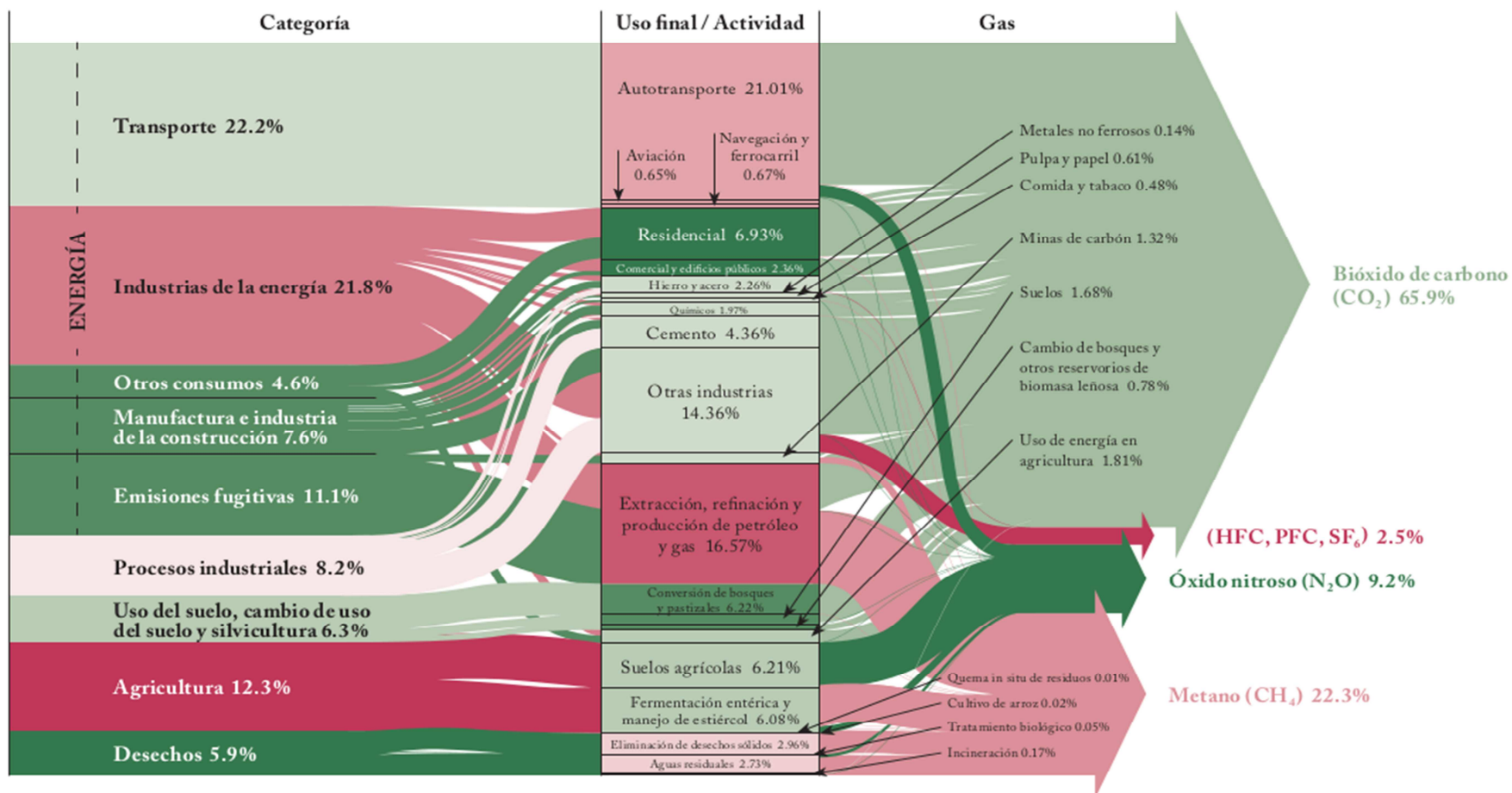


Figura 45. Diagrama de emisiones de GEI para México (2010).¹⁰⁶

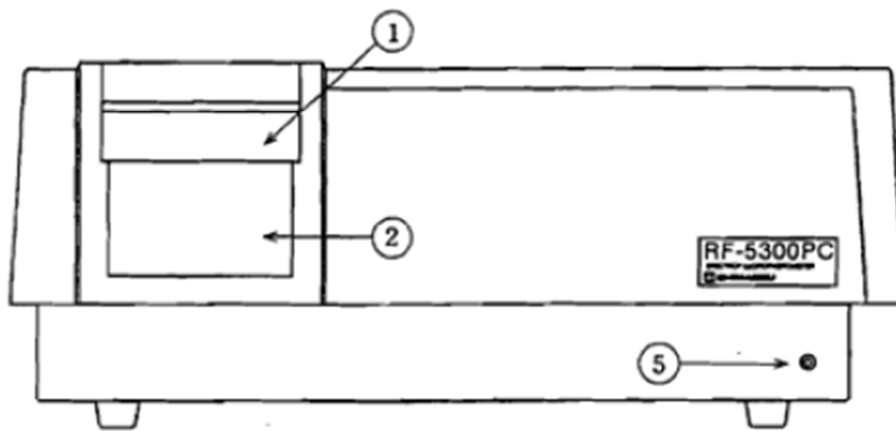
¹⁰⁶ íbidem. Pag. 22.

II. Procedimiento de Operación del Espectrofluorofotómetro Shimadzu Modelo RF- 5301

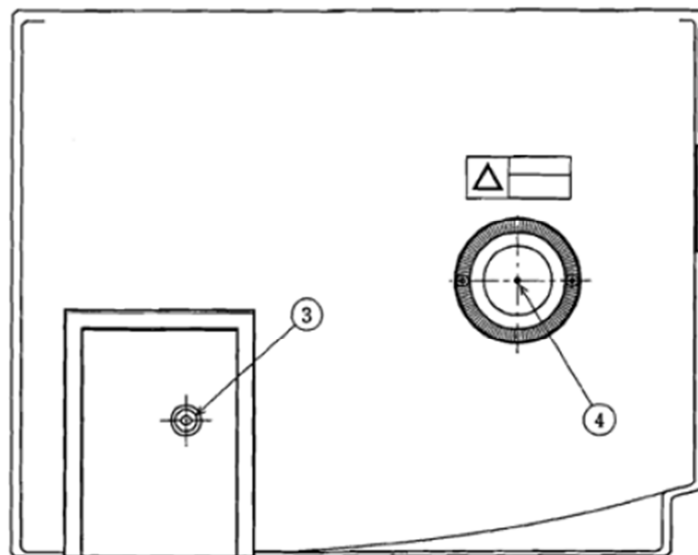
El espectrofluorofotómetro de estado basal Shimadzu RF- 5301 es un instrumento diseñado para realizar análisis espectrofluorofotométricos de muestras líquidas. A continuación, se muestran sus componentes.

28. Partes del espectrofluorómetro¹⁰⁷

Vista frontal



Vista superior

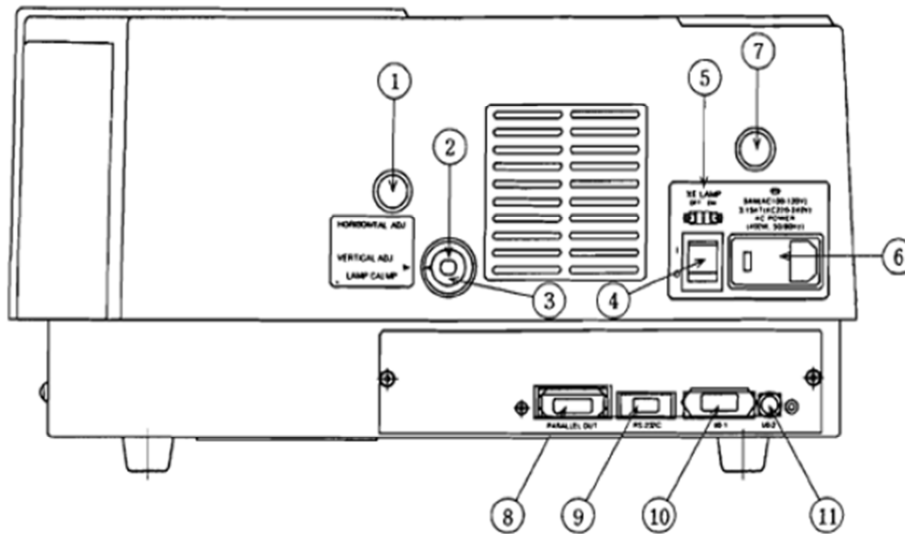


1. Compartimiento para la muestra.
2. Panel frontal de la cámara de Xenón.
3. Cubierta del hueco de inyección de muestra.¹⁰⁸
4. Cubierta del alojamiento de la lámpara.
5. Indicador de encendido de lámpara. (Foco encendido si la lámpara lo está).

¹⁰⁷ Spectrofluorophotometer Manual, Versión 2.1.9.0. Shimadzu Deutschland GmbH. Duisburg. 2008.

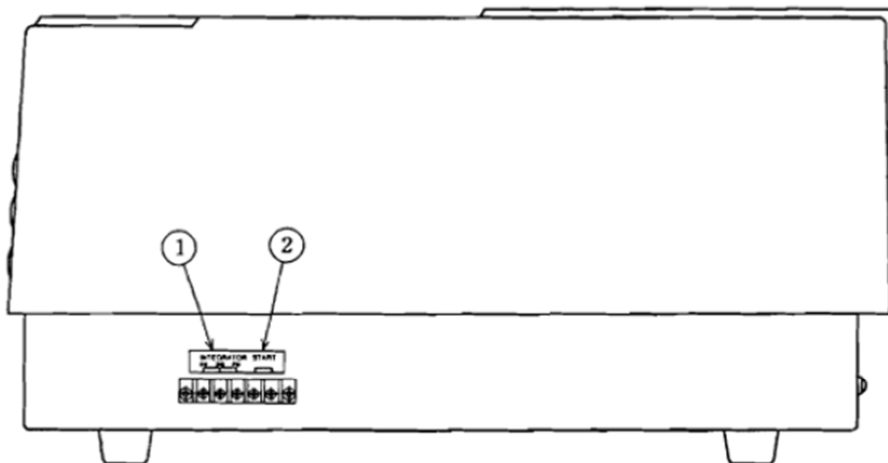
¹⁰⁸ Retirado para poder insertar la muestra en una celda en el compartimiento destinado a dicho fin.

Vista lateral derecha



- | | |
|---|---|
| 1. Equipo para posición horizontal de la lámpara. | 6. Selector de voltaje 1. |
| 2. Equipo para posición vertical de la lámpara. | 7. Selector de voltaje 2. |
| 3. Equipo para arreglar la lámpara | 8. Conector paralelo I/F. |
| 4. Switch de encendido del equipo. | 9. Conector RS-232C I/F (conecta con la computadora). |
| 5. Switch de encendido de lámpara. | 10. Conector I/O-1. |
| | 11. Conector I/O-2. |

Vista lateral izquierda



- | | |
|-------------------------------------|--------------------------|
| 1. Terminales analógicas de salida. | 2. Terminales de entrada |
|-------------------------------------|--------------------------|

Deben seguirse los siguientes pasos:

- 1) Encender el espectrofluorofotómetro (Switch de encendido).
- 2) Encender lámpara (Switch de lámpara). La fuente de luz en éste instrumento es una lámpara de Xenón de 150 W. Antes de leer las muestras, deben pasar por lo menos 10 min desde el encendido de lámpara.
- 3) El fenómeno de fluorescencia depende de la temperatura, por lo que el sujetador de la muestra cuenta con un dispositivo para asegurar la temperatura de las muestras. Para que esto ocurra, es necesario conectar un recirculador con control de temperatura. En la parte frontal del espectrofluorofotómetro, hay una salida y una entrada a la que van conectadas las mangueras del recirculador, al cual indicamos la temperatura a la que necesitamos hacer la medición (se recomienda verificarla antes de realizar la medición).
- 4) Encender la computadora. Es muy importante haber encendido antes el espectrofluorofotómetro, de lo contrario no será detectado.
- 5) Dentro de la computadora, ingresar al programa *Panorama Fluorescence Spectroscopy*.
- 6) Una vez dentro del programa, ir al menú *RF-5301*.
- 7) Dentro de dicho menú se encuentran las opciones de espectros que se pueden medir¹⁰⁹. En nuestro caso, son de interés dos de ellos:
 - a) Obtención del espectro de emisión: seleccionar la opción *2D Emission Measurement*.
 - b) Obtención del espectro de excitación: seleccionar la opción *2D Excitation Measurement*.

- 8) Cualquiera que sea la opción que hayamos elegido, si es el primer espectro que se va a obtener, automáticamente se abre una ventana que hace el chequeo automático del equipo. Esperar a que termine y que todos los parámetros estén en verde, lo que significa que el espectrofluorofotómetro está listo para realizar la medición. Esta ventana aparece cada vez que se apaga la computadora y se inicia el programa. Una vez que termina el chequeo, se cierra la ventana oprimiendo *Close*.

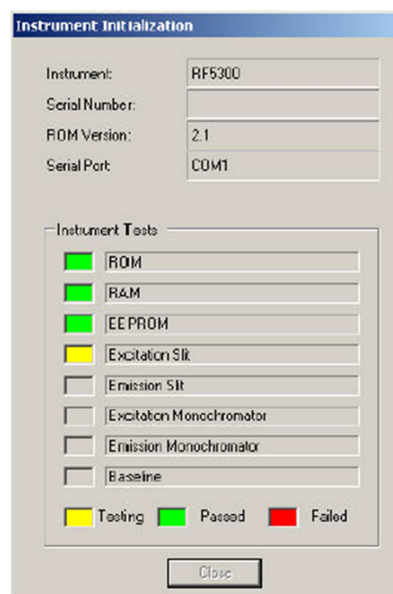
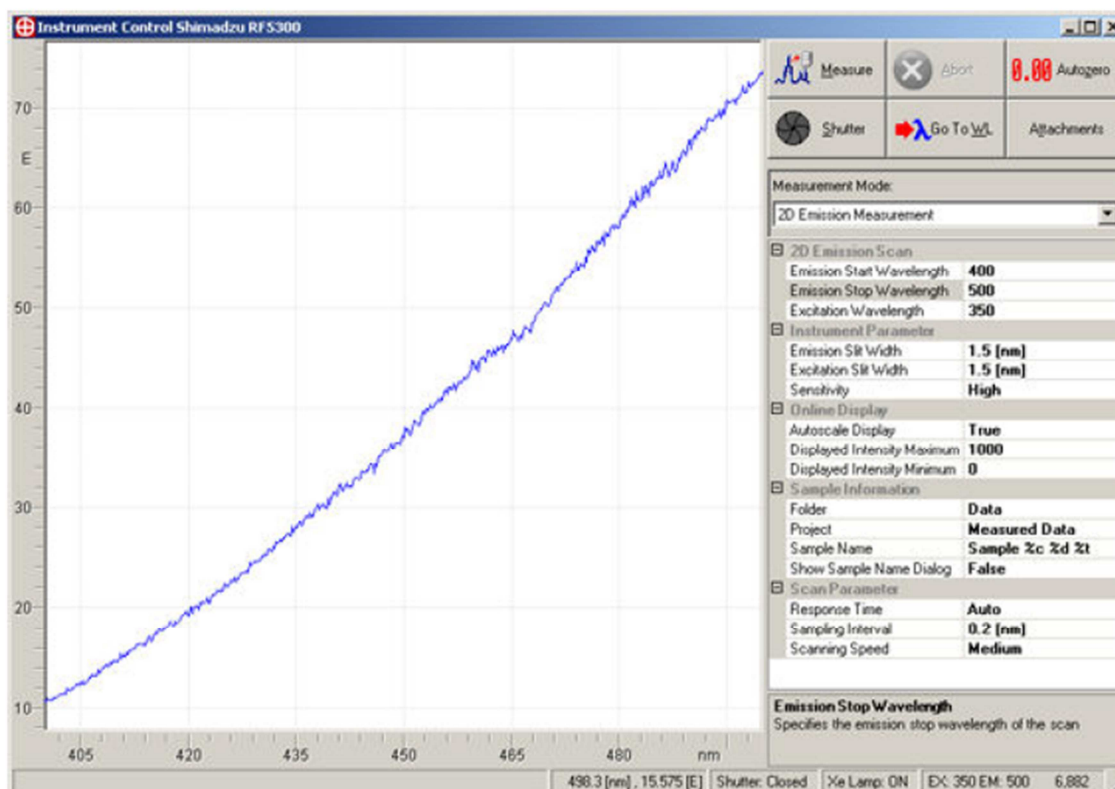


Figura 46. Ventana de chequeo.

¹⁰⁹ Esperar a que se cumplan 10 min desde el encendido de la lámpara.

Aparecerá la *ventana de medición*, en la que se fijan los parámetros para el espectro a realizar (ya sea de emisión o excitación). En la parte izquierda hay un gráfico donde aparecerá el último espectro realizado (si es el primer espectro, aparecerá en blanco). A la derecha, se encuentran el cuadro de diálogo de medida, donde se deben indicar los parámetros: el rango de la medición, la longitud de onda (de excitación o emisión, según sea el espectro a realizar), velocidad de la medición, ancho de la abertura de excitación y emisión, sensibilidad, intervalo de muestreo y tiempo de respuesta; así como el nombre de la muestra y la fecha. Existe también un apartado para mediciones en línea.



47.Ventana de medición,

- 9) Una vez establecidos estos parámetros, ir al botón *Go to WL* y ahí se escribe la longitud de onda a la que se va a emitir o excitar, según el espectro que hayamos escogido medir. Una vez establecida la longitud de onda, se da clic en *Close* para salir del cuadro de diálogo.
- 10) Sin que haya muestra en el espectrofluorofotómetro y con la tapa del compartimento para muestra cerrada, abrir el disparador de luz dando un clic en el botón *Shutter*. A continuación se da clic en el botón *Autozero*. Esto es para asegurarnos que el cero de la medición sea real. Asegurarnos que, al hacer esto, el cero quede al menos con dos décimas de exactitud. Volver a cerrar el disparador volviendo a hacer clic en *Shutter*.
- 11) Introducir la muestra espectrofluorofotómetro. Las muestras se obtienen una a la vez, deben introducirse en disolución en una celda de cuarzo especial para este tipo de análisis. Se introduce la muestra en el sujetador de muestra y se espera aprox. 5min a que la temperatura de la muestra sea estable. Es importante recordar que el espectrofluorofotómetro es un instrumento muy sensible, por lo que no se deben medir

muestras que no estén diluidas. La celda siempre debe estar limpia, por lo que no se deben manipular sin guantes y debe limpiarse con cuidado con un kleenex antes de introducirla al equipo. Se debe cuidar que la muestra no tenga burbujas después de haber alcanzado la temperatura y debe estar correctamente tapada. Al introducirla, debe manipularse con seguridad pero no con rudeza, ya que se puede romper.

- 12) Una vez la muestra está correctamente colocada, cerrar la tapa del compartimiento para muestras y se procede a obtener la medición. Clic en *Measure* y esperar a que termine.
- 13) Una vez realizada la medición del espectro, cerrar la *ventana de medición* con *Close*.
- 14) Para guardar los datos de la medición, ir al menú *File*.
- 15) Seleccionar la opción *Save As*, que abre una ventana que tiene el nombre que se indicó para el archivo, así como las opciones para guardar en una ubicación en la computadora. Los datos se deben guardar como texto, para poderlos abrir posteriormente en cualquier computadora.
- 16) Al terminar de medir las muestras, se debe apagar primero la lámpara (Swicht lámpara). Esperar mínimo 15 min a que ésta se enfríe. Por ningún motivo se debe apagar el espectrofluorofotómetro si la lámpara sigue caliente.
- 17) Para tratar la información en otra computadora, debe llevarse una memoria USB y copiar los archivos de texto correspondientes a las mediciones. La memoria debe ser analizada en otra computadora, asegurando que no tenga virus o archivos maliciosos que perjudiquen al equipo de cómputo del espectrofluorofotómetro. Al terminar de copiar los archivos, se apaga la computadora.
- 18) Apagar el recirculador y desconectarlo del espectrofluorofotómetro.
- 19) Una vez pasados 15 min, se apaga el espectrofluorofotómetro (Swicht de encendido).