



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE INTERACCIONES ENTRE PELÍCULAS DELGADAS DE
RESORCINARENO DE NUEVA SÍNTESIS CON AMINOÁCIDOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ERICK MONTIEL CORDOVA

TUTOR

Dra. Margarita Rivera Hernández



Ciudad Universitaria, CD. MX.

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Ma. Guadalupe Lemus Barajas

VOCAL: Profesor: Roeb Garcia Arrazola

SECRETARIO: Profesor: Margarita Rivera Hernández

1er. SUPLENTE: Profesor: Ulrich Briones Guerash Silva

2° SUPLENTE: Profesor: Alma Miriam Novelo Torres

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE FÍSICA.

DEPARTAMENTO DE MATERIA CONDENSADA.

LABORATORIO 104, ELECTRÓNICA MOLECULAR, EDIFICIO LEMA.

ASESOR DEL TEMA: DRA. MARGARITA RIVERA HERNÁNDEZ



SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. JESÚS MIGUEL RIVERA CRUZ



SUSTENTANTE: ERICK MONTIEL CORDOVA



Agradecimientos.

Agradezco profundamente a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por contribuir en mi formación académica y profesional.

A la Dra. Margarita Rivera por haberme permitido desarrollar el proyecto, por enseñarme y dejarme crecer a la par del proyecto. Por dar todos los medios para que los experimentos se pudieran haber llevado a cabo y guiarme en el proceso para lograr mis objetivos.

Al M. en C. Jesús M. Rivera por aceptar ser una guía desde el primer día, por darme las bases químicas que me faltaban para la comprensión de experimentos y por aconsejarme en la metodología basándose en su amplia experiencia.

Al proyecto PAPIIT-UNAM IN108017 por la beca otorgada, al proyecto PAPIIT-UNAM IN112420 por el apoyo en la compra de consumibles. Al proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-289 por el uso de recursos en la supercomputadora Miztli para los cálculos DFT.

1. Sensores	1
1.1 Características de un sensor.....	2
1.2 Tipos de selectividad de un sensor.....	3
1.3 Miniaturización de sensores.	4
2. Moléculas macrocíclicas aplicadas en sensores.....	4
2.1 Calix[4]resorcinarenos.....	5
2.2 Características de los resorcinarenos.....	6
2.3 Aplicaciones de los resorcinarenos.	8
3. Aminoácidos.....	9
3.1 Química de los aminoácidos.....	9
3.2 Detección de aminoácidos.	10
3.3 Enfermedades asociadas a los aminoácidos.	11
4. Películas delgadas	12
4.1 Formación de películas delgadas.	13
4.2 Evaporación térmica.....	14
5. Técnicas de caracterización por métodos microscópicos.	15
5.1 Microscopía óptica.	15
5.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	16
5.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)	18
6. Técnicas de caracterización por métodos espectroscópicos	20
6.1 Espectroscopia UV-Vis.....	21
6.2 Espectroscopía Infrarroja	22
7. Técnicas de detección y cuantificación de aminoácidos.....	23
7.1 Formación de purpura de Ruhemann por ninhidrina.	24
8. Otras técnicas de análisis.	25

8.1	Evolución cinética usando QCM	25
8.2	Interacciones locales por DFT.	28
	Antecedentes.	30
	Objetivo General	32
	Objetivos Particulares.	32
	Hipótesis.....	32
	Metodología.....	33
1.	Compuesto Utilizado	33
2.	Preparación de sustratos.....	33
2.1	PET.....	33
2.2	Vidrio.	34
2.3	Cuarzo.....	34
3.	Formación de películas.....	35
3.1	Evaporación térmica.....	35
4.	Preparación de soluciones.	36
4.1	Buffer de fosfatos.....	36
4.2	Solución de L-glutamato.....	37
4.3	Solución de glicina.....	37
4.4	Solución de L-lisina.	37
4.5	Solución de L-serina.	37
4.6	Preparación de ninhidrina.....	38
5.	Caracterización de películas.....	38
5.1	Microscopía óptica.	38
5.2	Microscopía Electrónica de barrido (SEM).....	38
5.3	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	39
5.4	Espectroscopia UV-Vis.....	39

5.5	Espectroscopia infrarroja	40
5.6	QCM.....	41
5.7	DFT.....	42
Resultados y Análisis.		43
1.	Microscopía Óptica.....	43
2.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	46
3.	Microscopía de fuerza atómica (AFM)	51
4.	Espectroscopia ultravioleta-visible.	54
5.	Espectroscopia Infrarroja.	58
6.	Formación del purpura de Ruhemann con ninhidrina.	76
7.	QCM.....	85
8.	DFT.....	92
Conclusiones.		95
Apéndice.....		97
Valor de pKa de los aminoácidos.....		97
Modelos de formación de capas de adsorción		97
Referencias.....		99

INTRODUCCIÓN

1. Sensores

En el estudio formal del desarrollo de sensores se tiene una ambigüedad sobre la definición, clasificación y terminología de los mismos, se han generado conceptos no unánimes de un sensor. Debido a esta imposibilidad de dar un único concepto al término sensor se han desarrollado diferentes definiciones aceptadas, una de ellas lo define como un dispositivo que proporciona una salida utilizable en respuesta a una medida específica (“Expanding the Vision of Sensor Materials,” 1995). En el desarrollo de nuevos sensores se busca que estas salidas generadas puedan ser procesadas de manera rápida y sin la necesidad de análisis complejos.

Una de las clasificaciones más comunes en los sensores los divide basados en:

- Las propiedades detectadas.
- Las tecnologías utilizadas.

En este último, se incluyen fenómenos físicos (como sensores acústicos, electroquímicos, de efecto Hall e infrarrojos) y tipos de materiales (como sensores bimetálicos, de fibra óptica, de película gruesa y delgada, etc).

Además, el sensor ideal deberá ser económico, portátil y sensible. Capaz de detectar concentraciones mínimas del analito y ser selectivo, dado a que estas características muchas de las veces resultan muy difíciles de conseguir. En la aplicación, se ha definido a los sensores químicos como dispositivos o instrumentos que determinan la presencia, concentración o cantidad detectable de un analito dado. (“Expanding the Vision of Sensor Materials,” 1995).

La complejidad de la aplicación de un sensor químico está relacionada con las técnicas de determinación para poder analizar la presencia del analito. Por este motivo, se busca que las técnicas empleadas sean fáciles de realizar y en el menor tiempo posible. Además, la naturaleza específica (es decir, elemental o molecular) de la sustancia química a analizar es otro punto importante que considerar para la aplicación del sensor. La detección molecular generalmente se basa en el reconocimiento de la estructura molecular o la reactividad asociada; este aspecto de reconocimiento se llama selectividad, esta característica junto con la sensibilidad y el límite de detección están completamente relacionados con la cantidad o concentración del elemento o molécula a analizar (el analito). Los aspectos de sensibilidad y selectividad de la detección química se ven afectados por las fases, dimensiones y tiempos de la determinación deseada. El analito puede estar presente en una fase gaseosa, líquida o sólida en varias escalas dimensionales que van desde volúmenes a granel de litros a picolitros, o capas superficiales que van desde escala nanoscópica a escala monomolécula. El tiempo de determinación es importante, ya que de él depende la velocidad con la que se llevará a cabo la detección, sin embargo, se debe de considerar que la salida de la señal utilizable puede ser diferente con respecto al tiempo y variar así la sensibilidad y especificidad del sensor.

Por último, se debe tener en cuenta que, para la producción de nuevos sensores, los recursos económicos y las limitaciones que puedan afectar en el diseño y la estrategia de detección son los que al final decidirán la aplicabilidad del sistema de detección.

1.1 Características de un sensor.

Las características principales que debe de tener un sensor son:

- Selectividad
- Sensibilidad
- Respuesta en el tiempo
- Tamaño pequeño

El esquema básico de un sensor se presenta en la Figura 1:

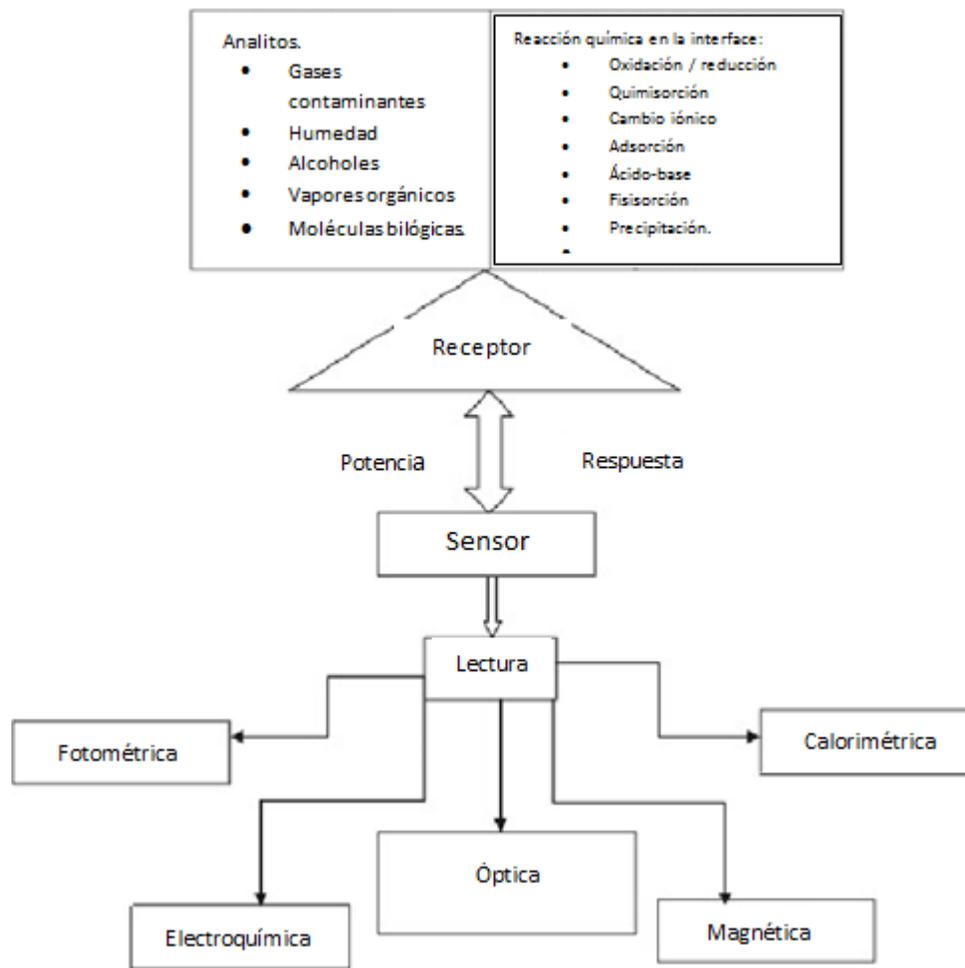


Figura 1. Esquema que representa los componentes principales que engloban a un sensor.

En la actualidad, el realizar sensores que cumplan con todas estas características sigue siendo demasiado complicado y la selectividad es una de las características más difíciles de conseguir. En ausencia de una adecuada selectividad se han desarrollado diferentes tipos de sensores con diferentes maneras de aumentar la selectividad:

- *Sensores con limitada selectividad:* muchos de estos sensores pueden ser aceptables en un ambiente controlado, como un sitio de fabricación, donde se puede conocer y controlar la naturaleza y el rango de diferentes contaminantes, así como las cantidades o concentraciones esperadas de analito que se puedan identificar con la presencia de estos contaminantes.
- *Sensores poco selectivos con arreglos matemáticos:* Este tipo de sensores generalmente son una mezcla de sensores donde cada uno genera una señal para el analito o algún contaminante en específico que se encuentre en la muestra. Después, un apropiado análisis matemático puede permitir la extracción de la respuesta del analito de la mezcla de respuestas obtenida de los múltiples sensores.
- *Sensores sensibles, pero no selectivos (Separación del analito de una muestra, seguido de la detección del analito individual):* En estos casos, un gran número de analitos en una muestra pasan primero por un paso de separación para obtener los analitos y contaminantes en una solución más pura. Paso seguido, se utiliza un el sensor no selectivo para detectar los diferentes componentes. Estas separaciones se pueden llevar a cabo por diferentes técnicas como cromatografías y electroforesis.

1.2 Tipos de selectividad de un sensor.

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

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

1.3 Miniaturización de sensores.

Los orígenes de la química de sensores a menudo incluyen estudios analíticos usando instrumentos voluminosos y complejos, lo que impedía su uso en diferentes circunstancias. Es por eso que, en los últimos años, se ha buscado transformar la necesidad de utilizar instrumentos voluminosos en algo más útil y que también implique una disminución en los costos de formación e implementación, por lo que generalmente se necesita llevar a cabo una miniaturización del sensor y utilizar técnicas más sencillas de caracterización y lectura de los resultados. Sin embargo, esta miniaturización suele venir acompañada de una disminución en el rendimiento del sensor y principalmente de su selectividad.

En la miniaturización de sensores actualmente existen diferentes tipos empleados, tales como:

- *Recubrimientos y películas delgadas con cierto nivel de selectividad basada en:* Selectividad química, eficiencia cromatográfica, exclusión molecular, estabilidad bajo gradientes de campo eléctrico etc.
- Fibras ópticas que llegan a aumentar el rango de rendimiento y mejorar la sensibilidad del detector.

2. Moléculas macrocíclicas aplicadas en sensores.

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

Algunos de los ejemplos más comunes de macrociclos y su actividad son: la actividad del anillo de porfirina en los glóbulos rojos, el cual contiene un ion hierro (Behboodi-Sadabad, Trouillet, Welle, Messersmith, & Levkin, 2018). Otro ejemplo de un macrociclo presente en la naturaleza es la ciclodextrina (cicloamilasa) por la degradación de la amilasa por parte del *Bacillus maceranus*. Las ciclodextrinas tiene una cavidad central de gran diámetro que varía dependiendo del número de residuos de glucosa en la molécula (Kolthoff, 1979). Existen también otras moléculas que presentan similitudes estructurales con las ciclodextrinas pero que son sintéticas, llamadas calixarenos, que se han utilizado para la química de detección (Hassen et al., 2007). De estos últimos, formando parte de la misma familia, se tienen los llamados calix[n]resorcinarrenos, siendo m-ciclofanos pero con dos grupos fenol en cada residuo aromático en lugar de uno. (Figura 2)

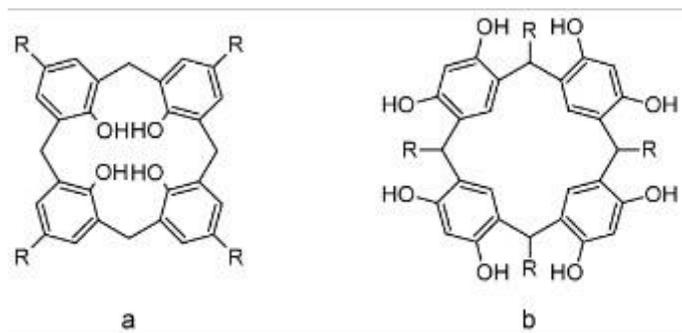


Figura 2. Diferencia estructural entre a) Calix[4]areno y b) Calix[4]resorcinareno.

2.1 Calix[4]resorcinarenos.

Estas moléculas fueron reportadas por primera vez por Adolf von Baeyer en 1872 en un estudio general sobre la síntesis de bases fenólicas para tintes, donde la adición de ácido sulfúrico concentrado en una mezcla con benzaldehído y resorcinol dio un producto colorido rojo que se tornaba violeta en soluciones alcalinas. Cuando la mezcla se calentó, se obtuvo un compuesto cristalino. Actualmente, se ha propuesto que la presencia de color es el resultado de las bandas de transferencia de carga intramolecular en estos sistemas. (Sugden, Richardson, Davis, Higson, & Faul, 2008)

Años más tarde se determinó su composición elemental $(C_{13}H_{10}O_2)_n$ y la de su derivado acetilado $(C_{13}H_8(OCOCH_3)_2)_n$, con estos datos, se concluyó que los resorcinarenos estaban formados por una combinación de un número igual de benzaldehído y resorcinol, y que en la reacción de síntesis se perdía un número igual de moléculas de agua. (Timmerman, Verboom, & Reinhoudt, 1996).

En 1940, Niederl y Vogel estudiaron un gran número de productos de condensación de la reacción entre aldehídos alifáticos y resorcinol. De la determinación del peso molecular, ellos concluyeron que la relación entre el aldehído y el resorcinol era de 4:4, proponiendo así una estructura tetramérica cíclica (Figura 3) análoga a las estructuras cíclicas tetraméricas frecuentemente encontradas en la naturaleza como las porfirinas.

Esta estructura fue finalmente demostrada en 1968 por Erdtman y colaboradores por medio de un análisis cristalográfico de rayos X (Timmerman et al., 1996).

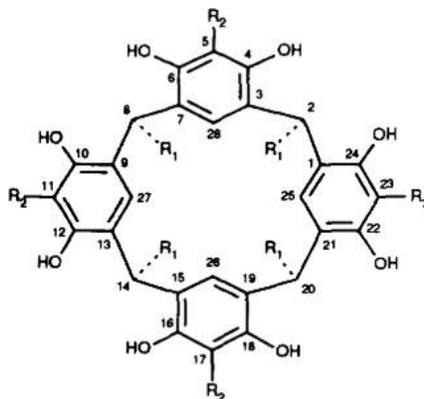


Figura 3. Estructura básica del resorcinareno, donde R_1 es una cadena alifática o aromática, y R_2 es en la mayoría de los casos hidrógeno (H).

2.2 Características de los resorcinarenos.

Las moléculas macrocíclicas de los calix[4]resorcinarenos, también llamados simplemente resorcinarenos, se sintetizan mediante condensación de resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) y diferentes aldehídos. Los resorcinarenos se pueden modificar con varios sustituyentes en la corona superior e inferior para proporcionar funcionalidad y selectividad específica (Figura 3). Además, la corona se estabiliza mediante una matriz intramolecular de puentes de hidrógeno muy fuerte, ya que los resorcinarenos prefieren la conformación con el mayor número de puentes de hidrógeno posibles (Panahi, 2016) (Timmerman et al., 1996).

A diferencia de la mayoría de los otros macrociclos sintéticos, los resorcinarenos pueden estar fácilmente disponibles, ya que se sintetizan utilizando productos químicos de bajo costo. Estas moléculas, que contienen una rama hidrofílica e hidrofóbica, poseen grupos de unión ajustables y pueden sintetizarse con diferentes tamaños en su cavidad, que es el espacio producido, lo suficientemente largo para acomodar otras moléculas o iones. Por lo anterior, existe la posibilidad de sintetizar resorcinarenos con una gran variedad de estructuras diferentes tanto de forma y tamaño de la cavidad, así como por la naturaleza de sus grupos funcionales y generar así especificidad.

Para entender su capacidad de captar y formar complejos con moléculas pequeñas es necesario entender las características químicas que genera la presencia de ocho grupos hidroxilo en la parte superior de la corona, que hace a los resorcinarenos moléculas susceptibles a la formación de complejos con moléculas orgánicas que contengan sustituyentes polares. Se ha sugerido que cada par de grupos hidroxilo forma un sitio de unión, y que cada uno de los cuatro sitios de unión ocupan un lugar fijo con respecto a los otros, pudiendo así, interactuar independientemente con moléculas pequeñas (Timmerman et al., 1996). Esta interacción puede llevarse principalmente por dos formas diferentes, a saber, por la corona que contiene los anillos de benceno que puede atrapar a las moléculas y propiciar una interacción ácido-base con el enlace π . Por otro lado, la segunda interacción se lleva a cabo muchas veces de forma cooperativa por medio de los grupos hidroxilo, los cuales juegan un papel importante en la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas huésped (Moreira, Dutton, & Aroca, 1994).

Otra de las características químicas de los resorcinarenos que toma relevancia para su función como sensor es su disposición estereoquímica, la cual es muy versátil debido a la existencia de varios estereoisómeros, los cuales, son generalmente definidos por la combinación de tres criterios que estrictamente hablando no son independientes entre sí. El primer criterio es la conformación de los anillos en el macrociclo. El macrociclo puede adoptar hasta cinco conformaciones altamente simétricas, las cuales son: corona, bote, silla, diamante y silla de montar (Figura 4).

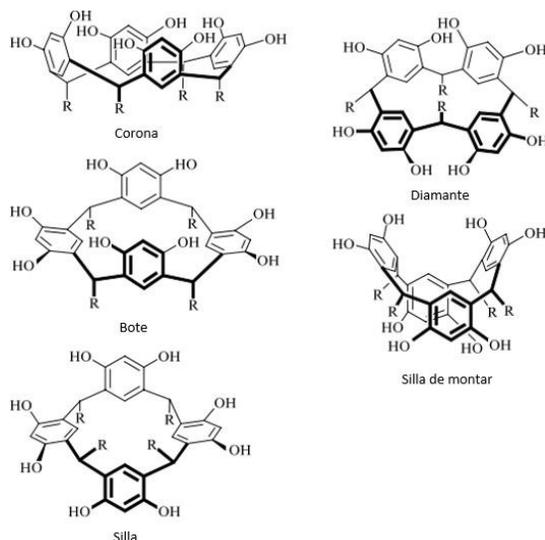


Figura 4. Estereoquímica de los resorcinarenos basado en la posición de sus anillos.

El siguiente criterio está en relación con la posición de los sustituyentes en los puentes de metileno del macrociclo. Las diferentes posiciones que se pueden adoptar tomando como referencia la posición de un sustituyente (*r*) son las combinaciones: *cis-cis-cis* (*rccc*), *cis-cis-trans* (*rcct*), *cis-trans-trans* (*rctt*) y *trans-cis-trans* (*rtct*) (Figura 5). En este criterio, el isómero *rccc* resulta, en la mayoría de los casos, el más estable termodinámicamente (Kondyurin, Rautenberg, Steiner, Habicher, & Salzer, 2001).

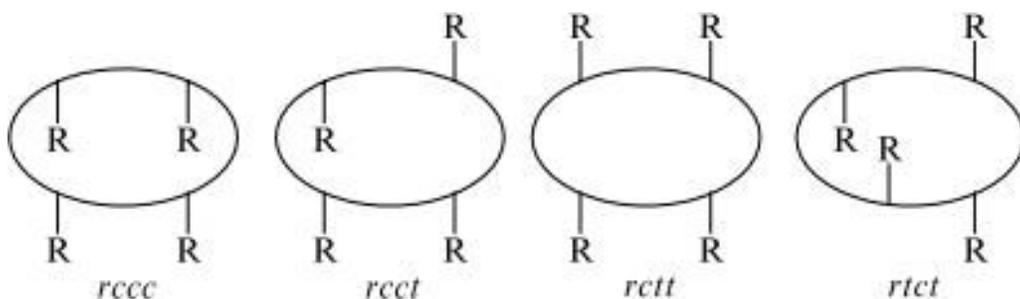


Figura 5. Estereoquímica de los resorcinarenos basado en la posición de sus sustituyentes.

Por último, se tiene la configuración individual de los sustituyentes del puente de metileno, los cuales pueden ser axiales o ecuatoriales en macrociclos con simetría.

La combinación de estos tres criterios resulta en un gran número de posibles estereoisómeros. Sin embargo, sólo algunos de ellos han sido reportados experimentalmente. La conformación de "bote" generalmente se informa como una conformación de "corona", en parte debido a la presencia de dos isómeros de bote que se interconvierten rápidamente para dar una conformación de corona promediada en el tiempo. Esta posibilidad de adoptar diferentes conformaciones en el espacio contribuye a un control de las interacciones que se tienen con las moléculas huésped. Aunado a todo lo anterior, su estereoquímica, principalmente en resorcinarenos con grupos hidroxilo libres en la corona, puede ser afectada por los solventes en los que se encuentren (Jain & Kanaiya, 2011). Sin embargo, se ha observado que los resorcinarenos en estado sólido, como en el caso de una película delgada, los cambios conformacionales son muy restringidos o prácticamente nulos.

2.3 Aplicaciones de los resorcinarenos.

Es debido a la gran versatilidad presentada en las características de los resorcinarenos que se han vuelto moléculas de interés con un gran número de aplicaciones en diferentes áreas de investigación.

Entre las aplicaciones que se han reportado se encuentra la utilización en la contención de reacción a nanoescala, agentes de cambio de RMN quiral, en la encapsulación, protección y administración de fármacos, así como en las separaciones cromatográficas donde la fase estacionaria de diferentes técnicas de separación como HPLC, GC e IC se puede modificar mediante derivados de resorcinareno (Li, Harrison, & Lamb, 2014). Además, se tienen otras como su uso en la formación de cristales líquidos, los cuales son materiales con usos potenciales como medios activos en aplicaciones ópticas, ya que su rápida respuesta a cambios con los campos eléctricos, les permite ser utilizados en la producción de pantallas de cristal líquido (Jain & Kanaiya, 2011).

También, se han descrito aplicaciones en catalizadores como en la reacción de Heck, reacciones de tipo Mannich, aminólisis de un derivado de colina, y oxidación de tipo C – H (Li et al., 2014), entre otros.

En cuando a su función como sensores se ha demostrado su capacidad de captación para diferentes tipos de analitos, tales como en el estudio de la interacción y respuestas a la exposición de diferentes vapores orgánicos como el cloroformo, benceno, tolueno y etanol (Özbek et al., 2011).

El reconocimiento y formación de complejos selectivos con moléculas biológicas se ha convertido recientemente en una de las aplicaciones más interesantes de los resorcinarenos y sus derivados. Se ha descrito, por ejemplo, el reconocimiento de la superficie de proteínas utilizando varios péptidos cíclicos unidos al núcleo de los resorcinarenos (Mutihac, Lee, Kim, & Vicens, 2011). Además, el reconocimiento de aminoácidos ha sido objeto de diferentes estudios utilizando resorcinarenos solubles y no solubles que pueden estar en estado sólido, fase gaseosa o en solución.

3. Aminoácidos.

Las proteínas son las biomoléculas más abundantes presentes en todas las células. Presentan una gran variedad, ya que existen miles de diferentes tipos con diferentes funciones biológicas y tamaños, que van desde péptidos relativamente pequeños hasta enormes polímeros de pesos moleculares muy grandes. Estas proteínas están constituidas por aminoácidos, que se unen en cadena uno a uno por medio de un enlace peptídico (enlace covalente).

Todas las proteínas conocidas, están constituidas por los mismo 20 aminoácidos en muy diversas combinaciones. De hecho, este grupo de 20 aminoácidos se puede considerar el alfabeto en el que se escribe el lenguaje estructural de una proteína. El primer aminoácido descubierto fue la asparagina en 1806, y el último de los 20 aminoácidos fue la Treonina en 1938 (Nelson & Cox., 2008).

3.1 Química de los aminoácidos.

Para todos los aminoácidos, a excepción de la glicina, se tiene un carbón denominado (carbono- α), el cual está unido a cuatro diferentes grupos: un grupo carboxilo, un grupo amino, un átomo de hidrógeno y un grupo R, el cual varía dependiendo del aminoácido. Es la variación del grupo R la que provoca las modificaciones en la estructura, tamaño, carga eléctrica y solubilidad de los aminoácidos.

El átomo carbono- α es, por lo tanto, un centro quiral y debido a la disposición tetraédrica de los orbitales de enlace a su alrededor, los cuatro diferentes grupos pueden ocupar dos disposiciones espaciales únicas y, por lo tanto, los aminoácidos tienen dos estereoisómeros posibles. Dado que son imágenes especulares no superponibles entre sí, las dos formas representan una clase de estereoisómeros llamados enantiómeros. Todas las moléculas con un centro quiral también son ópticamente activas, es decir, rotan la luz polarizada en el plano (Nelson & Cox., 2008)

Una nomenclatura especial ha sido desarrollada para especificar la configuración absoluta de los cuatro sustituyentes del carbono- α . Esta configuración absoluta de aminoácidos y también de azúcares simples es especificada por el sistema D, L (Figura 6). Históricamente, las designaciones L y D se utilizaron para Levógiro (rotan la luz polarizada hacia la izquierda), y Dextrógiro (rotan la luz polarizada hacia la derecha). Sin embargo, la convención de Fischer propuso que al referirse a D o L sólo se refiera a la configuración absoluta de los sustituyentes, y no a las propiedades ópticas de las moléculas (Nelson & Cox., 2008).

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

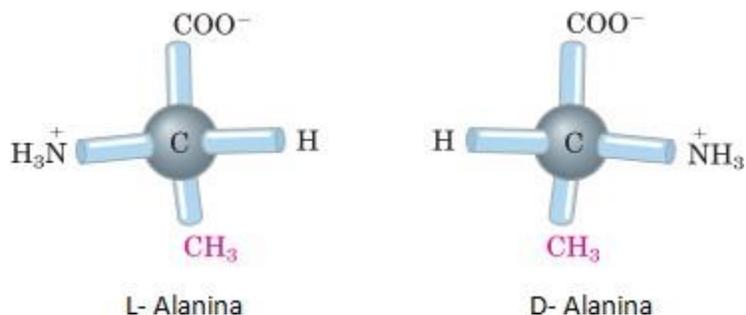


Figura 6. Estereoisómeros en α -aminoácidos, ambos estereoisómeros no son superponibles entre sí (Nelson & Cox., 2008).

Para entender más sobre las características fisicoquímicas de los aminoácidos se puede simplificar agrupándolos en cuatro clases principales según las propiedades de sus grupos R, en particular, basándose en su polaridad o tendencia a interactuar con el agua a un pH biológico (aproximadamente de 7.4). La polaridad de los grupos R varía ampliamente, y estos cuatro grupos de aminoácidos son: no polares, polares sin carga, polares cargados positivamente, y polares cargados negativamente (Nelson & Cox., 2008).

Otra de sus características más importantes es que todos los aminoácidos pueden actuar como ácidos y bases. Esto es, cuando un aminoácido se disuelve en agua, existe en solución como un ion dipolar, o zwitterion (en alemán "ion híbrido"), que puede actuar ya sea como ácido (donante de protones) o como una base (aceptor de protones). Este tipo de moléculas se conocen comúnmente como anfólitos.

Basándose en sus características ácido-base, los aminoácidos comparten muchas de ellas, y es por eso por lo que se permite simplificar o generalizar su comportamiento. Por ejemplo, todos los aminoácidos con un solo grupo α -carboxilo, un α -amino y un grupo R no ionizable tienden a presentar el mismo comportamiento ácido-base. Estos aminoácidos presentan valores de pKa similares, pero no idénticos, que van de 1.8 a 2.4 para el pKa correspondiente al grupo α -carboxilo, y de 8.8 - 11.0 para el grupo α -amino.

3.2 Detección de aminoácidos.

Debido a la importancia obvia de las proteínas en la vida, y en consecuencia de los aminoácidos, estos se han convertido en el objetivo de estudio de muy diversas ramas de la química que tienen que ver con la química de detección y de la interacción huésped- hospedero.

A este respecto, la investigación intensiva se ha centrado en el diseño y la síntesis de receptores macrocíclicos con propiedades y funciones específicas que revelan su afinidad y selectividad, encaminado al reconocimiento molecular de compuestos amino, como aminoácidos, péptidos y proteínas con capacidades biológicas, y desde un punto de vista de la química supramolecular y la aplicación analítica (Mutihac et al., 2011).

Las propiedades de reconocimiento molecular de los aminoácidos mediante receptores macrocíclicos son útiles para desarrollar procedimientos de síntesis, purificación, separación, así

como también, para dilucidar el principio de su transporte a través de membranas biológicas. Además, el reconocimiento quiral de aminoácidos y péptidos ha recibido considerable atención debido a su importancia en la comprensión de muchos aspectos de los procesos naturales con posibles aplicaciones en catálisis, enzimas miméticas y síntesis química asimétrica. Dentro de los objetivos en este campo, se encuentra la investigación de las interacciones entre resorcinarenos y resorcinarenos funcionalizados con aminoácidos que han proporcionado nuevas ideas sobre el reconocimiento molecular, los procesos de auto ensamblaje, y una mejor comprensión de los procesos de reconocimiento en sistemas biológicos (Mutihac et al., 2011).

3.3 Enfermedades asociadas a los aminoácidos.

El análisis de la composición de aminoácidos es importante en varios sectores que van desde la industria alimentaria hasta la salud humana, y es en este último campo, en el que se han descrito varias enfermedades, principalmente, desordenes metabólicos relacionados con la acumulación o disminución de diferentes aminoácidos (Hassen et al., 2007).

Las enfermedades metabólicas se han definido como todas las enfermedades o trastornos que interrumpen el proceso de conversión de alimentos en energía a nivel celular. Miles de enzimas participan en numerosas e interdependientes vías metabólicas. En el caso de las enfermedades metabólicas relacionadas con aminoácidos, estas afectan la habilidad de las células de realizar reacciones bioquímicas críticas que envuelven el proceso de transporte y conversión a energía de las proteínas, y otras biomoléculas basadas en aminoácidos. Es debido a esta interconexión entre rutas metabólicas, que un error simple en una de ellas puede afectar a numerosos procesos bioquímicos (Evans & Wood, 1986).

El primer trastorno metabólico relacionado a los aminoácidos fue descrito en 1909 por Sir Archibald Garrod (llamado alcaptonuria), el cual ocasionó que la orina de algunas personas se volviera negra. El estudio de este trastorno concluyó que el problema era un defecto en el metabolismo de la tirosina con la oxidasa del ácido homogentísico. Este trastorno se consideró una enfermedad, ya que, en individuos sanos, sólo una muy pequeña cantidad de proteínas de la ingesta se excreta por orina o heces. Cabe señalar que las proteínas no solo sirven como bases estructurales, sino también pueden ser metabolizadas como fuente de energía generando estructuras carbonadas para la producción de glucosa o sus derivados como glucógeno o ácidos grasos, con el objetivo de mantener los niveles plasmáticos de glucosa para una fuente rápida de energía (Aliu, Kanungo, & Arnold, 2018). Para ser utilizados, los aminoácidos necesitan ser transportados del tracto intestinal a la sangre o ser recuperados de la orina en el riñón. Por lo tanto, mutaciones en las proteínas requeridas para este transporte presentaran una disminución en la actividad que puede causar la disminución en la absorción de los aminoácidos de la dieta y causar su pérdida por orina. En la cistinuria hay un incremento en la excreción de cisteína, ornitina, arginina y lisina en orina, lo que genera cálculos en el riñón. Además, el transporte defectuoso a través de la membrana de los intestinos por la lisina, arginina y ornitina causa intolerancia a la proteína lisinúrica (LPI). Este trastorno, está caracterizado por la intolerancia a la proteína, y ocasiona diarrea, aumento de peso, osteoporosis y erupciones cutáneas pudiendo llegar a ocasionar una enfermedad renal y/o pulmonar (Evans & Wood, 1986).

Otro ejemplo de enfermedades relacionadas a los aminoácidos es la encefalopatía por glicina (también conocida como hiperglicemia no cetónica), que es un desorden asociado a la acumulación de la glicina en el fluido cerebroespinal y otros tejidos corporales. La mayoría de los pacientes afectados lo presentan en el periodo neonatal con convulsiones intratables, tono muscular bajo, retención del aliento, y los sobrevivientes presentan una discapacidad intelectual profunda. Incluso se ha demostrado que alrededor del 15% lo llegan a presentar hasta la edad adulta, en cuyo caso el desarrollo de la enfermedad es menor. Este trastorno sigue una herencia autosómica recesiva y su diagnóstico es muy poco probable, ya que, por lo general, no se realizan estudios de los niveles de glicina en el líquido cefalorraquídeo. Las únicas pruebas de confirmación son pruebas genéticas para al menos tres proteínas, que comprenden el complejo enzimático de escisión de la glicina. Es por ello, que se ha propuesto su detección en recién nacidos por medio de la medición de los niveles plasmáticos de glicina. Sin embargo, la sensibilidad aún no está clara, ya que la glicina en plasma puede no estar elevada en este trastorno (Aliu et al., 2018). También, se ha demostrado que el nivel de d-aminoácidos en el cerebro humano es un indicador de la enfermedad de Alzheimer (Hassen et al., 2007).

La deficiencia de glutamato formiminotransferasa es una enfermedad causada por la disminución de la actividad de esta enzima en la degradación de la L-histidina para formar amoniaco, 5,10-metinetetrahidrofolato y glutamato. Esta enfermedad autosómica recesiva está caracterizada por un retardo físico y mental, concentraciones séricas elevadas de folato, y la presencia de FIGLU (ácido formiminoglutámico) en orina después de la administración de histidina, así como una deficiencia de L-glutamato (Hilton et al., 2003).

Una de las principales enfermedades relacionadas a la L-lisina es la hiperlisinemia que se caracteriza por una elevación de la concentración plasmática de lisina cuyos niveles exceden los 600 $\mu\text{mol/L}$, y pueden alcanzar hasta 2000 $\mu\text{mol/L}$, siendo que en una persona sana los valores de referencia se encuentran en el rango de 111-248 $\mu\text{mol/L}$. Esta enfermedad es autosómica recesiva, y es causada por un defecto en la vía catabólica de la lisina en la producción de acetil-CoA que puede llevar a la generación de complicaciones mayores (Houten et al., 2013).

Es debido a estas, y muchas otras enfermedades relacionadas a los aminoácidos, que su detección se vuelve importante para un diagnóstico más acertado y eficaz.

4. Películas delgadas

Una película delgada se define como una capa de bajas dimensiones creada por el agrupamiento de pocos átomos o moléculas del material en cuestión. El grosor que presentan es típicamente menor a unos cuantos micrómetros, y se encuentran depositados en materiales de grosores mucho mayores y con diferentes características fisicoquímicas denominados sustratos.

Históricamente, las películas delgadas han sido usadas por más de medio siglo en la fabricación de dispositivos electrónicos, recubrimientos ópticos, revestimientos duros de instrumentos y piezas decorativas (Adachi & Wasa, 2012). Sin embargo, actualmente, las películas delgadas se han estado utilizando para dos finalidades: optimizar o dotar de alguna propiedad a los sustratos que recubren y que en este caso adquieren el nombre de "recubrimiento". La segunda aplicación es la fabricación de elementos con propiedades fisicoquímicas específicas que guardan muy poca o nula

relación con las propiedades iniciales del sustrato que se comporta solamente como un soporte físico, el cual no ocasiona ningún cambio en las propiedades de la película. En esta última aplicación es común ver la formación de películas de tipo monocapa o multicapa.

Las propiedades básicas de las películas delgadas como su composición química, propiedades estructurales y su espesor son controladas por las condiciones utilizadas para la deposición. Las películas delgadas exhiben propiedades únicas que no pueden observarse en materiales a granel. Estas propiedades únicas resultan del tipo de proceso de crecimiento atómico o molecular en los sustratos. Los efectos causados por el tamaño y estructura del sistema a depositar influyen en sus propiedades en general.

Una película delgada normalmente presenta las siguientes características:

- Grosor; que puede variar desde un par de nanómetros (10^{-9} m) hasta varios micrómetros (10^{-6} m)
- Composición química; presentan una estequiometría muy definida, así como una baja concentración de impurezas dependiendo del proceso de depósito.
- Estructura cristalina amorfa, mono o policristalina.

Estas características de composición y estructura, que están gobernadas por el método de deposición ocupado, determinan las propiedades físicas o químicas de la película completa o de su interfase. Algunas de estas propiedades son:

- Comportamiento eléctrico (conductoras, aislantes, semiconductoras, etc.).
- Comportamiento óptico (transparente, reflectante, absorbente, etc.).
- Comportamiento mecánico (duras, blandas, frágiles, etc.).
- Comportamiento magnético (ferromagnético, antiferromagnético, paramagnético, etc.).
- Naturaleza química (reactivo, inerte, catalítico, sensor, biocompatible, etc.).
- Etc.

4.1 Formación de películas delgadas.

Debido a las características ya mencionadas de las películas delgadas, es necesario emplear diferentes técnicas dependiendo de las necesidades o propiedades requeridas.

En la actualidad, existen diversos métodos de formación de películas delgadas que pueden clasificarse dependiendo de la naturaleza del proceso en:

- Procesos físicos: dentro de esta categoría se encuentran métodos de inmersión (dip-coating), por giro (spin-coating), evaporación térmica por láser, y evaporación térmica en vacío.

- Procesos químicos: dentro de esta categoría se encuentran métodos de deposición química de vapor (CVD), por plasma, por láser, térmica y formación de películas con solventes orgánicos.

4.2 Evaporación térmica.

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes técnicas gobernadas por procesos físicos o químicos, sin embargo, únicamente se va a describir la evaporación térmica por ser el método empleado en este trabajo.

Típicamente, las películas delgadas depositadas por evaporación térmica en vacío (PVD – Physical Vapor Deposition por sus siglas en inglés), involucran la deposición de moléculas o átomos en fase vapor sobre un sustrato sólido (Figura 7).

Esta metodología presenta diferentes variantes, pero la más común es la de resistencia calefactora (Figura 7). El depósito físico en fase vapor normalmente se hace en vacío de aproximadamente 10^{-5} Torr o superiores, en el cual, átomos o moléculas alcanzan a un sustrato desde una fuente térmica donde se evapora o sublima el material a depositar. Este proceso es uno de los más simples y antiguos en lo que respecta a la formación de películas delgadas. El material se coloca sobre un filamento hecho comúnmente de metales como el Molibdeno, Tungsteno o Tantalio calentado por una corriente eléctrica producida por una resistencia directa. Para un mayor control de la evaporación se recomienda realizar una curva de calentamiento progresiva.

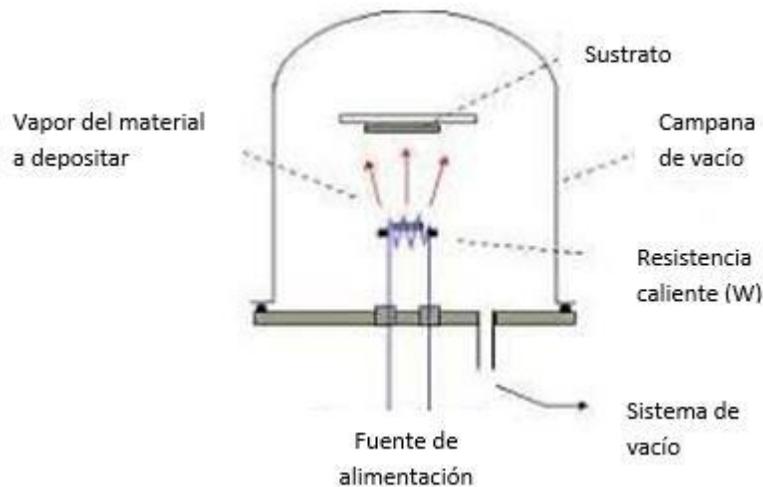


Figura 7. Esquema general de un sistema de evaporación térmica en vacío (PVD).

En la evaporación térmica en vacío las características finales del depósito se encuentran influenciadas por diferentes factores, como (Adachi & Wasa, 2012):

- La formación de las películas comienza con un proceso de nucleación aleatoria seguido de más etapas de nucleación y crecimiento.

- Estas etapas de nucleación y crecimiento dependen de diversas condiciones de deposición como la temperatura, la velocidad de crecimiento y las características fisicoquímicas del átomo o molécula evaporado, así como de la superficie del sustrato.
- La microestructura formada por la película, así como los defectos asociados, dependen de las características de deposición en la etapa de nucleación.
- La fase y la orientación cristalina se ven influenciadas por las condiciones de deposición.

El crecimiento de las películas presenta un mecanismo muy complejo, en el cual suceden una serie de etapas a nivel microscópico cuyo conjunto determina el modo de crecimiento, y finalmente, la morfología y las propiedades fisicoquímicas de la o las capas depositadas. La formación de una película por evaporación térmica en vacío se puede resumir en: transporte de masa del compuesto a la superficie del sustrato, adsorción del compuesto sobre la superficie del sustrato, difusión superficial del compuesto sobre el sustrato, y finalmente, la nucleación y crecimiento de la película.

5. Técnicas de caracterización por métodos microscópicos.

El ojo puede discriminar dos objetos si están situados no más de 0.1 mm entre ellos mirando desde una distancia de 25 cm. Este se conoce como el límite de resolución del ojo humano, y cualquier otro detalle más pequeño debe ser aumentado para ser visto.

El primer microscopio óptico fue diseñado por Anton Van Leeuwenhock en el año 1675, y fue considerado como un juguete científico al que se le dio el nombre de “vidrio de mosca”, ya que al inicio se utilizaba para observar insectos. Posteriormente el microscopio óptico fue recibiendo notables mejoras.

5.1 Microscopía óptica.

En la actualidad, la microscopia óptica de luz ha sido, y sigue siendo, de gran importancia para la investigación científica. El objetivo del microscopio es el de hacer distinguir los detalles estructurales de una muestra de interés y cuyo límite de resolución actual es de $\approx 2000 \text{ \AA}$ mediante la ampliación del ángulo visual a través de la lente óptica.

El límite de resolución se define como la mínima distancia por la que se pueden separar dos estructuras para que sigan apareciendo como dos objetos distintos. Dicha resolución depende de la longitud de onda de la luz utilizada y de la apertura numérica que posea el sistema de lentes empleado (Figura 8).

Actualmente, existen muchas derivaciones del microscopio óptico compuesto, como lo son:

- Estereomicroscopios
- De luz ultravioleta
- De fluorescencia

- De contraste de fases
- De campo oscuro
- De polarización
- Microscopia por luz reflejada.

Cada uno de ellos se han desarrollado para poder ser aplicados a necesidades diferentes en la investigación, pero el principio que los rige sigue siendo el mismo.

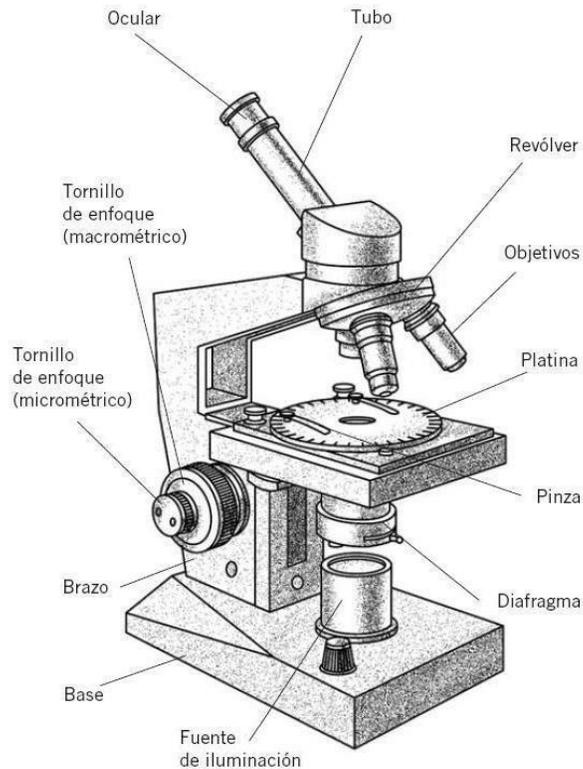


Figura 8. Esquema básico de un microscopio óptico de luz.

5.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico surgió como resultado de diversos experimentos y concepciones teóricas. Su origen se tiene en los experimentos de Sir J. J. Thomson quien estudió los rayos catódicos en tubos con gases raros. En el año 1924, de Broglie propuso su teoría de la naturaleza ondulatoria de las partículas, y años después, Busch demostró que un rayo de electrones atravesando un campo magnético o eléctrico converge al foco, dando lugar a la primera lente magnética en 1926 (Naik Kardile, 1975). Finalmente, Ernst Ruska y Max Knoll, un físico y un ingeniero eléctrico de la Universidad de Berlín, respectivamente, crearon el primer microscopio electrónico en 1931.

La microscopía electrónica de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy) por sus siglas en inglés es una de las técnicas más versátiles disponibles para la examinación y análisis de la microestructura, morfología y caracterización de la composición química de muestras sólidas. El microscopio electrónico de barrido se desarrolló poco después del microscopio electrónico de transmisión (TEM), pero tardó más en convertirse en un instrumento práctico para la investigación científica.

Hoy en día, los SEM superan en número el uso que los TEM y se utilizan en muchos campos, como, por ejemplo, la investigación médica, ciencias forenses y en la investigación de materiales, debido a su elevada resolución y a su gran profundidad de campo. En la Figura 9, se muestra el esquema de funcionamiento de un microscopio SEM.

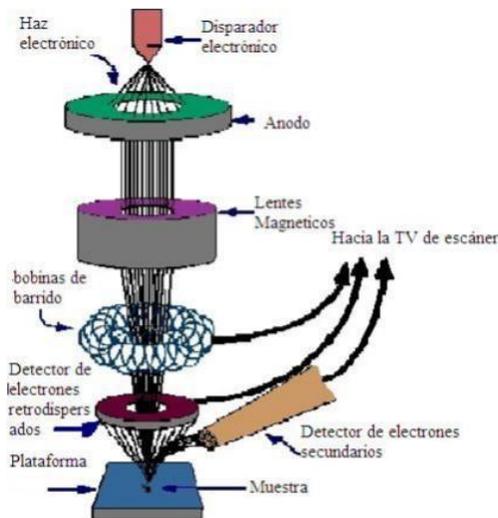


Figura 9. Esquema de funcionamiento un microscopio electrónico de barrido (SEM).

Las imágenes obtenidas por el SEM se generan por la interacción de un haz de electrones enfocado que barre un área determinada sobre la superficie de la muestra. Debido a la interacción entre los electrones y la muestra, se producen diferentes señales que en conjunto son transformadas en una señal visual de la muestra.

Las señales producidas por la interacción del haz de electrones con la superficie de la muestra pueden dividirse en dos grandes categorías: interacciones elásticas e interacciones inelásticas.

La dispersión elástica resulta de la desviación del electrón incidente por el núcleo atómico de la muestra o por electrones de valencia de energía similar. Este tipo de interacciones se caracterizan por una pérdida de energía insignificante durante la colisión del electrón con la muestra, y por un gran cambio direccional del electrón dispersado. Los electrones incidentes que se dispersan elásticamente a través de un ángulo de menos de 90° se denominan electrones retrodispersados y producen una señal cualitativa de zonas en el material con distinto número atómico. La intensidad de la señal de retrodispersados, para una energía dada del haz, depende del número atómico del material, por lo tanto, a mayor número atómico mayor intensidad, es por esto por lo que se puede distinguir fases de un material de diferente composición química.

La dispersión inelástica se produce a través de una variedad de interacciones entre los electrones incidentes, y los electrones y átomos de la muestra, que resulta en el electrón de haz primario transfiriendo energía sustancial a ese átomo. La cantidad de pérdida de energía depende de si los electrones de la muestra se excitan por separado o colectivamente, y de la energía de unión del electrón al átomo. Como resultado, el decaimiento de los electrones de la muestra durante la ionización conduce a la generación de electrones secundarios, que se definen convencionalmente como aquellos con energías menores a 50 eV. Estos electrones se pueden utilizar para tomar imágenes o analizar la morfología superficial de la muestra, es decir, mediante esta señal se obtiene una imagen más nítida de la superficie del material bajo estudio. Además de las señales que se utilizan para formar una imagen, se producen otras señales cuando un haz de electrones golpea una muestra, como la emisión de rayos X característicos (Figura 9) (W. Zhou, Apkarian, Wang, & Joy, 2007). En la Figura 10, se muestra un esquema del origen de las diferentes señales obtenidas por la interacción entre un haz de electrones y una muestra sólida.

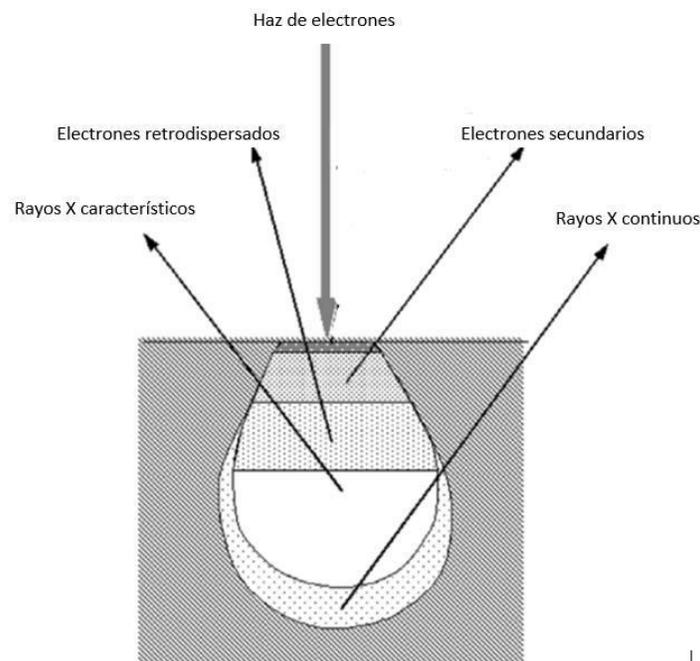


Figura 10. Imagen de las principales señales generadas por la interacción entre el haz de luz y la muestra en un SEM, y las regiones en donde las señales son producidas.

5.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La caracterización por microscopía de fuerza atómica o AFM (Atomic Force Microscopy por sus siglas en inglés), presenta múltiples usos y uno de los más útiles es el poder visualizar morfologías o propiedades superficiales a escala subnanométrica, ya que puede alcanzar resoluciones inferiores a un nanómetro. A diferencia de otros microscopios, el AFM puede obtener imágenes de todos los materiales, duros o blandos, sintéticos o naturales (incluidas estructuras biológicas como células o biomoléculas), independientemente de la opacidad o conductividad. Además, se pueden caracterizar muestras en diferentes medios como vacío, aire, o líquidos.

Una de sus grandes ventajas es que debido a que no existe el uso de lentes, los efectos de difracción e interferencia no influyen en la resolución del equipo. La morfología de la superficie no se percibe de la manera habitual, es decir, por líneas de visión, reflejos o sombras. Por el contrario, en cada punto o píxel dentro de una imagen se realiza una medición de la altura real de la superficie por medio de la detección de fuerzas muy pequeñas (del orden de nano Newtons) entre una punta afilada y los átomos de una superficie. Esto es, el AFM proporciona una imagen real tridimensional de la interfase de una muestra. Para ello, la punta se barre a lo largo de la superficie a distancias subnanométricas, y se detectan las desviaciones debidas a la atracción o repulsión de los átomos subyacentes. Se podría decir que el AFM es un “microscopio ciego”, ya que en esencia se utiliza el contacto físico para obtener imágenes de una superficie (Haugstad, 2012) (Figura 11).

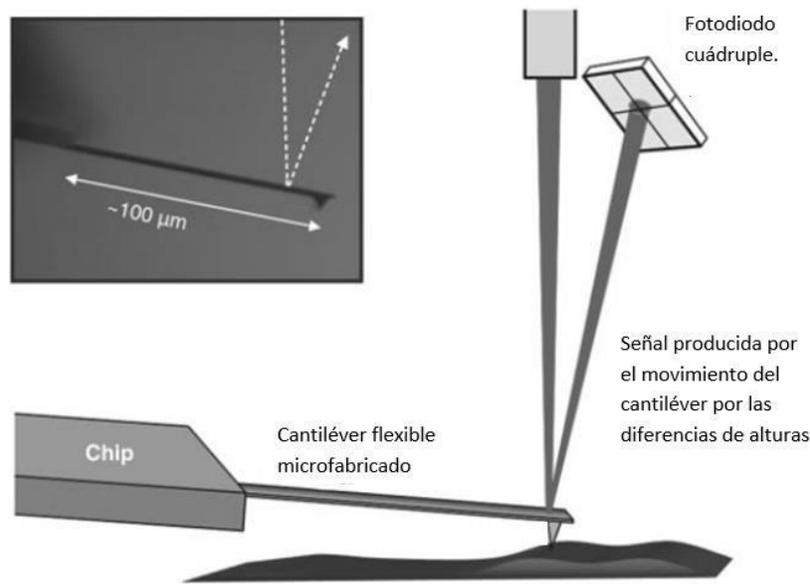


Figura 11. Esquema básico del funcionamiento de un AFM.

La información de la altura se ve reflejada en una escala de colores arbitrarios en donde por convención, zonas oscuras corresponden a áreas de baja altura, y zonas claras a relieves en la superficie.

De los diferentes modos de trabajo con los que cuenta el AFM, uno de los más usados en la investigación de superficies es el modo intermitente o “tapping”. En este modo, la punta oscila perpendicularmente a la muestra en su frecuencia de resonancia con amplitud libre. Cuando la punta se acerca a la superficie de la muestra, la amplitud decrece debido a la interacción entre la punta y la muestra. En este modo de trabajo la punta interactúa intermitentemente con la superficie disminuyendo el tiempo de contacto entre ambas partes. Con este modo de análisis, se eliminan las fuerzas laterales y de presión que pueden dañar muestras suaves y ocasionar una reducción en la resolución de la imagen.

Las imágenes obtenidas por el AFM ofrecen información morfológica de gran relevancia ya que permite la observación clara de los relieves de la muestra y, por lo tanto, proporciona una excelente estimación de la rugosidad. Esta información es de gran utilidad ya que muchas

propiedades físicas de las superficies están íntimamente ligadas a la textura de la superficie o su corrugación.

6. Técnicas de caracterización por métodos espectroscópicos.

La ciencia conocida como espectroscopía es la rama de la física que se ocupa del estudio de la radiación absorbida, reflejada, emitida o dispersada por una sustancia. Aunque estrictamente hablando, el término radiación se refiere exclusivamente a los fotones (radiación electromagnética), la espectroscopía también involucra las interacciones de otros tipos de partículas como neutrones, electrones y protones que se utilizan para investigar la materia.

El espectro electromagnético se divide tradicionalmente en siete regiones divididas en: ondas de radio, microondas, infrarroja, luz visible, ultravioleta, rayos X y rayos γ (Figura 12). Todas estas radiaciones tienen en común el hecho de que se propagan a través del espacio como ondas electromagnéticas transversales, y a la misma velocidad, $c \approx 3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$ en vacío (Gacía Solé, Bausá Lopez, & Jaque Garcia, 1996).

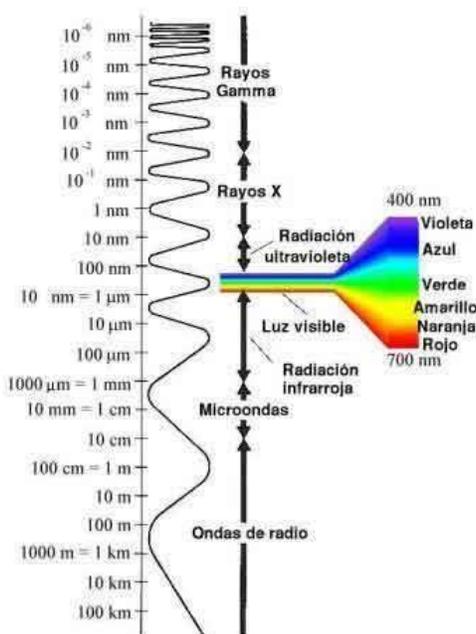


Figura 12. Espectro electromagnético utilizado en el estudio de la espectroscopía.

Los límites entre las diferentes regiones están fijados por convención más que por discontinuidades agudas de los fenómenos físicos involucrados.

Diferentes técnicas espectroscópicas operan en diferentes rangos de frecuencia limitados dentro de este amplio espectro, dependiendo de los procesos y magnitudes en los cambios de energía involucrados. Por ejemplo, a frecuencias bajas y longitudes de onda más largas que el visible, los movimientos vibratorios de los átomos en moléculas o sólidos pueden ser alterados por absorción o emisión de radiación infrarroja. A frecuencias más altas pueden ocurrir transiciones electrónicas dentro de los átomos. Para las transiciones que implican capas externas (valencia), la energía asociada generalmente se encuentra en las regiones visible y ultravioleta.

6.1 Espectroscopia UV-Vis

Uno de los métodos más simples y agradables para determinar la presencia o ausencia de un analito es por medio de un cambio en la absortividad molar o en el color del sistema, cuyos electrones ubicados en los niveles de energía externos implican transiciones en un rango entre 1 – 6 eV, aproximadamente. Estos electrones se denominan comúnmente electrones de valencia, y pueden excitarse con radiación ultravioleta (UV), visible (Vis) o incluso infrarroja cercano (IR). Este rango de operación se conoce como espectroscopía ultravioleta-visible (Gacía Solé et al., 1996).

Las perturbaciones que afectan la absorción óptica de una molécula pueden clasificarse ampliamente en dos grupos, a saber:

- Las que surgen de un cambio en la estructura molecular del huésped, como la formación / ruptura de enlaces covalentes o cambios en la conformación.
- Resultado de cambios más sutiles en la esfera externa de la estructura electrónica de un cromóforo inducido por la complejación del huésped, por ejemplo, la solvatación (Bernhardt & Moore, 2003).

En la caracterización por espectroscopía ultravioleta-visible se usa el espectro electromagnético en el rango de longitudes de onda desde 200 a 800 nm, aproximadamente. Esta técnica es útil para identificar las transiciones electrónicas en diferentes moléculas, para identificar la presencia de compuestos, y para el análisis cuantitativo de moléculas específicas en una muestra. Los 4 tipos de transiciones básicas que se llevan a cabo en el espectro ultravioleta-visible son:

- Promoción de un electrón de un orbital localizado en un átomo a un orbital localizado de mayor energía en el mismo átomo. La banda de absorción asociada a veces se conoce como una banda de excitón.
- Promoción de un electrón de un orbital localizado en un átomo a un orbital localizado de mayor energía en un átomo adyacente. Las bandas de absorción asociadas se conocen como espectros de transferencia de carga. Las transiciones suelen ser “transiciones permitidas” de acuerdo con las reglas de selección espectroscópicas, y por lo tanto, las bandas de absorción son internas.
- La promoción de un electrón de un orbital localizado en un átomo a una banda de energía deslocalizada, la banda de conducción, que es característica de todo sólido. Sin embargo, en muchos materiales la energía necesaria para causar tal transición es muy alta.
- La promoción de un electrón de una banda de energía localizada en la banda de valencia, a otra banda de mayor energía en la banda de conducción (West, 2014).

El espectrofotómetro ultravioleta-visible opera con dos fuentes de energía emisoras de un haz de luz, donde la primera es una lámpara de deuterio que emite para la región ultravioleta (200 – 400 nm, aproximadamente), y la segunda es generalmente de tungsteno que se utiliza para generar el haz de luz correspondiente a la región visible (400 – 800 nm, aproximadamente); un monocromador separa las diferentes longitudes de onda contenidas en el haz que permite el paso

de sólo un haz con una longitud de onda específica. Así, cuando el haz incide en la muestra una cierta cantidad de luz incidente pasará a través de ella, y otra será absorbida (Figura 13).

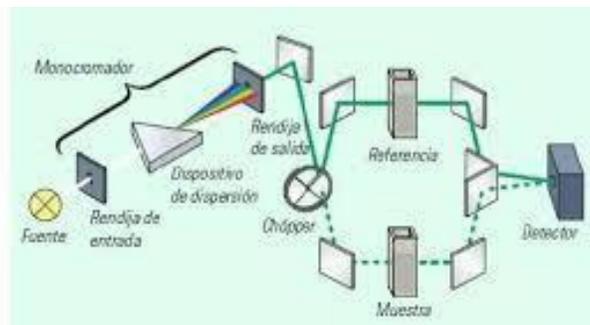


Figura 13. Esquema básico de un espectrofotómetro UV-Visible

El detector y sistema de medición obtienen la intensidad del haz después de su interacción con la muestra, y la comparan con la intensidad originalmente suministrada con una referencia específica denominada comúnmente “blanco”.

Además, la espectroscopia UV-Visible también se utiliza ampliamente en la química analítica para determinar las concentraciones de analitos responsables de un pico de absorción particular. La ley de Lambert-Beer describe la relación entre la absorbancia (A), la absorción molar o coeficiente de extinción (ϵ) de la especie en la longitud de onda específica responsable de la absorción y la concentración (c) de la especie absorbente de la siguiente manera:

$$A = \epsilon cl = \log(I_0/I)$$

Donde, l es la longitud del trayecto o espesor de la muestra, I_0 es la intensidad del haz incidente y I es la intensidad del haz transmitido. Por lo tanto, con una calibración adecuada, se pueden determinar las concentraciones del analito bajo estudio.

6.2 Espectroscopía Infrarroja

La espectroscopia infrarroja (IR) ha sido y es de utilidad para diferentes ramas de la investigación científica. El primer espectro de vibraciones moleculares fue observado en 1881 por Abney y Festing obteniendo el espectro de 48 líquidos orgánicos, en donde encontraron bandas características que asociaron a la presencia de hidrógeno en las moléculas.

Durante la segunda guerra mundial, las necesidades de determinación de la composición de la materia prima para la producción comercial de goma sintética estimularon el desarrollo de la espectrometría IR, lo que permitió la construcción de los primeros equipos de IR comerciales (West, 2014).

En la técnica de espectroscopia infrarroja o IR, la frecuencia de la radiación incidente es variada y se obtiene la radiación absorbida o transmitida por la muestra. El proceso es simple, ya que el grupo funcional local o enlace covalente responsable de la absorción se promueve a un nivel de vibración más alto por la cantidad de energía absorbida debido a que los átomos en los sólidos vibran a frecuencias de aproximadamente $10^{12} - 10^{13}$ Hz. Por lo tanto, los estados vibracionales

pueden ser excitados a estados de mayor energía por radiación en este rango de frecuencia, es decir, radiación infrarroja. La espectroscopía infrarroja es una técnica vibracional bastante utilizada para caracterizar los modos vibracionales de moléculas (Gacía Solé et al., 1996).

Los espectros se utilizan mucho para identificar grupos funcionales característicos, especialmente en moléculas orgánicas.

Para el uso de la espectroscopia IR se deben de tomar en consideración las características más relevantes de los espectros vibracionales, como lo son:

- Si dos moléculas están constituidas por átomos distintos, tienen distinta distribución isotópica, diferente configuración o se encuentran en ambientes distintos, los espectros infrarrojos serán distintos.
- Una sustancia definida puede identificarse por su espectro infrarrojo. Estos espectros pueden ser considerados técnicas de identificación de dicha sustancia o sus contaminantes.
- Los espectros muestran bandas que son típicas de grupos funcionales particulares, y que tienen localizaciones específicas dentro de los espectros de IR.
- A partir de un espectro se pueden inferir las estructuras moleculares.
- Las intensidades en las bandas del espectro de una mezcla son generalmente proporcionales a las concentraciones de los componentes individuales.
- El análisis de muestras por IR puede llegar a ser, dependiendo de las condiciones, una técnica no destructiva para la muestra.

7. Técnicas de detección y cuantificación de aminoácidos.

Existen métodos para la determinación del contenido total de aminoácidos en una muestra. Los diferentes procedimientos que se utilizan se fundamentan en las propiedades químicas y físicas de los aminoácidos que les confieren características diferenciales respecto de otras biomoléculas. Es necesario mencionar que al momento de querer detectarlos o cuantificarlos, por lo general, los aminoácidos no presentan una característica física que sea fácilmente medible. Por lo anterior, las técnicas para la determinación de aminoácidos totales se fundamentan en hacerles adquirir una característica medible. Generalmente se utilizan métodos químicos para desarrollar compuestos derivados de aminoácidos que puedan absorber energía en la región ultravioleta-visible del espectro electromagnético.

Los reactivos que se utilizan para la determinación de los aminoácidos totales son aquellos capaces de reaccionar con los grupos funcionales característicos de estas moléculas, en específico la presencia de los grupos carboxilo y amino en el carbono- α , de manera que los métodos generales de determinación de todos los aminoácidos se fundamentan en el uso de compuestos que reaccionen con dichos grupos. De esta manera, los aminoácidos adquieren una característica

que puede medirse y además, es proporcional a la cantidad de aminoácido presente en una muestra.

Existen varios compuestos que reaccionan con los aminoácidos de manera específica confiriéndoles características apropiadas para su detección. Estos reactivos provocan la aparición de derivados de aminoácidos coloridos, fluorescentes o radioactivos, y pueden utilizarse tanto con fines cualitativos como cuantitativos. Dentro de los métodos químicos más comunes para la determinación de aminoácidos totales contamos con:

- Método de la ninhidrina o purpura de Ruhemann
- Reacción de Sanger
- Reacción del fenilisotiocianato
- Método del o-ftaldehído
- Reacción de la fluorescamina
- Reacción del cloruro de dansilo

7.1 Formación de purpura de Ruhemann por ninhidrina.

El método de la ninhidrina permite la determinación de aminoácidos que presentan un grupo carboxilo y un grupo amino libres. Es una reacción general para todos los aminoácidos, excepto para la prolina y la hidroxiprolina (Roca, Oliver, Rodríguez., & ..., 2003)

La ninhidrina (hidrato de tricetohidrindilideno) reacciona con los aminoácidos preferentemente en medio ácido y en calor, produciendo agua, dióxido de carbono y el complejo purpura de Ruhemann (dicetohidrindilideno) (Figura 14). Este compuesto de color azul-purpura absorbe a una longitud de onda de 570 nm, siendo la cantidad de color proporcional a la cantidad de aminoácido presente en la muestra.

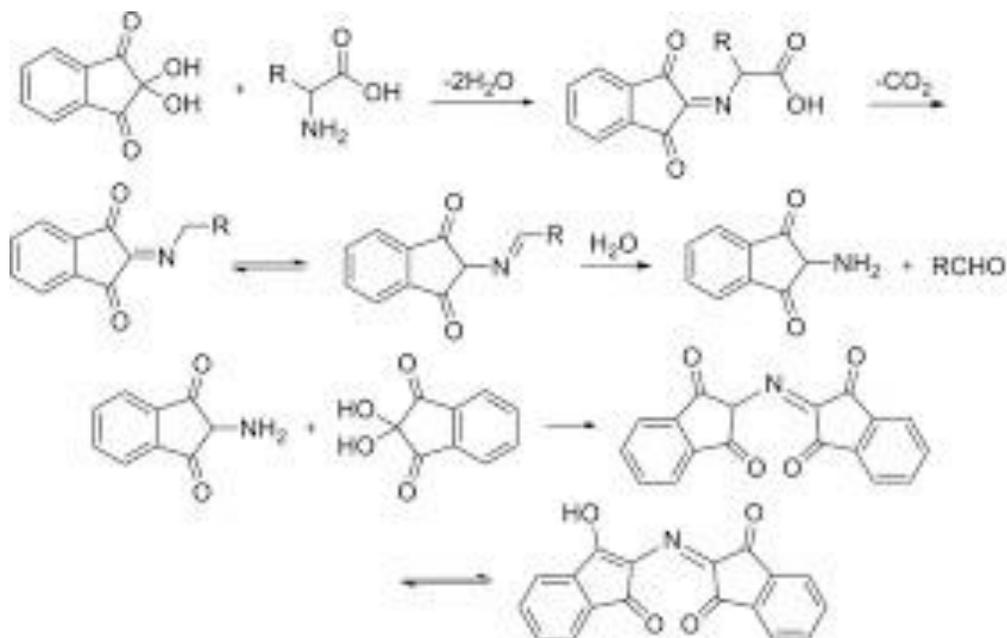


Figura 14. Mecanismo de reacción para la formación del purpura de Ruhemann.

La mayoría de los aminoácidos reaccionan con la ninhidrina a temperatura ambiente formando un complejo azul que adquiere una tonalidad púrpura. La determinación de la concentración de aminoácidos requiere, generalmente, de la previa formación de una curva de calibración con concentraciones conocidas de aminoácidos para la generación de una relación lineal que nos permita calcular la concentración en el rango de trabajo establecido.

8. Otras técnicas de análisis.

8.1 Evolución cinética usando QCM.

Medir longitudes y masas fueron probablemente los primeros desafíos de la humanidad. Los dibujos que muestran el equilibrio de vigas con brazos de igual longitud se pueden ver en un papiro de 3500 años del antiguo Egipto, y durante el siglo XIX esta forma de medición por equilibrios logró una sensibilidad relativa (Sensibilidad/carga máxima) de 10^{-9} .

En 1959, Sauerbrey introdujo un nuevo método para mediciones de masa. En lugar de medir el ángulo de inclinación de una balanza o el desplazamiento en caso de una balanza de resorte, utilizó el cambio en la frecuencia de un resonador de cuarzo. Por lo tanto, le fue posible detectar incluso cambios de 10^{-16} Kg. Su desarrollo generó lo que hoy se conoce como la microbalanza de cuarzo o QCM (Quartz Crystal Microbalance por sus siglas en inglés), demostrando la naturaleza extremadamente sensible de estos dispositivos piezoeléctricos hacia los cambios de masa en la superficie de los electrodos de una QCM (Figura 15).

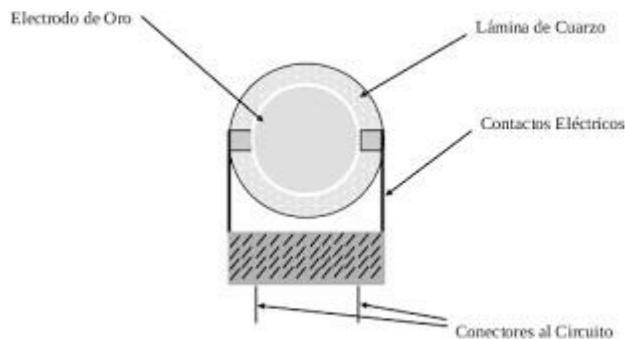


Figura 15. Esquema del cristal de cuarzo en una QCM.

Los resultados de su trabajo quedaron incorporados en la ecuación que lleva su nombre, y que relaciona el cambio de masa por unidad de área en la superficie del electrodo QCM con el cambio observado en la frecuencia de oscilación del cristal: ("Quartz Crystal Microbalance Digital Controller," 2010)

$$\Delta f = -C_f \cdot \Delta m$$

Donde,

ν = cambio observado en la frecuencia (en Hz)

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

C_f = Factor de sensibilidad del cristal ($56.6 \text{ Hz } \mu g^{-1} \text{ cm}^2$ para un cristal de 5 MHz a temperatura ambiente. Dato del fabricante.)

Los cristales de cuarzo se usan debido a sus propiedades mecánicas y piezoeléctricas superiores. También, pueden ser cortados para dar coeficientes de temperatura cercanos a cero a temperatura ambiente, permitiendo excluir de las variables a la temperatura, la cual podría influir en la resonancia de la QCM modificando sus parámetros. Los cristales de cuarzo cuentan con electrodos en forma de orificios de llave en ambas caras (la parte trasera, además, cuenta con dos medias lunas), y están formadas por películas de oro o plata depositadas al vacío de aproximadamente 150 nm de espesor. El área sensible a la masa está situada en la parte central del resonador, cubriendo aproximadamente el área donde se superponen los dos electrodos y siguiendo una distribución gaussiana partiendo del centro. (Figura 16) (Mecea, 2006).

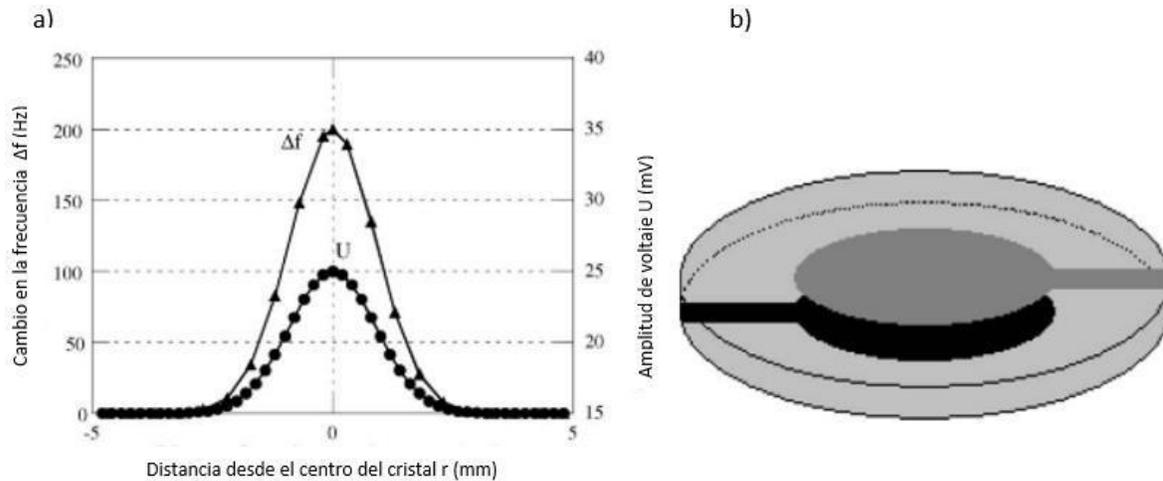


Figura 16. a) comportamiento gaussiano de la sensibilidad del cristal de cuarzo. b) cristal de cuarzo con electrodos de oro.

Por muchos años, la QCM fue utilizada sólo para detectar los cambios en masa de sustancias en fase gaseosa, sin embargo, recientemente su aplicación ha sido extendida desde que los científicos notaran que podía ser operada en contacto con líquidos y materiales viscoelásticos. El desarrollo de sistemas QCM para su uso en fluidos abrió un nuevo mundo de aplicaciones (Figura 17).

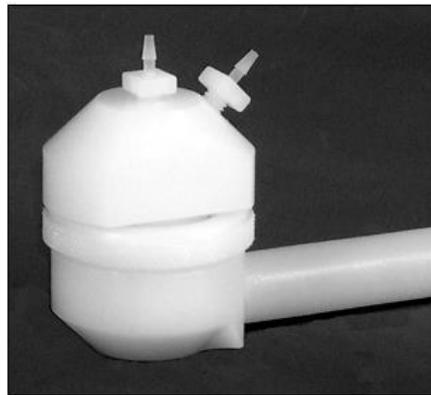


Figura 17. Sistema de acoplamiento a una QCM para su uso con fluidos.

El uso de la QCM en contacto con líquidos se ha enfocado en el estudio de los cambios en las propiedades de masa durante los procesos físicos, químicos y electroquímicos de la superficie de la muestra. Cuando el cristal de cuarzo está en contacto con un líquido, la amplitud de vibración y la aceleración decaen exponencialmente. Sin embargo, la aplicación de sensores QCM en líquido ha proporcionado nuevas posibilidades analíticas para la industria química, la protección del medio ambiente, la biotecnología y la medicina, entre otros.

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

Los polímeros orgánicos comprenden el tipo de recubrimiento más común utilizado en la QCM debido a su capacidad de absorber moléculas. Cuando el cristal de cuarzo recubierto por la película orgánica está en contacto con un líquido, la rugosidad o grietas generadas por la película depositada pueden atrapar moléculas del líquido, que vibrarán con la misma amplitud y aceleración que la superficie del cristal de cuarzo. Estas moléculas atrapadas exhibirán un comportamiento de película sólida, produciendo un cambio de frecuencia adicional (X. C. Zhou, Ng, Chan, & Li, 1997).

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

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

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

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

Además, en el uso de la QCM con líquidos se deben de considerar, para minimizar los errores que los fluidos en estudio puedan presentar, la preparación de los líquidos con cuidado para su inyección al sistema evitando cambios en la temperatura, el flujo de inyección, en las propiedades del disolvente y evitando la formación de burbujas de aire que pueden afectar la señal del sensor.

8.2 Interacciones locales por DFT.

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

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

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

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

Aunque existen muchos programas que permiten el uso de la técnica DFT para cálculos moleculares, el programa Gaussian es uno de los más empleados por su sencillez y buenos resultados. Cabe señalar que Gaussian está diseñado para estudiar sistemas en fase gaseosa y en solución, en el estado fundamental y estados excitados; lo que permite explorar áreas de interés químico como efectos del sustituyente, mecanismos de reacción, superficies de energía potencial, energías de excitación, energías de enlace, etc. Además, tiene incorporadas muchas librerías que permiten escoger diferentes funcionales y bases para adecuar mejor las simulaciones al sistema de trabajo (Báez, 2019).

ANTECEDENTES.

La necesidad de tener nuevas técnicas para la detección de aminoácidos es un tema que en la actualidad ocupa un sitio de interés muy importante principalmente en la investigación de dispositivos médicos, debido a la importancia que los aminoácidos representan en el estudio de la salud humana y en la industria de los alimentos.

Normalmente pensamos que los aminoácidos no constituyen un problema en la salud, pero como se ha mencionado con anterioridad, los aminoácidos han constituido el centro de atención en varios síndromes metabólicos. Por otro lado, en la industria alimenticia no están considerados como componentes de contaminación, sin embargo, se ha vuelto fundamental conocer su concentración en ciertos alimentos.

Es por ello, por lo que han sido varias las líneas de investigación centradas en este propósito usando una gran cantidad de moléculas con el objetivo de detectar, o en su defecto, adsorber ciertos aminoácidos. Por ejemplo, Belhamdi y colaboradores (Belhamdi, Merzougui, Trari, & Addoun, 2016) desarrollaron una manera de utilizar carbón activado para la adsorción de L-fenilalanina por medio de la previa preparación del carbón activado con KOH y ZnCl₂. Después de su preparación e interacción con el aminoácido, llevaron una caracterización por medio de microscopía electrónica de barrido, espectroscopía FT-IR y con isotermas de adsorción-desorción de N₂, demostrando que el carbón activado preparado de esta manera presentaba una gran adsorción en solución básica con NaOH.

El carbón activado no ha sido el único material ocupado para medir su capacidad de adsorción/absorción de aminoácidos. La mayoría de los estudios se realizan con aminoácidos específicos, como las lisinas metiladas postraduccionales, con las cuales se han realizado estudios utilizando diferentes receptores sintéticos como los calixarenos, carboxicalixarenos, ciclofanos y por su puesto los resorcinarenos (Gruber, 2018). Son estos últimos, de interés en el presente trabajo, los que en las últimas décadas han adquirido relevancia debido a su gran capacidad de funcionalización, la cual los ha llevado a utilizarse en la investigación científica e industrial. Su uso en técnicas de separación química ha sido muy socorrido, principalmente en la cromatografía de líquido de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases (GC), electroforesis capilar (CE) y cromatografía iónica (IC) debido a su enorme capacidad de funcionalización, y por lo tanto, de brindarle especificidad para ser utilizados como fase estacionaria en las técnicas anteriores (Li et al., 2014).

Otra de sus grandes aplicaciones es en el desarrollo farmacéutico, donde han sido utilizados como agentes de solubilización para diferentes principios activos, debido a que han sido funcionalizados en sus bordes superiores e inferiores dándole propiedades hidrofílicas. Las formas farmacéuticas formadas tienen la capacidad de entregar el principio activo por medio de un estímulo externo. De acuerdo con algunos estudios, los resorcinarenos demostraron ofrecer una serie de ventajas en comparación con otros agentes de solubilización, que incluyen su facilidad de síntesis y modificación, su baja toxicidad comparado con las ciclodextrinas que actualmente son las más utilizadas. Estas ventajas son críticas si van a ser utilizados en formulaciones farmacéuticas.

Además, se ha descrito que los resorcinarenos presentaron actividad antibacterial, antifúngica, antiviral y anticancerígena (Hoskins & Curtis, 2015).

Todas estas aplicaciones han generado un gran interés en estas moléculas y su rápida expansión a diferentes áreas de aplicación utilizándose como sensores, generalmente en forma de películas delgadas obtenidas por diferentes métodos, para el reconocimiento de un gran número de moléculas.

Algunos trabajos se han centrado en el reconocimiento y detección de compuestos orgánicos volátiles y contaminantes como cloroformo, benceno, tolueno y etanol utilizando análisis de UV-Vis y QCM, entre otros, para su estudio (Özbek et al., 2011). También se han utilizado para detectar diferentes moléculas orgánicas aminadas entre ellas los aminoácidos. Stone y colaboradores (Stone, Franz, & Lebrilla, 2002) encontraron la existencia de complejos de inclusión no covalentes formados entre aminoácidos y derivados de resorcinarenos por medio de la observación con espectrometría de masas MALDI. Entre sus resultados, encontraron que los derivados de resorcinareno que contenían sustituyentes como éster metílico, etílico y propílico produjeron complejos de aminoácidos para casi todos los 20 aminoácidos en análisis de tiempo de vuelo (TOF). Después de sus experimentos, llegaron a la conclusión por medio del análisis de espectrometría de masas por transformada de Fourier (FTMS), que sólo los aminoácidos más básicos arginina, histidina, y lisina formaron complejos estables.

Uno de los estudios más importantes fue realizado por Hassen y colaboradores (Hassen et al., 2007), quienes utilizaron dos diferentes resorcinarenos depositados sobre superficies de oro para su estudio junto con arginina y lisina en soluciones a pH de 5.5 y 7, para encontrar las condiciones que favorezcan más la interacción. Para su análisis utilizaron SEM, FT-IR, voltametría cíclica y espectroscopia de impedancia, llegando a la conclusión de que recubrir una superficie de oro con un resorcinareno aumenta la sensibilidad del resorcinareno como sensor, a la vez que disminuye considerablemente el límite de detección.

Como podemos ver, varias han sido las investigaciones que presentan a los resorcinarenos como posibles sensores de aminoácidos, sin embargo, en la mayoría de ellas se han utilizado para un número específico y arbitrario de aminoácidos, además de utilizar condiciones de pH que difícilmente se pueden comparar con condiciones fisiológicas. Por lo anterior, en el presente estudio se buscó utilizar cuatro aminoácidos representantes de las cuatro principales clases para su estudio en pH fisiológico, y se emplearon siete técnicas diferentes para su caracterización y análisis tratando de realizar un proceso experimental rápido y de bajo costo, apegándose a las características que se buscan de un sensor.

OBJETIVO GENERAL.

Formar y caracterizar películas delgadas de un resorcinareno de nueva síntesis para ser empleadas en la detección de Glicina (Gly), L-glutamato (Glu), L-lisina (Lys) y L-serina (Ser).

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Emplear la técnica de evaporación térmica para la obtención de películas delgadas de resorcinareno.
- Utilizar un resorcinareno de nueva síntesis (“dodecanal”) para analizar su capacidad de interacción con los aminoácidos.
- Utilizar cuatro aminoácidos que pertenezcan a diferentes clasificaciones de acuerdo con sus características estructurales, a saber, Glicina (Gly), L-glutamato (Glu), L-lisina (Lys) y L-serina (Ser).
- Exponer las películas previamente caracterizadas a soluciones de 0.1 M de cada aminoácido, para posteriormente analizar los cambios provocados por esta exposición.
- Mediante las técnicas de microscopía óptica, AFM y SEM observar los cambios morfológicos antes y después de la exposición.
- Mediante la técnica de espectroscopía UV-Vis, caracterizar las películas delgadas antes de la exposición y observar los cambios generados en el espectro después de la exposición a los aminoácidos.
- Llevar a cabo el análisis cuantitativo de la cantidad de aminoácido adsorbido por la película del resorcinareno por medio de la formación del purpura de Ruhemann con ninhidrina.
- Realizar el análisis espectroscópico de IR para comprobar la estructura del resorcinareno, y la presencia de los aminoácidos después de la interacción.
- Medir la capacidad de adsorción por medio de un estudio dinámico en QCM.
- Realizar un análisis DFT para investigar la interacción entre los aminoácidos con el resorcinareno.

HIPÓTESIS.

Después de la exposición de películas delgadas de resorcinareno a cuatro diferentes aminoácidos (Glicina (Gly), L-glutamato (Glu), L-lisina (Lys) y L-serina (Ser)) se observarán cambios detectables en las propiedades químicas, ópticas y morfológicas de las películas.

METODOLOGÍA

1. Compuesto Utilizado.

Para este trabajo se empleó un calix[4]resorcinareno de nueva síntesis proporcionado por el Dr. Marcos Martínez del Instituto de Química de la UNAM. El nombre asignado fue el de Dodecanal que hace referencia a que se encuentra sustituido por cadenas alifáticas de 12 átomos de carbono cuya estructura se muestra en la Figura 18. Se nos proporcionaron los datos de un peso molecular= 1119.71 g/mol, y una fórmula química= $C_{73}H_{114}O_8$.

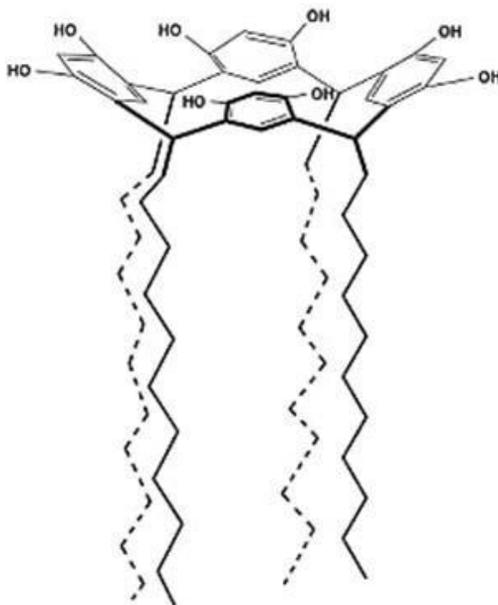


Figura 18. Estructura química del calix[4]resorcinareno de nueva síntesis denominado dodecanal.

2. Preparación de sustratos.

Los sustratos utilizados para la formación de películas fueron PET ópticamente inactivo en el visible con un agente adhesivo, vidrio y cristales de cuarzo como sustratos. En el caso del PET, se empleó esta opción, ya que por experiencias previas con depósitos de resorcinarenos, se observó que la adhesión de las películas no era muy fuerte en el vidrio, y al introducirlas en las soluciones de aminoácidos, éstas se desprendían fácilmente. Así entonces, esta opción nos permitía, si se observaba desprendimiento de película en el vidrio, tener una película fuertemente adherida a una superficie para los experimentos posteriores.

Los dos últimos sustratos necesitaron un tratamiento de limpieza para depositar el resorcinareno.

2.1 PET.

En el laboratorio, se utilizó PET ópticamente inactivo en el visible y con un agente adhesivo no mencionado por el fabricante. Las láminas de PET contaban con una mica protectora para la parte del adhesivo, por lo que se cortaron piezas de 2.5 x 1 cm teniendo cuidado en todo momento de no maltratar el material. Posterior a ello, se retiró la mica protectora y se procedió a colocarlos en una base del equipo de evaporación térmica.

2.2 Vidrio.

El vidrio utilizado fue cortado en el laboratorio a partir de porta muestras, cortándolos a un tamaño aproximado de 2.5 x 1 cm. Dichos sustratos debían de estar libres de polvo y residuos orgánicos con el fin de evitar defectos en las películas que pudieran interferir con las mediciones realizadas, y con el comportamiento general del experimento. La limpieza de estos sustratos consistió en el uso de una solución “piraña”, la cual es una mezcla de ácido sulfúrico (H_2SO_4) con peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Para el lavado, se realizó lo siguiente:

- a. Medir en proporción 3:1 el H_2SO_4 y el H_2O_2 respectivamente, para un total de 100 mL
- b. Agregar lentamente y de manera constante, el peróxido de hidrógeno al ácido sulfúrico mezclando regularmente.
- c. La disolución “piraña” fue agregada lentamente a los sustratos, colocados en un vaso de precipitado evitando empalmarlos entre ellos, hasta llegar a cubrirlos completamente, manteniendo la temperatura constante a 70 °C aproximadamente durante 30 minutos
- d. Al terminar el calentamiento, se retiraron los sustratos de la solución y se lavaron con agua mili-Q
- e. Posteriormente, se colocaron en un recipiente con agua mili-Q hasta cubrirlos y éste se introdujo en un baño sónico durante 5 minutos.
- f. Por último, se secaron con aire comprimido y guardaron en cámaras de vacío para evitar su contaminación hasta el día de su uso.

2.3 Cuarzo.

El cristal de cuarzo utilizado para la microbalanza QCM 200 fue el sugerido por el fabricante (Stanford Research Systems), y correspondió a cristales de cuarzo con electrodos de oro en geometría AT-cut estampados en ambos lados, con una frecuencia de resonancia de 5 Mhz y un diámetro de 1 pulgada, como se puede observar en la Figura 19.

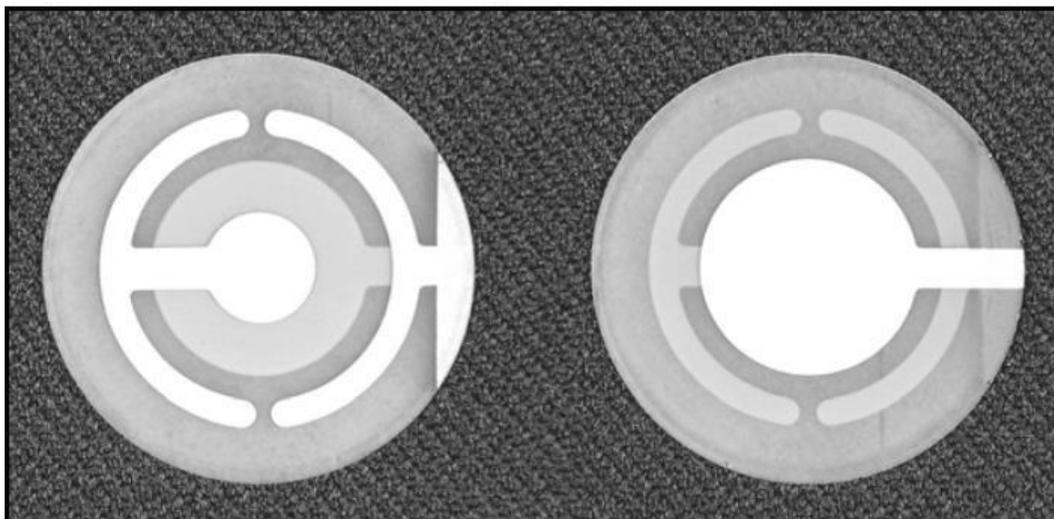


Figura 19. Cristal estándar utilizado en la QCM 200. El cristal de la izquierda muestra la superficie con los electrodos en media luna para el contacto eléctrico, mientras que el de la derecha muestra la superficie de trabajo en contacto con las muestras líquidas

Para su adecuada limpieza y de acuerdo con las instrucciones del fabricante, fue necesario colocarlos en una base de limpieza que está diseñada específicamente para la inmersión en un vaso de precipitados de 100 ml (Figura 20), para posteriormente dejarlas en contacto con la solución piraña por un tiempo máximo de 10 minutos. A tiempo mayores, los electrodos de oro pueden verse afectados.

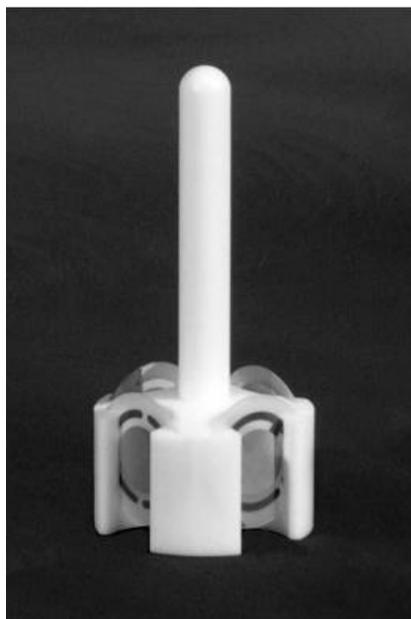


Figura 20. Base de limpieza de los cristales. Toda la pieza está hecha de teflón y se muestra sosteniendo su carga máxima de 4 cristales.

Posterior al tiempo de contacto con piraña, se procedió a lavarlos en un flujo de agua mili-Q. Para terminar la limpieza, se introdujeron en un baño sónico por 5 minutos y se secaron con aire comprimido.

3. Formación de películas.

La formación de las películas necesarias para los procesos experimentales se llevó a cabo por medio de la evaporación térmica en vacío.

3.1 Evaporación térmica.

Se utilizó la evaporadora térmica VCM600 V3 en donde los sustratos de pet, vidrio y cuarzo fueron colocados en un soporte a una distancia de 6 cm de un bote de evaporación, en el cual previamente se colocaron 25.5 mg de dodecanal.

La presión de la cámara de vacío fue del orden de 10^{-5} mbar, manteniéndose los sustratos a temperatura ambiente (25 °C, aproximadamente).

Tras finalizar el proceso y después de que la pérdida de vacío lo permitiera, los sustratos con la película evaporada se almacenaron en recipientes cerrados, y posteriormente, en un desecador para prevenir su contaminación antes de su caracterización.

La Figura 21 muestra el equipo de evaporación utilizado en el proyecto.

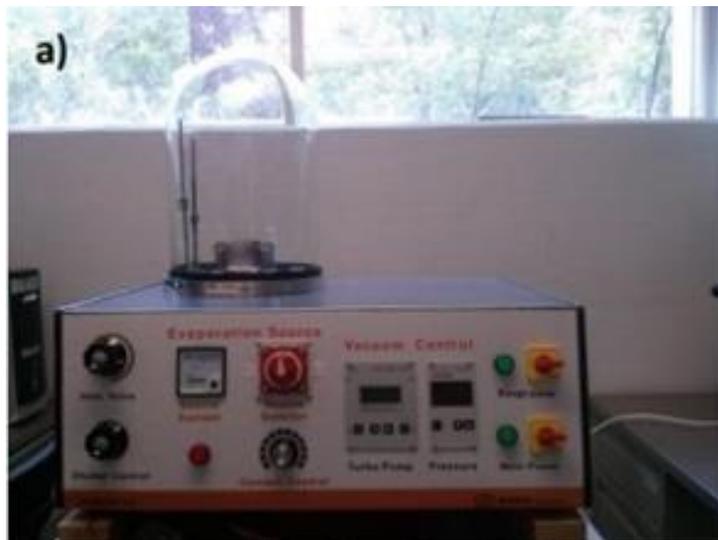


Figura 21. Imagen de la evaporadora VCM600 V3 utilizada para este proyecto.

4. Preparación de soluciones.

Las soluciones utilizadas en los experimentos fueron preparadas en el laboratorio utilizando compuestos adquiridos a Sigma-Aldrich, haciendo un total de seis soluciones diferentes.

4.1 Buffer de fosfatos.

Se utilizó ácido fosfórico (H_3PO_4) y fosfato trisódico (Na_3PO_4) para preparar una solución a pH 7 de acuerdo con la ecuación de Henderson Hasselbalch, sabiendo que el valor de pKa es de 7.4 y que la concentración a preparar es de $5 \times 10^{-3} M$ para un total de 2 L.

$$pH = pKa + \log \frac{[Base]}{[Ácido]} \qquad 7 = 7.4 + \log \frac{[Na_3PO_4]}{[H_3PO_4]}$$

$$7 - 7.4 = \log \frac{[Na_3PO_4]}{[H_3PO_4]} \qquad -0.4 = \log \frac{[Na_3PO_4]}{[H_3PO_4]}$$

$$10^{-0.4} = \frac{[Na_3PO_4]}{[H_3PO_4]} \text{ y tenemos que } [Na_3PO_4] + [H_3PO_4] = 5 \times 10^{-3} M$$

$$[Na_3PO_4] = [H_3PO_4] * 10^{-0.4} \text{ por lo tanto } [H_3PO_4] * 10^{-0.4} + [H_3PO_4] = 5 \times 10^{-3} M$$

$$[H_3PO_4] * (1 + 10^{-0.4}) = 5 \times 10^{-3} M$$

$$[H_3PO_4] = \frac{5 \times 10^{-3} M}{1 + 10^{-0.4}} = 3.58 \times 10^{-3} M \text{ por lo tanto}$$

$$[\text{Na}_3\text{PO}_4] = 5 \times 10^{-3} \text{ M} - 3.58 \times 10^{-3} \text{ M} = 1.42 \times 10^{-3} \text{ M}$$

La cantidad de Na_3PO_4 que se pesó fue de 0.4488 g y se utilizaron 0.354 mL de H_3PO_4 llegando al aforo con agua mili-Q. Los cálculos se ponen a continuación:

Para Na_3PO_4 :

$$2 \text{ L} \left(\frac{1.42 \times 10^{-3} \text{ mol}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{163.94 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right) \left(\frac{96 \text{ g de Na}_3\text{PO}_4}{100 \text{ g pureza}} \right) = 0.447 \text{ g de Na}_3\text{PO}_4$$

Para H_3PO_4 :

$$2 \text{ L} \left(\frac{3.58 \times 10^{-3} \text{ mol}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{98 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right) \left(\frac{1 \text{ mL densidad}}{1.685 \text{ g densidad}} \right) \left(\frac{85 \text{ mL de H}_3\text{PO}_4}{100 \text{ mL pureza}} \right) = 0.354 \text{ mL de H}_3\text{PO}_4$$

4.2 Solución de L-glutamato.

Se prepararon 200 mL a una concentración de 0.1 M de L-glutamato con el buffer de fosfatos para el aforo.

$$0.2 \text{ L} \left(\frac{0.1 \text{ mol}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{169.11 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right) = 3.3822 \text{ g de Glu}$$

4.3 Solución de glicina.

Se prepararon 200 mL a una concentración de 0.1 M de glicina con el buffer de fosfatos para el aforo.

$$0.2 \text{ L} \left(\frac{0.1 \text{ mol}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{75.67 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right) = 1.5134 \text{ g de Gly}$$

4.4 Solución de L-lisina.

Se prepararon 200 mL a una concentración de 0.1 M de L-lisina con el buffer de fosfatos para el aforo.

$$0.2 \text{ L} \left(\frac{0.1 \text{ mol}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{146.19 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right) = 2.9238 \text{ g de Lys}$$

4.5 Solución de L-serina.

Se prepararon 200 mL a una concentración de 0.1 M de L-serina con el buffer de fosfatos para el aforo.

$$0.2 \text{ L} \left(\frac{0.1 \text{ mol}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{105.093 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right) = 2.1029 \text{ g de Ser}$$

4.6 Preparación de ninhidrina.

Se preparó, tomando las precauciones de seguridad necesarias, una solución de ninhidrina a una concentración de 0.1 M en 100 mL, llegando al aforo con agua milli-Q.

$$0.1 L \left(\frac{0.1 \text{ mol}}{1 L} \right) \left(\frac{178.14 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right) = 1.7814 \text{ g de ninhidrina.}$$

5. Caracterización de películas.

5.1 Microscopía óptica.

La caracterización de las películas por microscopía óptica se llevó a cabo con el microscopio Axiotech de la marca Zeiss (Figura 22). Para el estudio óptico se empleó el aumento de 40 x como objetivo, y se colocó un filtro amarillo. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara réflex comercial, y fueron procesadas utilizando el software GIMP 2.0 para aumentar el contraste de la imagen y resaltar las características de las películas.



Figura 22. Microscopio óptico Axiotech.

5.2 Microscopía Electrónica de barrido (SEM)

La caracterización por microscopía electrónica de barrido (SEM) se llevó a cabo con el microscopio electrónico de barrido de ultra-alta resolución JEOL JSM-7800F ubicado en el laboratorio central de microscopía del Instituto de Física de la UNAM (Figura 23). Para obtener las micrografías de las superficies de las muestras, fue necesario preparadas con un ligero recubrimiento de carbón, para evitar la carga de la muestra o su posible daño debido al haz electrónico.

Apoyándose en la experiencia de los analistas del microscopio, se variaron ciertos parámetros en busca de las mejores condiciones para la obtención de las imágenes utilizando entre 1 kV y 5 kV, a distancias de trabajo en un rango entre 8.8 a 9.9 mm. Todas las imágenes se adquirieron a ampliaciones de 1,000X, 10,000X y 50,000X aumentos.



Figura 23. Microscopio electrónico de barrido de ultra-alta resolución JEOL JSM-7800F utilizado.

5.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La caracterización de las películas por microscopía de fuerza atómica se llevó a cabo con el microscopio JEOL JSPM4210 (Figura 24), ubicado en el laboratorio central de microscopía del Instituto de Física de la UNAM. Para este estudio, se empleó el modo intermitente o “tapping”, debido a la naturaleza suave de las películas para evitar dañarlas. Se realizaron barridos de 20 μm por lado de todas las películas.



Figura 24. Microscopio de Fuerza Atómica JEOL JSPM4210.

5.4 Espectroscopia UV-Vis

La caracterización por espectroscopia ultravioleta-visible se llevó a cabo con el equipo E-Chrom CT-8600 (FIGURA 25) con el cual se realizaron las mediciones de los espectros de absorción de las películas, tomando como blanco una muestra de PET ópticamente inactivo en el visible.

Para la toma de muestras se utilizó el programa de adquisición del equipo, y para el procesado de los datos se hizo uso del software Origin Pro 8.

Para el experimento de la formación del purpura de Ruhemann se utilizó el mismo espectrofotómetro, así como el controlador y el Origin Pro 8.



Figura 25. Espectrofotómetro ultravioleta-visible E-Chrom CT-8600.

5.5 Espectroscopia infrarroja

La caracterización de las muestras por espectroscopia infrarroja se llevó a cabo tomando como blanco una muestra de sustrato de PET.

Los experimentos fueron llevados a cabo en el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM en el laboratorio de la Doctora Ma. Del Pilar Carreón Castro, en el equipo Spectrum Two FT-IR Spectrometer de PerkinElmer (Figura 26) acondicionado para realizar el análisis en películas delgadas. Se realizaron 20 barridos por muestra con una fuerza promedio de 10.

Los resultados fueron procesados por medio del software “KnowItAll” de BioRad, y se utilizó como referencia su base de datos “KnowItAll Spectral Library”, para comparar los picos atribuibles a los aminoácidos con los publicados en la literatura.

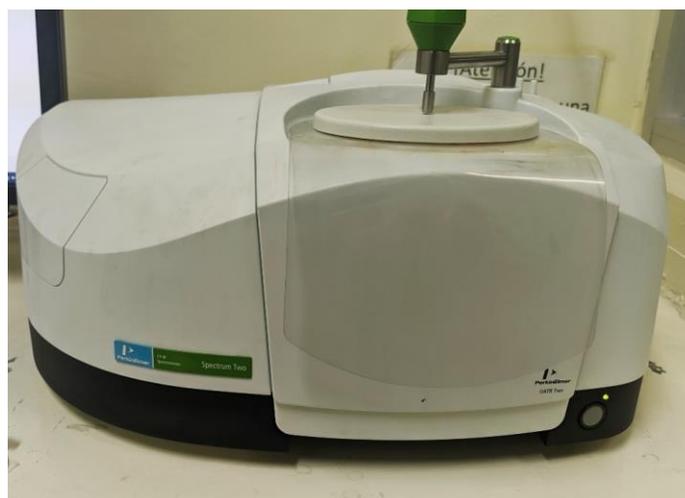


Figura 26. Espectrofotómetro Infrarrojo Spectrum Two FT-IR Spectrometer de PerkinElmer.

5.6 QCM

El análisis de la adsorción dinámica de los aminoácidos en el dodecanal se llevó a cabo utilizando la microbalanza de cuarzo como medio de detección en los cambios de frecuencia, que son indicativos de los cambios en la masa del cristal de cuarzo causados por la adsorción de los aminoácidos. La ecuación que relaciona estos cambios es la ecuación de Sauerbrey,

$$\Delta f = -C_f * \Delta m$$

Donde,

ν = cambio observado en la frecuencia (Hz)

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

C_f = Factor de sensibilidad del cristal ($56.6 \text{ Hz } \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^2$ para un cristal de 5 MHz a temperatura ambiente. Dato del fabricante.)

El desarrollo del experimento se llevó a cabo utilizando la QCM 200 de Stanford Research Systems con el controlador proporcionado por el mismo proveedor.

Los discos de cuarzo fueron caracterizados y catalogados antes y después de la deposición del dodecanal. Para caracterizar el disco con la película, se colocó en la base de oscilación, y se dio un tiempo de aproximadamente 10 minutos para su estabilización y ajuste de la capacitancia C_0 . Este último paso es importante, debido a que, por regla general, la cancelación de la capacitancia es esencial para mediciones precisas de líquidos y películas blandas. Además, la cancelación de la capacitancia debe ser revisada y reajustada cada vez que se cambia el entorno alrededor del cristal.

Ya que se ajustó el sistema, se procedió a la inyección de 1 mL de las muestras de manera constante y controlada, y al ajuste para la anulación de la capacitancia. Los datos obtenidos fueron procesados por medio del software Origin Pro 8, y se cortaron al momento de la inyección ajustando el valor de tiempo a cero.

La microbalanza y el sistema de acoplamiento al controlador se muestran en la Figura 27.

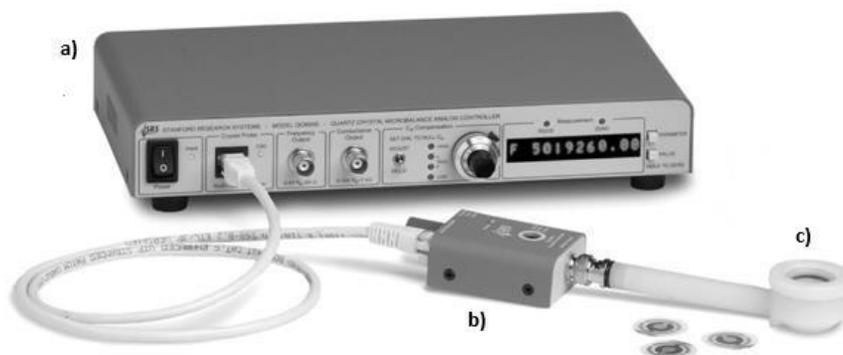


Figura 27. Configuración completa de QCM que consta de a) el controlador digital QCM200, b) oscilador de cristal QCM25 y c) soporte de cristal de cuarzo.

5.7 DFT

El proceso de simulación por DFT se llevó a cabo haciendo uso de la supercomputadora Miztli de la UNAM. Para calcular las geometrías optimizadas y las energías de interacción en el estado base, se llevaron a cabo pasos sucesivos, en donde se empezó con aproximaciones semi-empíricas hasta llegar al funcional B3LYP/6-31(d), que es el que ha dado buenos resultados en el tipo de moléculas empleadas. Así mismo, se partió de diferentes configuraciones y se tomó la de mayor energía de enlace en todos los casos. Las corridas se hicieron para el dodecanal, y cada uno de los aminoácidos empleados de manera independiente, para concluir con la interacción entre ellos de manera individual, tanto en la posición de la corona (superior) como en la posición cercana a las cadenas hidrocarbonadas (inferior). Los datos reportados de energías de enlace, así como las imágenes, son las que se obtuvieron en las corridas finales de cada sistema.

RESULTADOS Y ANÁLISIS.

Las imágenes de las superficies tanto de la película de resorcinarenos como después de interactuar con el buffer de fosfatos y los aminoácidos que se muestran con las técnicas de microscopía óptica, electrónica de barrido y de fuerza atómica, fueron tomadas usando los sustratos de PET.

1. Microscopía Óptica

Después de la obtención de las películas por evaporación térmica se procedió a una inspección visual por medio de microscopía óptica, en la cual se observó que las moléculas depositadas formaban una película muy delgada, casi transparente. Para asegurar la correcta deposición en el sustrato, se procedió a la caracterización de las películas formadas puras, y después de la interacción con las diferentes soluciones de aminoácidos, utilizando un objetivo de 40X en el modo de transmitancia.

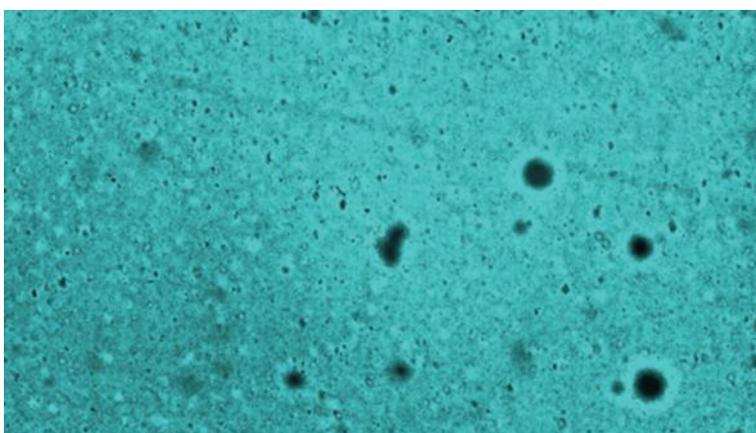


Figura 28. Película de dodecanal con objetivo 40x

En la Figura 28 se pueden observar aglomeraciones de resorcinarenos en diferentes proporciones, llegando incluso a formar algunas zonas que impiden el paso de luz. Esto demuestra la formación de una película con defectos considerables.

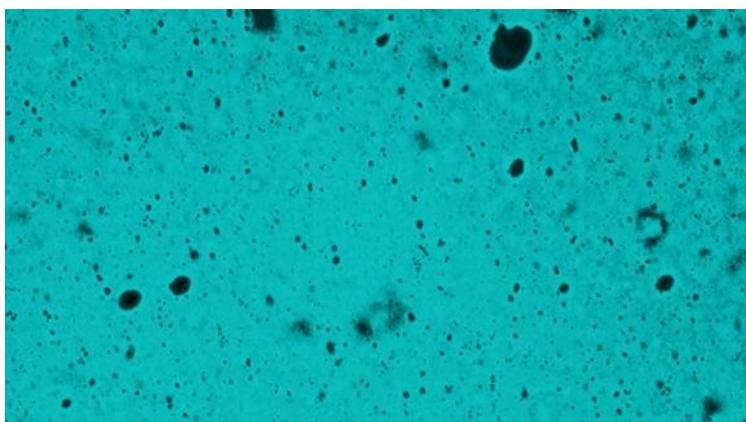


Figura 29. Película de dodecanal + buffer de fosfatos pH= 7 con objetivo 40x.

La imagen de la película que se puso a interactuar con el buffer de fosfatos (control) (Figura 29) se puede observar muy similar a la película original presentando los acumulados de resorcinarenos, y una formación uniforme. Se puede ver que la película luce más “limpia”, con zonas más claras en comparación con la película original. Esto pudo deberse a que la solución acuosa logro solubilizar algunas regiones de la película original, reduciendo el número de agregados en la película inicial.

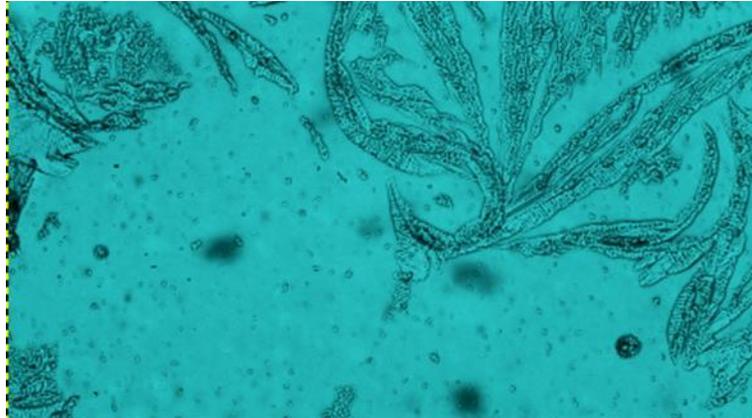


Figura 30. Película de dodecanal + glicina con objetivo 40x.

En el caso de la Figura 30, se observa la existencia de un depósito formando acumulaciones en forma de fibras alargadas con cierto espesor y estructura interna. Este tipo de arreglos en depósitos de glicina ya han sido reportados, y han sido descritos como formas polimórficas del aminoácido (Seyedhosseini et al., 2015)

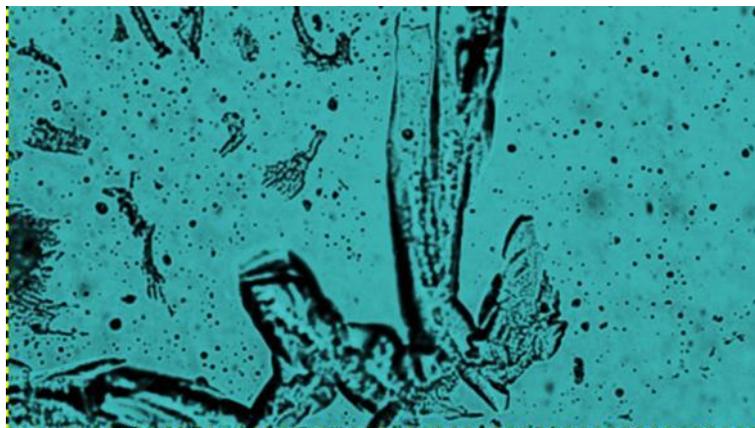


Figura 31. Película de dodecanal + L-glutamato con objetivo 40x.

La interacción del L-glutamato con la película de resorcinareno se muestra en la Figura 31. Al igual que en el caso de la glicina, este depósito muestra la formación de agregados de tipo alargado e irregular, pero con un ancho mucho mayor que el mostrado en la figura 30.

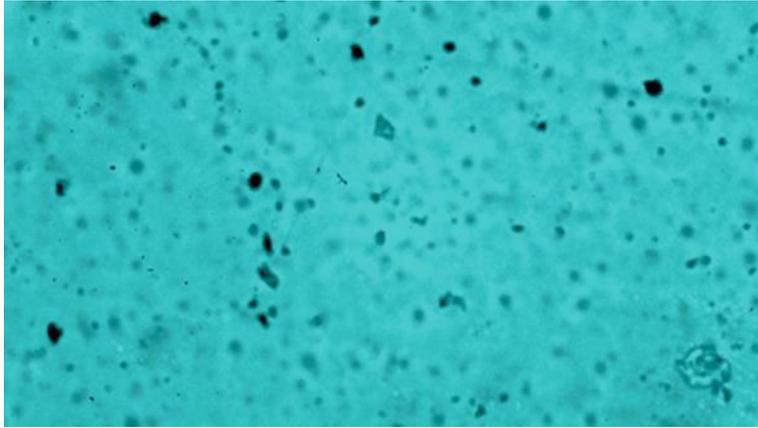


Figura 32. Película de resorcinareno + L-lisina con objetivo 40x.

En el caso de la imagen de la interacción con lisina (Figura 32), se observa una clara diferencia con la película pura. Aquí, los agregados son pequeños y de forma irregular. Así mismo, la superficie se ve más “limpia” que la película de resorcinareno. En base a lo anterior, se puede concluir que existe un depósito bastante homogéneo del aminoácido. Por otro lado, se puede inferir que la película es relativamente gruesa, y que los depósitos se encuentran a distintas profundidades, que justifican la diferencias en distancias focales en la imagen.

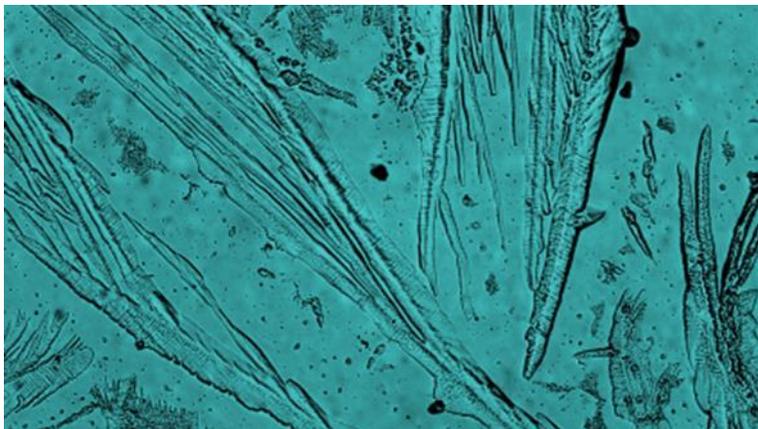


Figura 33. Película de resorcinareno + L-serina 0.1 M con objetivo 40x.

Por último, la Figura 33, presenta la película formada después de la interacción con serina, y la formación de un depósito formando figuras alargadas en forma de agujas, lo que presentan un comportamiento completamente diferente a los aminoácidos anteriores.

Comparando las imágenes anteriores, fue posible detectar diferencias bastante visibles entre la película de resorcinareno, la película control y las muestras que interaccionaron con los aminoácidos. Esto es un indicativo de la existencia de un proceso de adsorción/absorción por parte de la película de dodecanal hacia los aminoácidos, y una exclusión hacia las moléculas presentes en el buffer de fosfatos.

2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El siguiente paso de la caracterización de las películas fue la obtención de las imágenes por SEM. Para su óptimo análisis se tenía el antecedente en el laboratorio de que las películas orgánicas (como todas las utilizadas en este proyecto), se llegaban a cargar y quemar muy rápidamente ya que tanto la película como el sustrato de depósito son materiales no conductores. Por lo anterior, fue necesario recubrir las muestras con una ligera capa de carbón capaz de evitar la carga de la muestra, pero a su vez, evitando deformar la superficie original de la misma.

Aunado a lo anterior y apoyándose en la experiencia de los analistas del microscopio, se variaron diferentes parámetros del equipo en busca de las mejores condiciones para la obtención de las imágenes. Los rangos de trabajo que se utilizaron fueron de 1 kV a 5 kV en el voltaje de aceleración, y distancias de trabajo en un rango entre 8.8 a 9.9 mm.

Las imágenes que a continuación se muestran corresponden a la película de resorcinareno, el control con buffer de fosfatos, y los cuatro aminoácidos en amplificaciones de 1,000 X, 10,000 X y 50,000 X.

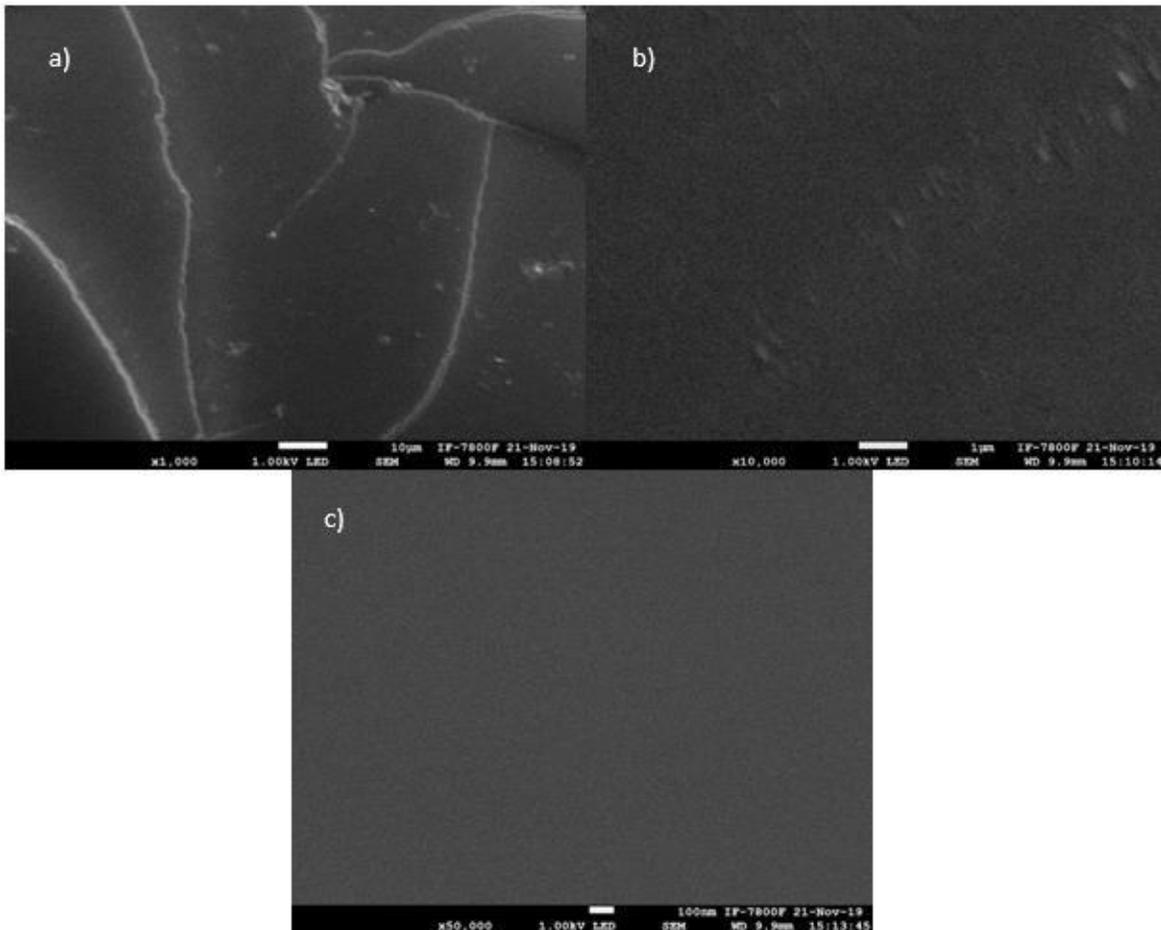


Figura 34. Imágenes de SEM de la película de dodecanal a diferentes aumentos, a) 1,000 X b) 10,000 X y c) 50,000 X.

Como se puede observar en la Figura 34, la película de dodecanal por si sola presenta en SEM una morfología que a una magnitud de 1,000 X (a) es bastante similar a la observada en las pruebas en microscopio óptico, en la que se ve una película uniforme con pocos agregados. Sin embargo, a medida que se aumenta la magnificación, se puede observar que la película ya no presenta agregados y se mantiene una superficie homogénea bastante lisa (b y c).

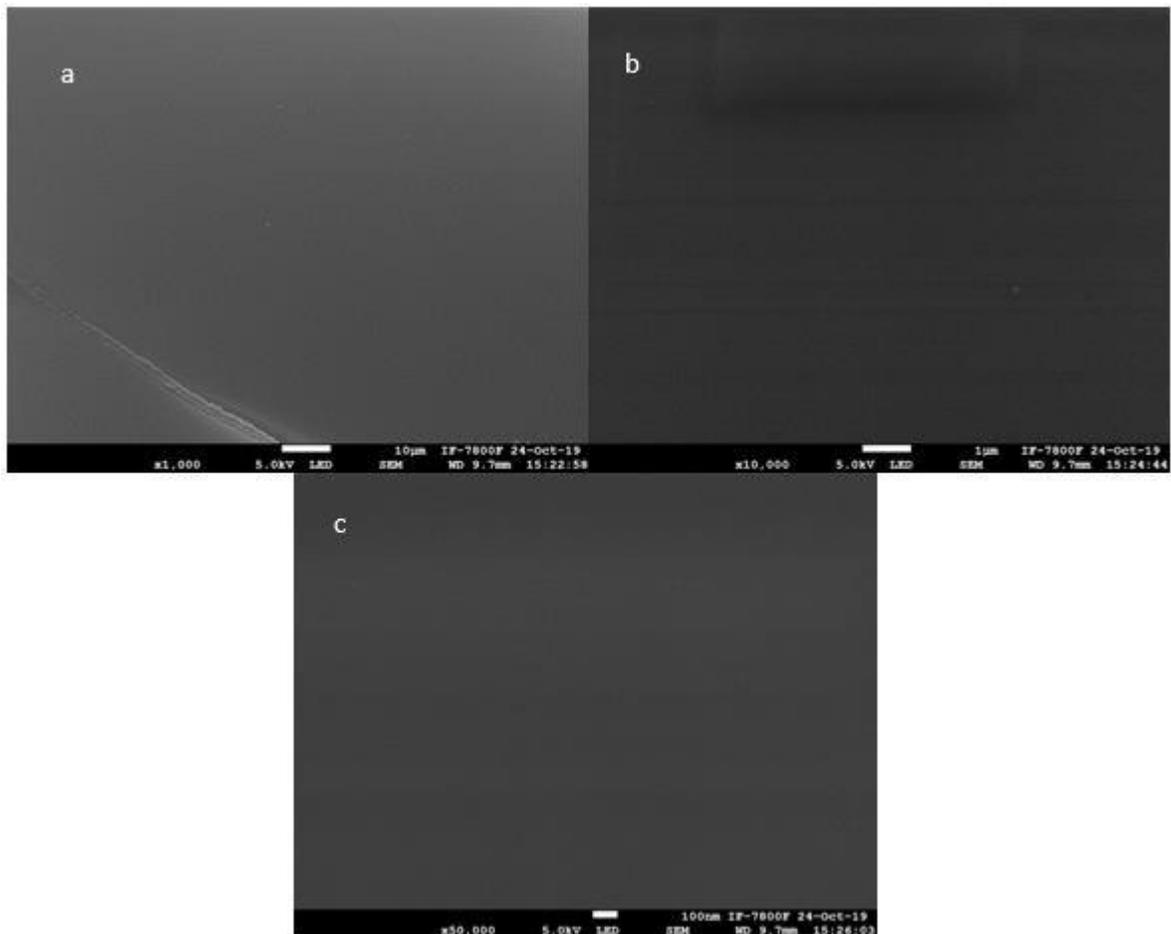


Figura 35. Imágenes de SEM de la película de dodecanal + buffer de fosfatos pH= 7 a diferentes aumentos, a) 1,00 X, b) 10,000 X y c) 50,000 X.

En la Figura 35 se tiene las imágenes control con el buffer de fosfatos. En ellas se puede observar que no hay alguna diferencia significativa con respecto a las del dodecanal puro (Figura 34), por lo que presentan las mismas características en todas las magnitudes.

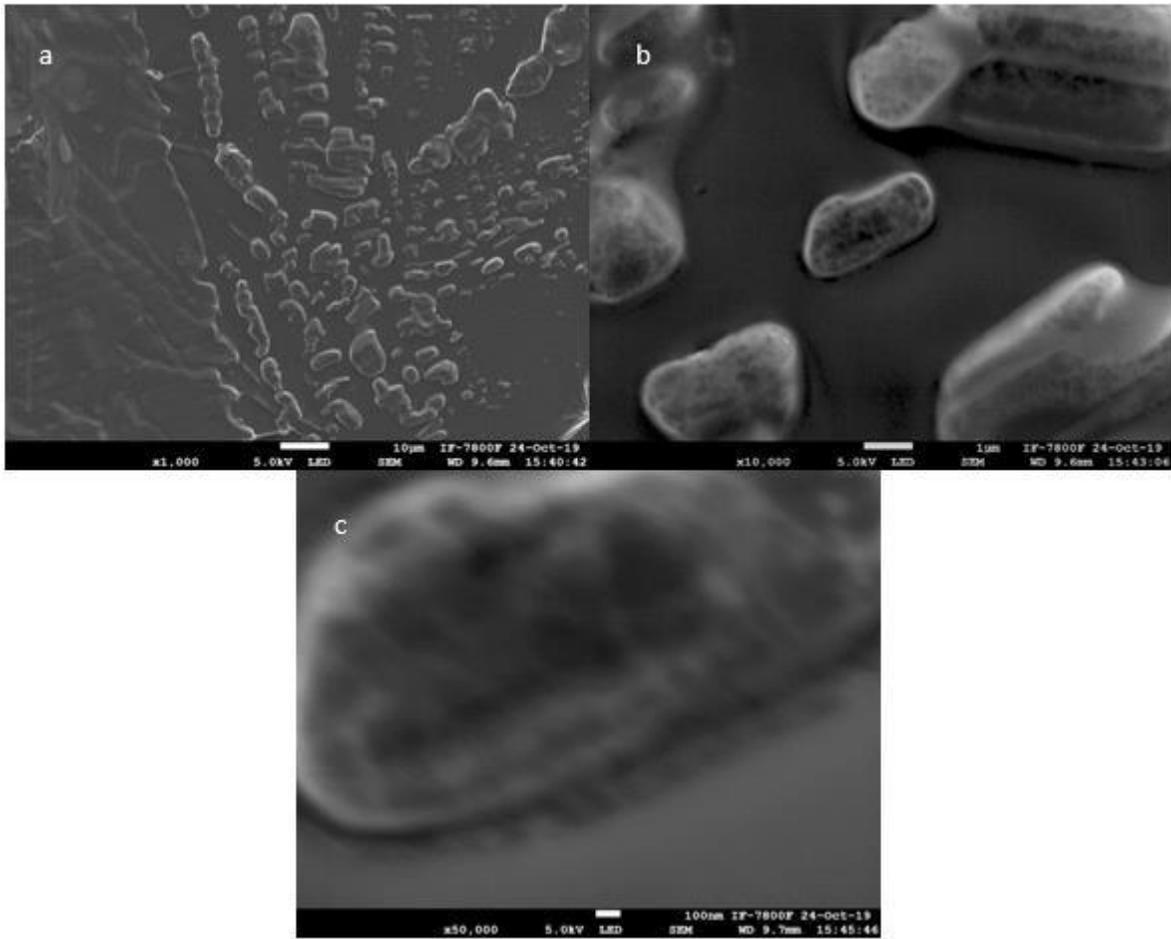


Figura 36. Imágenes de SEM de la película de dodecanal + glicina a diferentes aumentos, a) 1,00 X, b) 10,000 X y c) 50,000 X.

Los resultados obtenidos en SEM de la película con la glicina (Figura 36), muestran una clara presencia de agregados (a), donde las características morfológicas son similares a las observadas al microscopio óptico, ya que presentan un crecimiento alargado con anchuras relativamente grandes. En su mayoría, estos agregados muestran una tendencia de crecimiento direccional no uniforme.

En la imagen (b) de la Figura 36, se puede observar que la superficie de la película de dodecanal se recubrió con una película homogénea, ya que no presenta deformaciones fuera de las zonas donde se encuentra los agregados de aminoácido. Esto puede indicar que la glicina tiende a formar primero una película uniforme sobre el resorcinareno, para posteriormente, dar lugar a la formación de agregados de gran tamaño. La imagen (c) muestra más a detalle el agregado del aminoácido sobre la película, cuya forma es de tipo ovoide sin una clara estructura en su superficie.

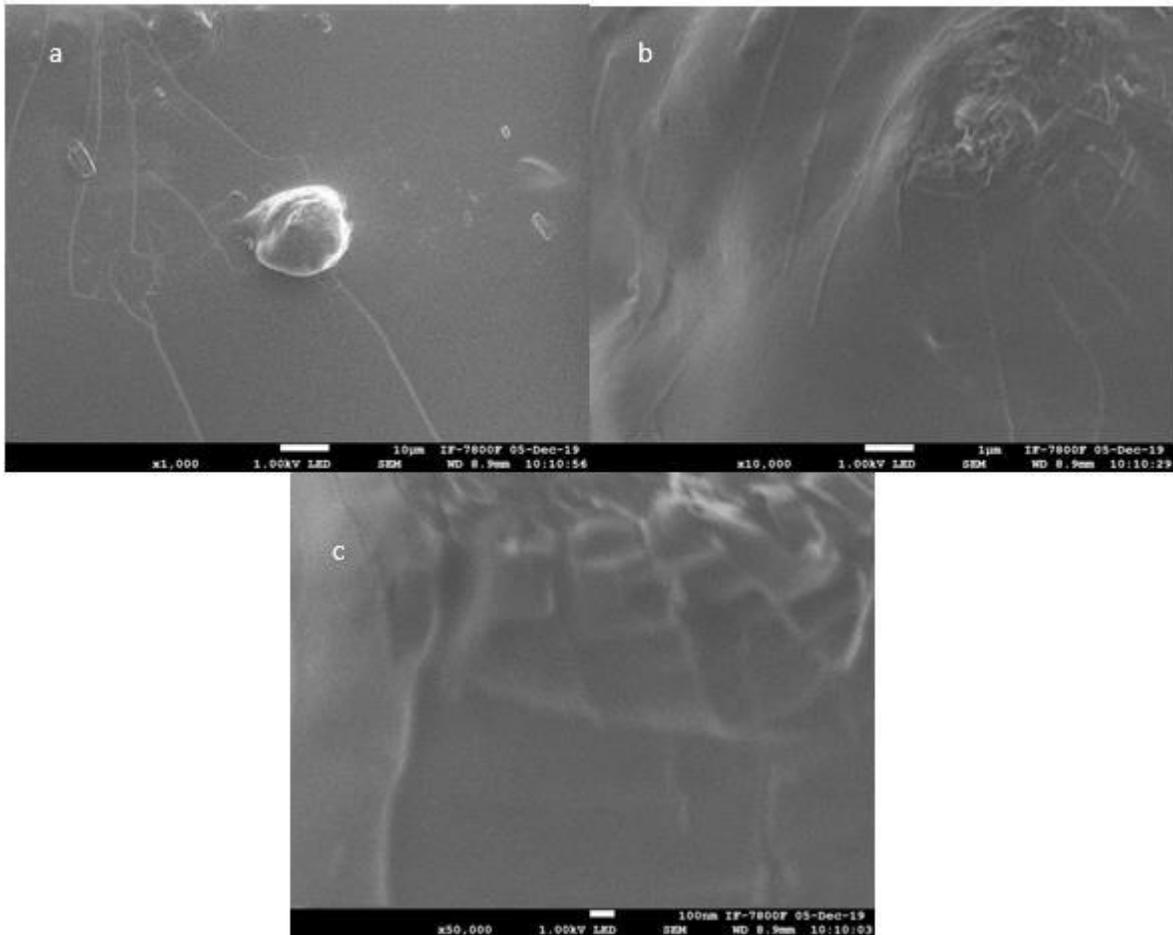


Figura 37. Imágenes de SEM de la película de dodecanal + L-glutamato a diferentes aumentos, a) 1,00 X, b) 10,000 X y c) 50,000 X.

En el caso de los resultados para el L-glutamato presentados en la Figura 37, se tiene que para la imagen (a) se puede observar las características propias de la película de dodecanal (Figura 34 imagen a) pero en adición a esto se tiene la presencia de agregados pequeños y grandes, similares a los que se observan en las imágenes al microscopio óptico. Se puede ver en las imágenes (b) y (c), que ya no hay presencia de agregados que resalten sobre la película. Sin embargo, se ve la presencia de una nueva capa que presenta algunas líneas que asemejan a una capa corrugada de aminoácidos. Esto nos podría indicar el comportamiento del glutamato como molécula a detectar, primero teniendo preferencia sobre el dodecanal siendo adsorbido generando una capa que recubre completamente la película original, para posteriormente, formar agregados irregulares. Todo esto indicaría que, a pesar de no presentar grandes agregados, la adsorción de glutamato puede ser significativa al formar una capa relativamente gruesa de moléculas sobre la superficie del dodecanal.

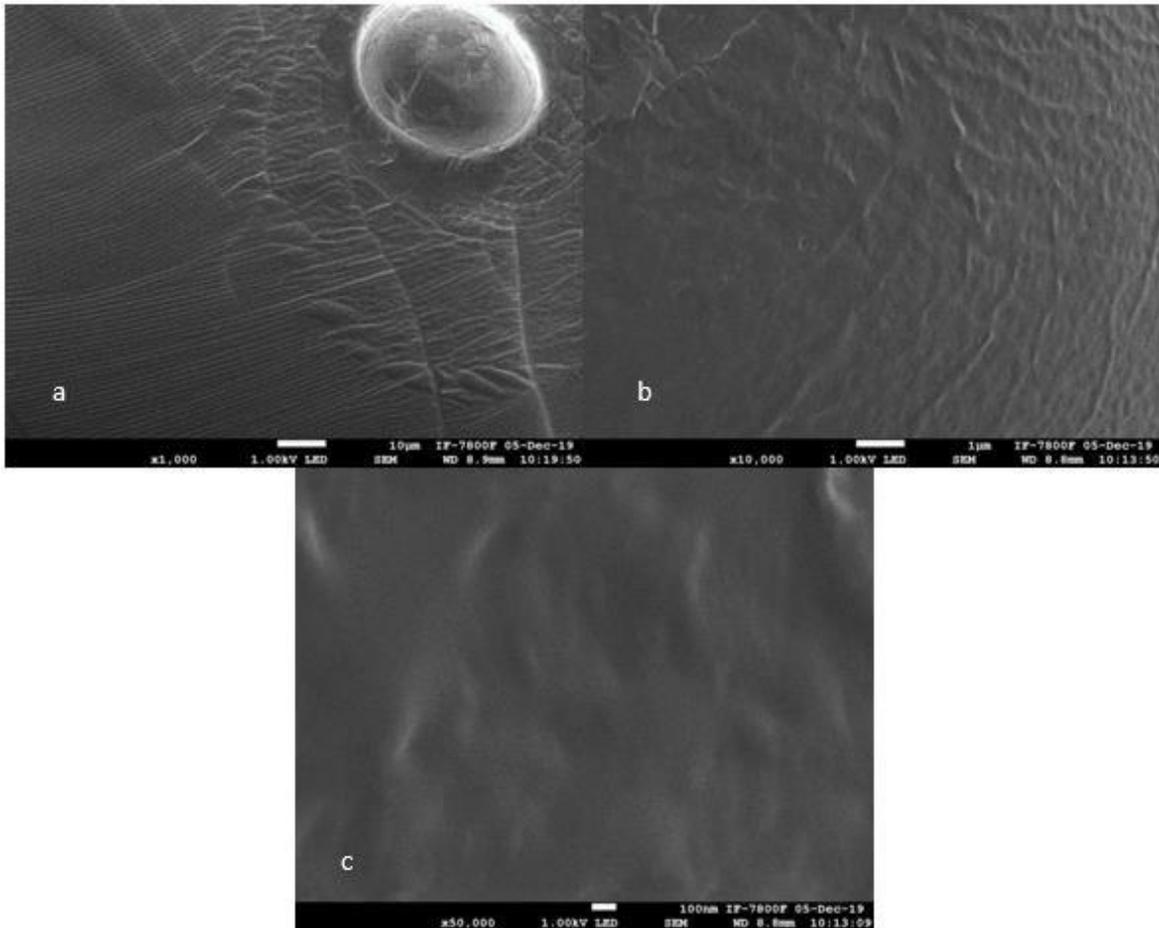


Figura 38. Imágenes de SEM de la película de dodecanal + L-lisina a diferentes aumentos, a) 1,00 X, b) 10,000 X y c) 50,000 X.

La Figura 38, muestra los resultados de SEM a la interacción del dodecanal con la lisina. Como puede observarse presenta un comportamiento similar al presentado por el glutamato, ya que se puede observar la presencia de una capa sobre la película de dodecanal con la presencia de zonas corrugadas en forma de líneas paralelas que se van deformando conforme a la superficie original. Además, se tiene la presencia de un agregado de gran tamaño, que pudo deberse a la presencia de una gota que quedó en la superficie después de la inmersión.

Por último, se tienen los resultados obtenidos de la interacción de la película con la L-serina mostrados en la Figura 39, los cuales presentan un aspecto completamente diferente a los vistos anteriormente.

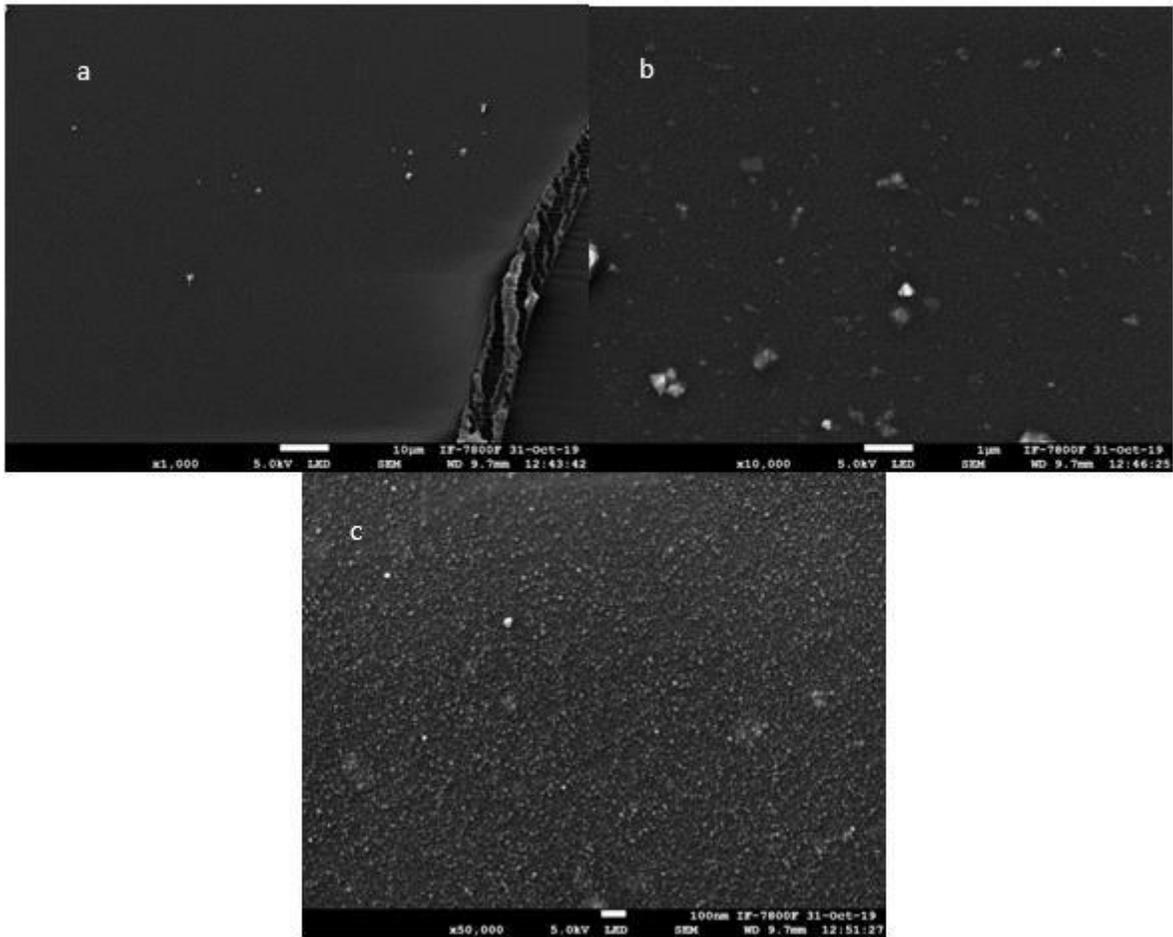


Figura 39. Imágenes de SEM de la película de dodecanal + L-serina 0.1 M a diferentes aumentos, a) 1,00 X, b) 10,000 X y c) 50,000 X.

Se puede ver que se forman agregados muy pequeños y en grandes cantidades sobre la superficie de la película (c), los cuales indican una interacción principalmente con la película, llegando a formar una capa homogénea de alto grado de recubrimiento de aspecto granular. A menores magnificaciones, (a) y (b), se puede ver la gran homogeneidad de la película formada con pequeños agregados sobre su superficie. En la imagen (a), se puede ver un posible límite de crecimiento de la película, que muestra un espesor de ancho considerable.

3. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Como siguiente paso en el análisis de los cambios morfológicos efectuados por la interacción del dodecanal con los aminoácidos, se caracterizaron las superficies con AFM para conocer a menor escala, la morfología de las películas de dodecanal antes y después de la interacción. Con esta técnica, se pudieron obtener parámetros como la máxima altura de agregados y la rugosidad de la superficie. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software WSxM 5.0 Develop 7.0.

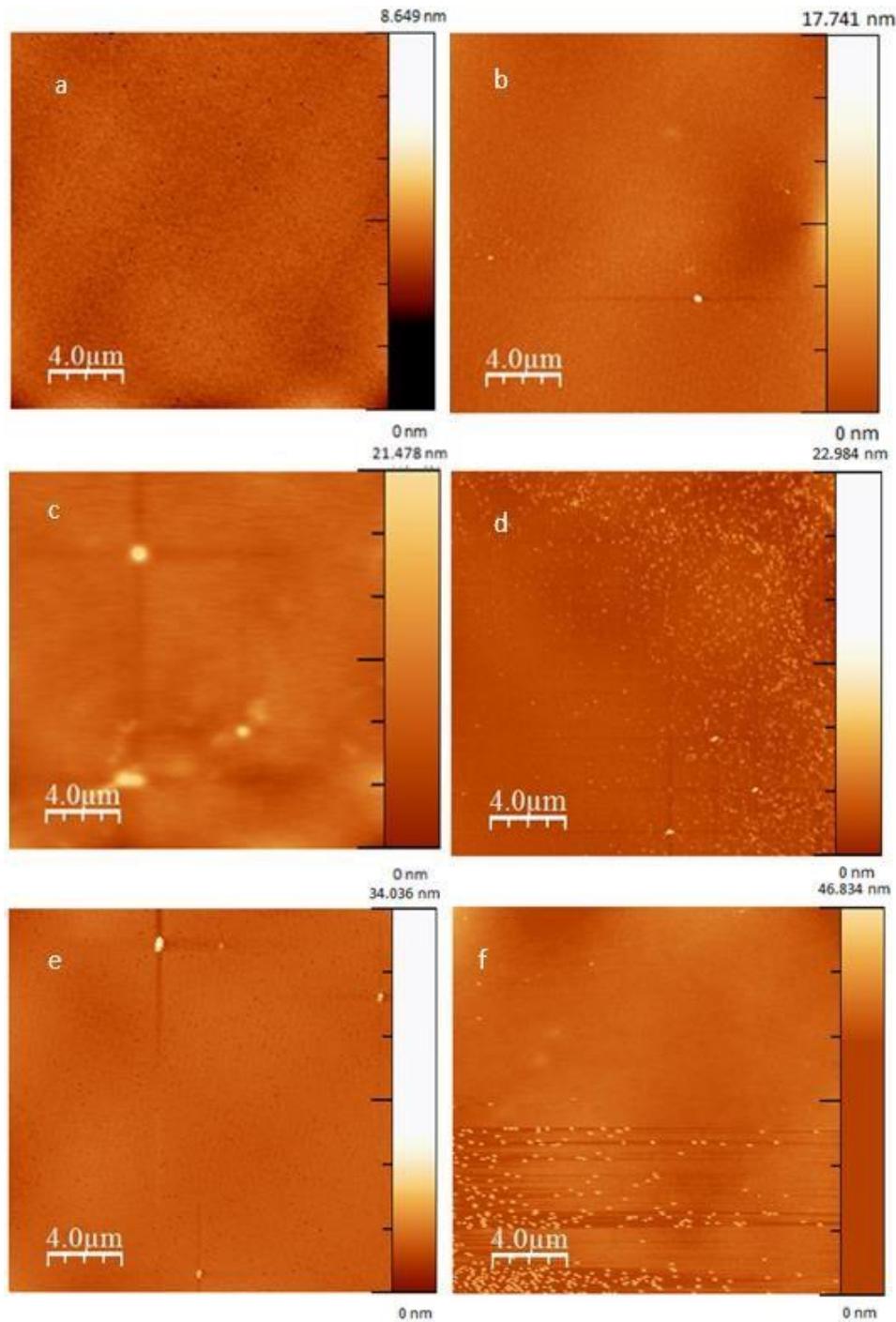


Figura 40. Resultados obtenidos por medio de AFM con una magnificación de $20 \mu\text{m}^2$ para las películas a) dodecanal, b) dodecanal + buffer de fosfatos pH= 7, c) dodecanal + glicina d) dodecanal + L-glutamato, e) dodecanal + L-lisina y f) dodecanal + L-serina.

A diferencia de lo visto con otras técnicas de microscopía, en esta técnica contamos con una resolución bastante considerable, llegando a tener una vista de hasta $20 \mu\text{m}^2$, lo cual permite ver a detalle la superficie de las muestras. Sin embargo, los agregados observados en otras técnicas como la microscopía óptica o SEM no pueden ser apreciables en esta técnica debido a que la

altura en Z está restringida a un desplazamiento máximo de 3 μm . A pesar de esta limitante, con AFM se puede ver la película crecida sobre la superficie del dodecanal en mayor detalle.

Como se puede observar, cada una de ellas cuentan con una escala en donde como regla general las zonas más claras representan zonas de mayor altura y las zonas oscuras las de menor valor en Z. En la primera imagen, se puede apreciar que la muestra tiene la altura más pequeña y corresponde al dodecanal (a), además, presenta puntos negros por toda la película, atribuibles a poros nanométricos.

A la hora de analizar la muestra (b) correspondiente a la interacción del buffer con el resorcinareno, se puede ver que la textura de la superficie no cambia mucho y se llegan a ver muy pocos agregados de adsorción debidos a la presencia del buffer. También se puede apreciar un aumento en la altura de la imagen, atribuible a los pocos agregados que se pueden apreciar como dos puntos blancos que sobresalen sobre el resto de la película.

En cuanto a las muestras de la interacción con los aminoácidos podemos comenzar con la imagen (c) correspondiente a la glicina, en la cual se puede apreciar un notable aumento en el tamaño en Z correspondiente a la presencia de varias zonas más claras que representan la adsorción del aminoácido.

El L-glutamato (imagen d) muestra una característica particular pues se puede apreciar la presencia de un gran número de puntos blancos que representan una ligera elevación en Z, los cuales ocupan presentan una distribución aleatoria. Todo esto nos muestra la tendencia del ácido glutámico a formar primero una sola capa de aminoácidos adsorbidos generando así la apariencia de una capa extra como se pudo observar en SEM.

La L-lisina (imagen e) presenta un comportamiento anómalo, pues se puede observar aún la presencia de puntos negros semejantes a los presentados por la película original, además de mostrar algunos puntos blancos de mayor altura, pero muy escasos. Esto se puede interpretar como que la lisina forma un recubrimiento sobre la superficie del resorcinareno, pero no la cubre completamente. La mayor altura observada, es debido al tamaño de los agregados presentes en la imagen. Cabe señalar que esta superficie fue la que más problemas dio para su adquisición, ya que las variaciones de altura eran muy grandes en diversas zonas de la película.

Por último, en este análisis de la morfología por AFM se tiene el resultado de la L-serina (imagen f), la cual presenta una diferencia significativa con los controles pues presenta múltiples zonas de aumento en la altura, de mayor tamaño y no tan juntas como las presentadas por el L-glutamato. Esto, puede indicar la confirmación del comportamiento observado en las imágenes en SEM donde se podía apreciar la tendencia por parte de la serina a formar pequeños agregados con una separación considerable al grado de poderlos diferenciar. Aunado a esto, los picos vistos en la imagen de la serina son los de mayor tamaño en todas las muestras pues representan un aumento en la altura de casi 6 veces en comparación con la altura original mostrada por el dodecanal. Esto demuestra que la serina tiende a formar pequeños agregados de gran altura capaces de ser distinguidos incluso por SEM.

Después del análisis de la morfología y altura de todas las películas por medio de AFM, también se pudo analizar la rugosidad antes y después de ser expuestas las superficies originales a los aminoácidos.

Tabla 1. Rugosidad de las películas de dodecanal antes y después de la interacción con el control y los aminoácidos, RMS= rugosidad media cuadrática o “root mean square” por sus siglas en inglés.

	Dodecanal	Buffer de fosfatos pH= 7.4	Glicina 0.1 M	L-glutamato 0.1M	L-lisina 0.1 M	L-serina 0.1M
RMS (nm)	0.2265	0.6052	1.3635	0.7544	0.4405	9.0580

En la tabla 1 se muestran las rugosidades de todas las películas de dodecanal estudiadas en este proyecto. El valor de la rugosidad representa una desviación de la planaridad de una superficie, es decir, mientras más plana es, menor la rugosidad y viceversa. De estos valores, se puede decir que no existe una tendencia que dependa del tamaño del aminoácido, lo que significa que las interacciones intermoleculares están jugando un papel importante en el acomodo de las moléculas sobre la superficie. Por otro lado, como ya se vio en los estudios de microscopía óptica, SEM y AFM, las películas tienen un cambio en su morfología que se aprecia a diferentes escalas.

De estos resultados podemos decir que la serina, al ser el aminoácido que se adsorbe formando pequeños agregados presenta el mayor aumento en la rugosidad, a comparación de la glicina, ya que esta última a pesar de ser la que genera acumulaciones de mayor tamaño, éstas no pueden ser censadas por AFM. Finalmente, en el caso del glutamato el cuál forma agregados muy pequeños, termina formando una capa que no aumenta la rugosidad significativamente.

4. Espectroscopia ultravioleta-visible.

Dentro de los objetivos del proyecto se planteó el uso del espectro UV-Vis para determinar si después de la adsorción existía una diferencia con respecto a un primer espectro obtenido del dodecanal ya depositado en el sustrato. Debido a que el resorcinareno utilizado es de nueva síntesis, no se tiene un antecedente de su comportamiento en el rango del espectro electromagnético utilizado. Es por ello, por lo que no se puede hacer la comparación con alguna referencia disponible en la literatura. Sin embargo, eso no impide que se obtenga un primer espectro del dodecanal ya depositado como película, en donde se esperaba una absorción más cercana al ultravioleta pues el dodecanal en polvo es amarillo-naranja. Este resultado se presenta en la Figura 41.

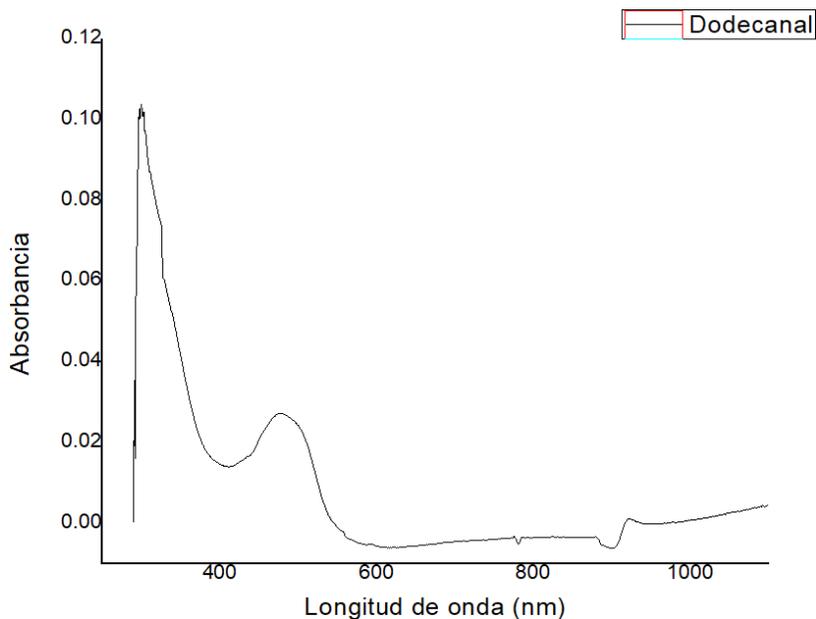


Figura 41. Espectro de absorción ultravioleta-visible de la película de dodecanal.

En el espectro de la película pura, se pueden observar tres zonas características de una estructura tipo resorcinareno; una banda alrededor de los 300 nm, otra más entre los 400 y 500, y una elevación progresiva hasta la presencia de una depresión y un posterior pico alrededor de los 900 nm. El siguiente paso fue buscar las diferencias entre el espectro del dodecanal y el obtenido por las películas después de su interacción con los aminoácidos. En esta gráfica se puede observar que las señales cercanas a los 300 nm presentan en general caídas abruptas, ya que esta longitud de onda es el límite inferior de detección del equipo.

En la Figura 42, se puede observar el resultado con glicina y su comparación con el dodecanal puro. Se puede ver que los cambios presentados son en cuanto a la absorción, pues la línea base de la glicina se encuentra elevada en comparación con el dodecanal, posiblemente debido a un mayor espesor de la película en la zona de medición. Además de eso, se observa un ligero ensanchamiento del pico en los 479 nm con un ligero corrimiento al rojo de 10 nm. Esto, puede deberse a la interacción con el aminoácido que cambia ligeramente la distribución electrónica del dodecanal ensanchando el pico y provocando el corrimiento.

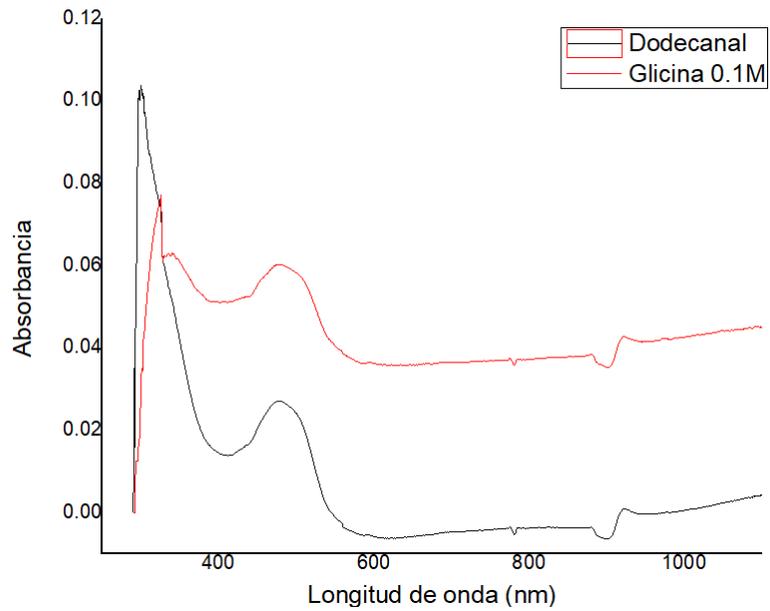


Figura 42. Espectro de absorción ultravioleta-visible de la película de dodecanal después de la interacción con Glicina.

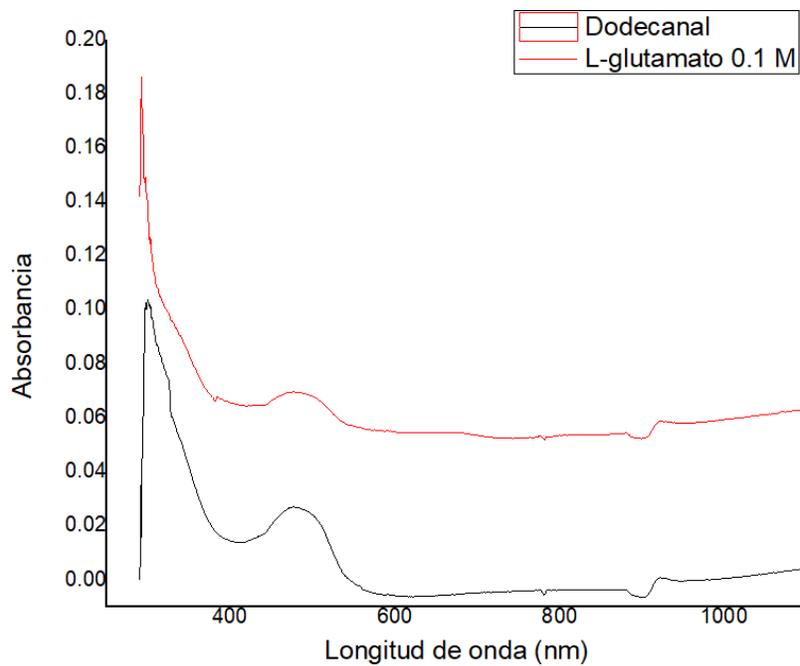


Figura 43. Espectro de absorción ultravioleta-visible de la película de dodecanal después de la interacción con L-glutamato.

En cuanto a la interacción con glutamato es posible observar que se genera un ensanchamiento del pico en los 483 nm. Se ve más reducido en comparación con el control, que sugiere una disminución en las transiciones electrónicas de esa región por la interacción con el glutamato. También se observa un corrimiento de 15 nm en comparación con el pico de 471 nm del dodecanal que puede indicar un ligero corrimiento batocrómico.

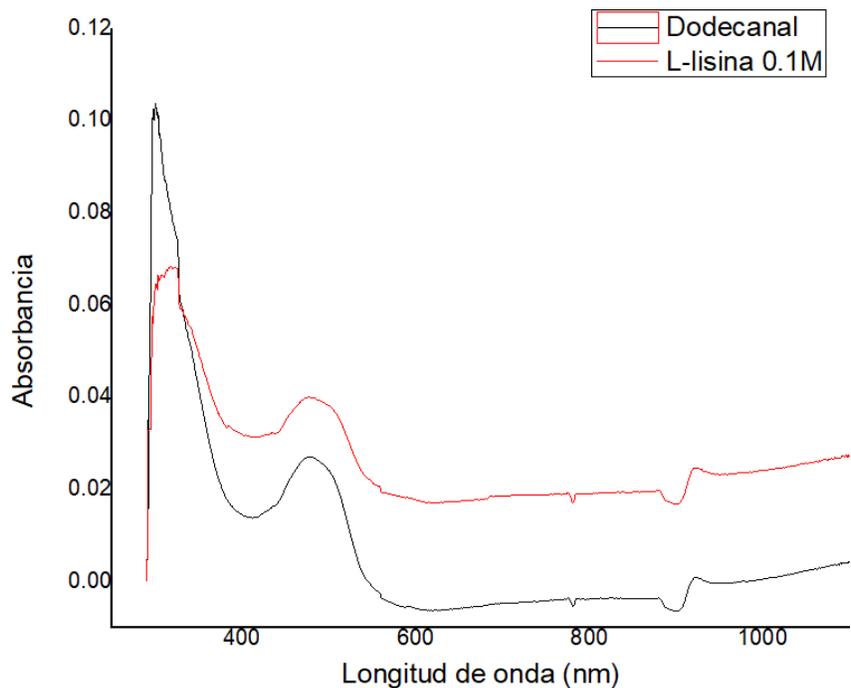


Figura 44. Espectro de absorción ultravioleta-visible de la película de dodecanal después de la interacción con L-lisina.

Para el caso de la muestra de lisina se aprecia un espectro muy similar al dodecanal, aunque el ancho del pico en 477 nm se aprecia ligeramente más ancho y con un ligero corrimiento al rojo, al igual que los casos anteriores.

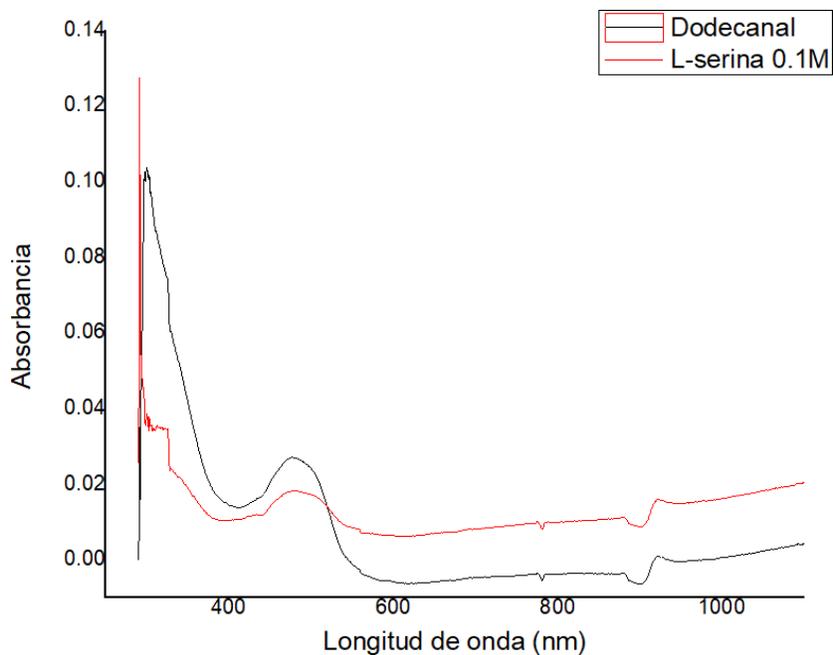


Figura 45. Espectro de absorción ultravioleta-visible de la película de dodecanal después de la interacción con L-serina.

Siguiendo con todos estos resultados, pasó el mismo caso con la muestra de serina, sólo que en esta disminuyó de intensidad y aumento la anchura del pico de absorción ubicado en los 487 nm mostrando un ligero corrimiento al rojo.

Los resultados no muestran información tan relevante debido a que hubo varios puntos que impidieron un mejor uso, como el hecho de que son películas con un grosor de nanómetros. Además, es posible que debido a la aleatoriedad en el acomodo de las moléculas de dodecanal en el sustrato, se tengan diferentes posiciones del resorcinareno propiciando diferentes tipos de interacciones con los aminoácidos. Lo anterior, propicia la posibilidad de que la zona analizada pueda presentar en su mayoría interacciones físicas que no se vean reflejadas en un cambio del espectro de absorción. Sin embargo, cabe señalar que, en todas las gráficas, se observa un ligero aumento en el ancho del pico ubicado en la zona de 470 nm, que sugiere que existe una interacción entre las películas y los aminoácidos analizados pues favorecen una mayor deslocalización de la nube electrónica y menor definición en las transiciones electrónicas.

Todos los espectros de los aminoácidos presentaron un ligero efecto batocrómico que puede ser usado para confirmar la presencia de una transición desde el orbital π hasta el orbital π^* (de antienlace) de menor energía en las moléculas de dodecanal. La razón de este efecto está relacionada con el nivel de energía del estado excitado. El estado excitado (π^*) es más susceptible a la atracción dipolo-dipolo y a los puentes de hidrógeno que el orbital π (Robinson, Skelly Frame, & Frame, 2005). Cuando el dodecanal interactúa con las moléculas polares de los aminoácidos, la energía del orbital π^* disminuye haciendo que la energía necesaria para excitar al electrón sea menor y exista el corrimiento hacia longitudes de onda más grandes.

Por último, es necesario mencionar que los aminoácidos absorben en una longitud de onda de 220 nm, principalmente. Desafortunadamente, debido a las condiciones experimentales, esta longitud de onda fue imposible de alcanzar ya que en las zonas por debajo de 300 nm presentaban demasiado ruido y la señal se perdía debido a que éste es el límite de detección del equipo.

5. Espectroscopía Infrarroja.

Como ya se mencionó, el uso de la espectroscopía infrarroja (IR) es una técnica bastante útil para el análisis de las interacciones intermoleculares, pues puede demostrar la presencia de los grupos funcionales propios del dodecanal y los correspondientes a los aminoácidos. Cabe mencionar, que los aminoácidos utilizados presentan muy pocas diferencias en cuanto a sus espectros infrarrojos.

Los resultados fueron procesados por medio del software "KnowItAll" de BioRad, y se utilizó como referencia su base de datos "KnowItAll Spectral Library", para comparar los picos atribuibles a los aminoácidos con los publicados en la literatura.

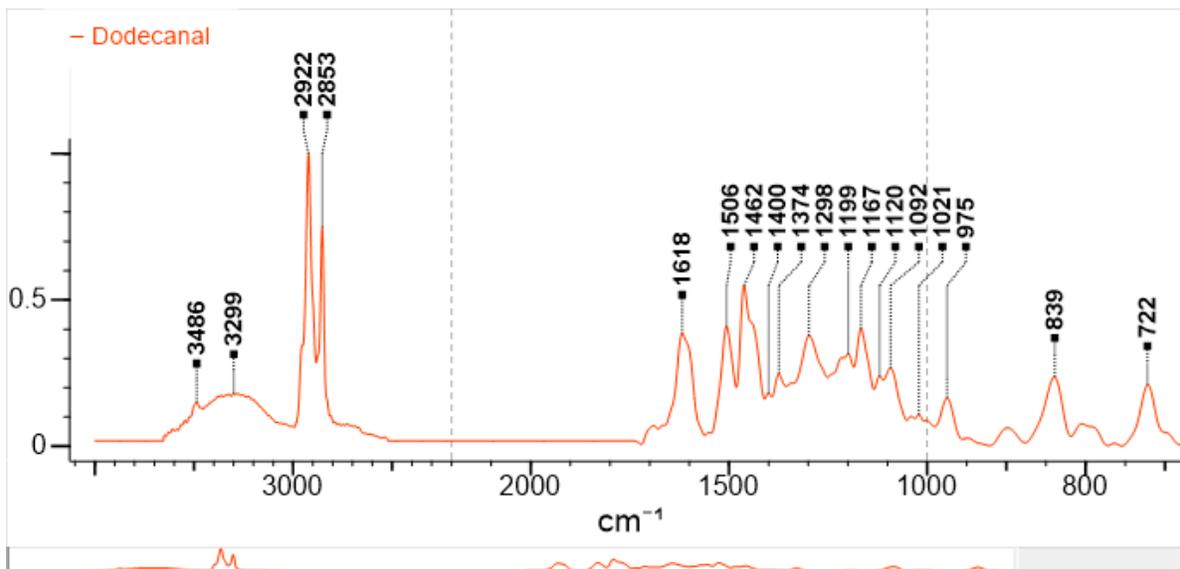
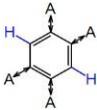


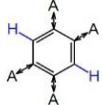
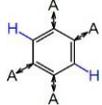
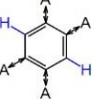
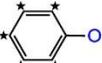
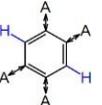
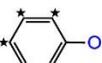
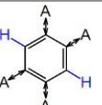
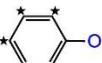
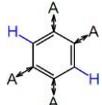
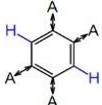
Figura 46. Espectro IR normalizado de la película de dodecanal.

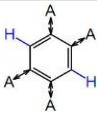
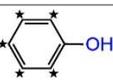
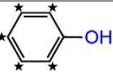
El espectro IR del dodecanal es presentado en la Figura 46, en donde se puede observar la presencia de dos regiones de absorción. La primera zona se encuentra entre los 700- 1500 nm, y la segunda zona de interés se encuentra entre los 2700 -3400. Se observa la presencia de un gran número de picos, lo cual es normal en muestras orgánicas, ya que corresponden a los diferentes grupos funcionales presentes en el dodecanal. Debido a que es una molécula de nueva síntesis, no se tiene un antecedente de su comportamiento en el espectro. Sin embargo, existen reportes de resorcinarenos similares al utilizado en el proyecto (con cadenas alifáticas largas), como el reportado por Eddaif y su equipo de trabajo. El espectro de IR de este grupo presenta un comportamiento similar y con picos característicos como los encontrados de mayor tamaño en 2853 y 2922 nm, los que son característicos de los resorcinarenos (Eddaif, Trif, Telegdi, Egyed, & Shaban, 2019).

La interpretación del espectro de IR se presenta por medio de la tabla que se muestra a continuación:

Tabla 2. Análisis de los grupos funcionales presentes en el espectro IR de dodecanal (Figura 46).

Pico	Grupo funcional	Estructura	Modo	Intensidad (%)
722	C-C	$R-(CH_2)_n-C$	Vibración estructural	21
839	C-H		Deformación	24

975	C-H		Deformación	16
1021	No identificados			10
1092	No identificados			26
1120	C-H		Doblamiento	23
1167	C-H		Doblamiento	40
	O		O	
	C-O		Estiramiento	
1199	C-H		Doblamiento	31
	O		O	
	C-O		Estiramiento	
1298	C-H		Doblamiento	38
1374	C-H	R-CH ₃	Deformación simétrica	25
1400	O-H		Deformación	18
1462	C-H	R-(CH ₂) _n -C	Deformación	55
	O	R-CH ₂ -R	O	
	Anillo	R-CH ₃	Estiramiento antisimétrico	
			O	
			Estiramiento	
1506	Anillo		Estiramiento	41

1618	Anillo		Estiramiento	39
2853	C-H	R-(CH ₂) _n -C R-CH ₂ -R	Estiramiento simétrico	75
2922	C-H	R-(CH ₂) _n -C R-CH ₂ -R	Estiramiento antisimétrico	99
3299	O-H		Estiramiento	18
3486	O-H		Estiramiento	15

Como se puede observar, es común que un mismo grupo funcional presente múltiples picos de absorción en el espectro. Además, las zonas donde se presenta un grupo funcional pueden interferir con la zona de presencia de otro grupo funcional, es por esto por lo que en algunos casos resulta imposible asignar un pico de absorción a un grupo funcional en específico. Por ejemplo, el pico de 1167 nm puede corresponder tanto al doblamiento del enlace C-H del grupo aromático, como al estiramiento del enlace C-O del sustituyente hidroxilo en el grupo aromático. Por lo tanto, este pico podría corresponder a ambos enlaces, y esta técnica no nos permite conocer a qué enlace en específico corresponde esa señal. Sin embargo, este no es el caso para todos los picos de absorción pues, como se puede observar, la mayoría de ellos presentan picos bien definidos que no se superponen con algún otro enlace logrando que sea más sencilla su identificación.

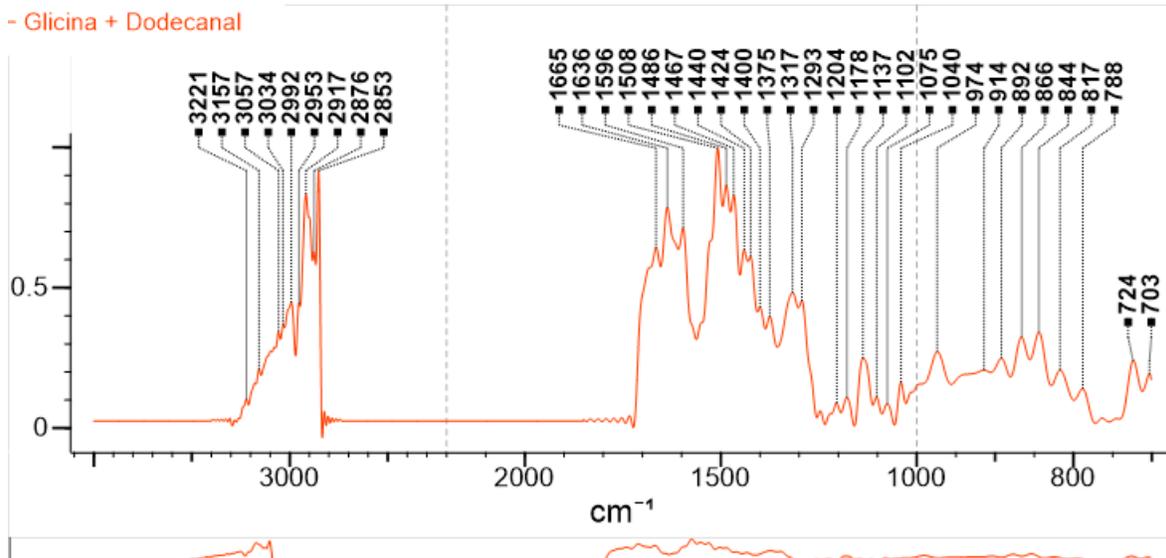
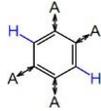


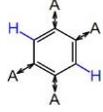
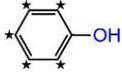
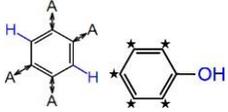
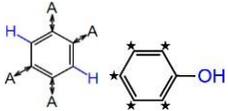
Figura 47. Espectro IR normalizado de la película de dodecanal + glicina.

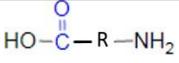
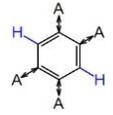
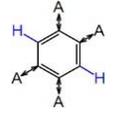
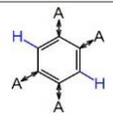
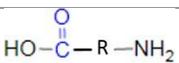
De acuerdo con lo presentado en la Figura 47, se puede observar que la presencia de glicina ocasiona un aumento significativo en las señales presentadas, las cuales en casi todo el espectro se juntaron tanto que fue difícil separarlas. Por eso, las zonas se observan con picos no muy definidos, resultando en un proceso de identificación más complicado, pero con resultados igual de confiables.

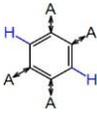
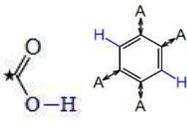
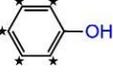
Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, se llevó a cabo el análisis utilizando la misma lógica que con la muestra anterior, y los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Análisis de los grupos funcionales presentes en el espectro IR del dodecanal + glicina (Figura 47).

Pico	Molécula	Grupo Funcional	Estructura	Modo	Intensidad (%)
703	No identificada				19
724	Dodecanal	C-C	R-(CH ₂) _n -C	Vibración estructural	24
788	Glicina	N-H	R-CH ₂ -NH ₂	Vibración	14
817	Dodecanal	C-H		Deformación	21
844	No identificada				34

866	Dodecanal	C-H		Deformación	32
892	Glicina	O-H		Deformación	25
914	Glicina	O-H		Deformación	21
974	Glicina	C-O	R-CH ₂ -OH	Estiramiento	27
1040	Glicina	C-O	R-CH ₂ -OH	Estiramiento	17
1075	Glicina	C-N	R-CH ₂ -NH ₂	Estiramiento	9
1102	No identificado				11
1137	Dodecanal	C-O		Estiramiento	25
1178	Dodecanal	C-H o C-O		Doblamiento o Estiramiento	11
1204	Dodecanal	C-H o C-O		Doblamiento o Estiramiento	9
1293	Glicina	C-O		Estiramiento	46
1317	Glicina o Dodecanal	C-O o C-H	 CH-R ₃	Estiramiento o Deformación	48
1375	Dodecanal	C-H	R-CH ₃	Deformación simétrica	40
1400	Glicina	O-H o		Deformación o	43

		C=O		Estiramiento	
1424	Glicina	O-H	R-CH ₂ -OH	Deformación	61
1440	Glicina o Dodecanal	O-H o C-H o Anillo	R-CH ₂ -OH R-CH ₃ 	Deformación o Estiramiento antisimétrico o Estiramiento	64
1467	Glicina o Dodecanal	C-H	R-CH ₂ -R R-(CH ₂) _n -C R-CH ₂ -R R-CH ₃	Deformación o Estiramiento antisimétrico	83
1486	Dodecanal	Anillo		Estiramiento	87
1508	Dodecanal	Anillo		Estiramiento	99
1596	Glicina	C=O		Estiramiento	72
1636	Glicina	NH ₂	R-CH ₂ -NH ₂	Deformación	79
1665	Glicina	C=O		Estiramiento	65
2853	Glicina o Dodecanal	C-H	R-CH ₂ -R o R-(CH ₂) _n -C	Estiramiento simétrico o Deformación	92
2876	Dodecanal	C-H	R-CH ₃	Estiramiento antisimétrico	63

2917	Glicina o Dodecanal	C-H	R-CH ₂ -R o R-(CH ₂) _n -C	Estiramiento antisimétrico	84
2953	Dodecanal	C-H	R-CH ₃	Estiramiento antisimétrico	45
2992	Glicina	O-H		Estiramiento	45
3034	Dodecanal	C-H		Estiramiento	37
3057	Glicina o Dodecanal	O-H o C-H		Estiramiento	34
3157	Dodecanal	O-H		Estiramiento	21
3221	Glicina	O-H	R-CH ₂ -OH	Estiramiento	11

Se puede observar que los resultados obtenidos con la interacción de la glicina demuestran la presencia de picos atribuibles a este aminoácido, así como la contribución del dodecanal por sí mismo.

Estos resultados demuestran que el dodecanal adsorbió a la glicina, pues se encuentran las señales de ambos compuestos.

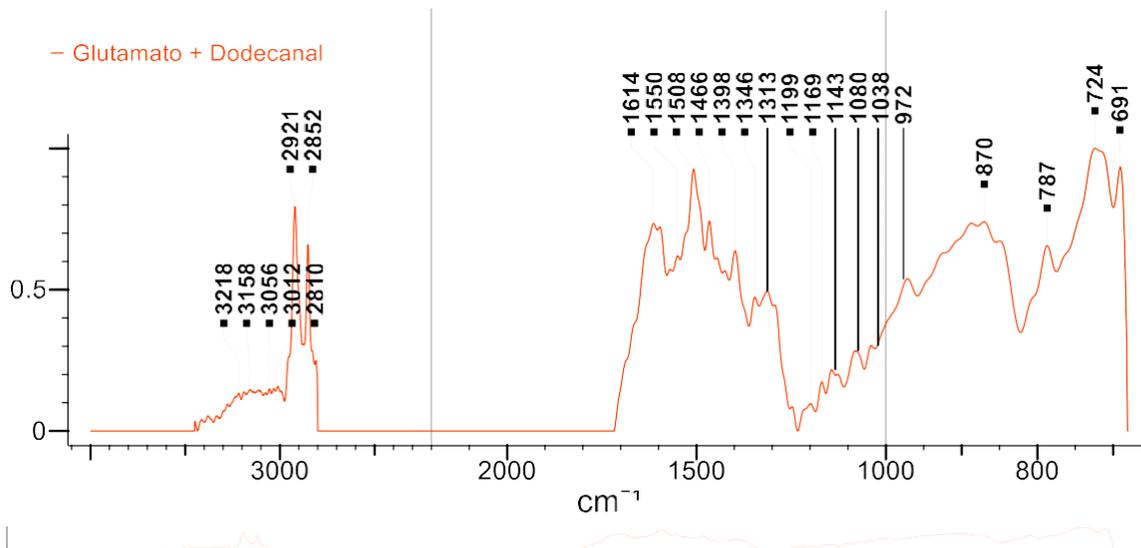
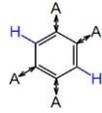
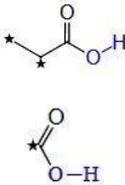
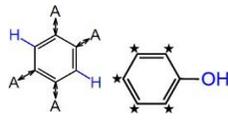
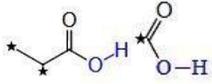
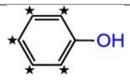
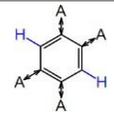
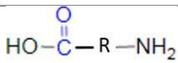
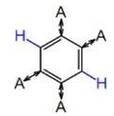


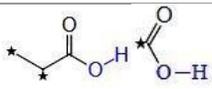
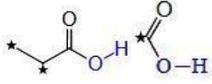
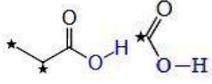
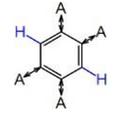
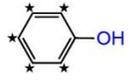
Figura 48. Espectro IR normalizado de la película de dodecanal + L-glutamato.

El espectro obtenido para el glutamato es diferente al de la glicina, pero conserva las dos zonas de picos presentes en el espectro del dodecanal, incluyendo sus dos picos característicos mencionados con anticipación.

Tabla 4. Análisis de los grupos funcionales presentes en el espectro IR del dodecanal + L-glutamato (Figura 48).

Pico	Molécula	Enlace	Grupo Funcional	Modo	Intensidad (%)
691	No identificado				93
724	Dodecanal	C-C	$R-(CH_2)_n-C$	Vibración estructural	99
787	Glutamato	N-H	$R_2-CH-NH_2$	Vibración	65
870	Dodecanal	C-H		Deformación	74
972	Glutamato	O-H		Deformación	54
1038	Glutamato	C-N	$R_2-CH-NH_2$	Estiramiento	30

1080	Glutamato	C-O	R-CH ₂ -OH	Estiramiento	28
1143	Glutamato	C-N	R ₂ -CH-NH ₂	Estiramiento	22
1169	Glutamato	C-N	R ₂ -CH-NH ₂	Estiramiento	17
1199	Dodecanal	C-H O C-O		Doblamiento O Estiramiento	10
1313	Glutamato	C-O		Estiramiento	49
1346	Glutamato o Dodecanal	C-H	CH-R ₃	Deformación	47
1398	Glutamato	O-H		Deformación	64
1466	Glutamato o Dodecanal	O-H o C-H	R-CH ₂ -OH R-(CH ₂) _n -C R-CH ₂ -R R-CH ₃	Deformación o Estiramiento antisimétrico	74
1508	Dodecanal	Anillo		Estiramiento	93
1550	Glutamato	C=O		Estiramiento	62
1614	Glutamato o Dodecanal	NH ₂ o Anillo	R ₂ -CH-NH ₂ 	Deformación o Estiramiento	73
2810	No identificado				25
2852	Glutamato	C-H	R-CH ₂ -R	Estiramiento	66

	o Dodecanal		$R-(CH_2)_n-C$	simétrico	
2921	Glutamato o Dodecanal	O-H o C-H	 $R-CH_2-R$ $R-(CH_2)_n-C$	Estiramiento o Estiramiento antisimétrico	79
3012	Glutamato o Dodecanal	O-H o C-H	 	Estiramiento	16
3056	Glutamato o Dodecanal	O-H o C-H	 	Estiramiento	15
3158	Dodecanal	O-H		Estiramiento	15
3218	Glutamato	O-H	$R-CH_2-OH$	Estiramiento	13

Como se observa, varios de los picos presentes corresponden a enlaces del grupo funcional característico del L-glutamato en la posición R.

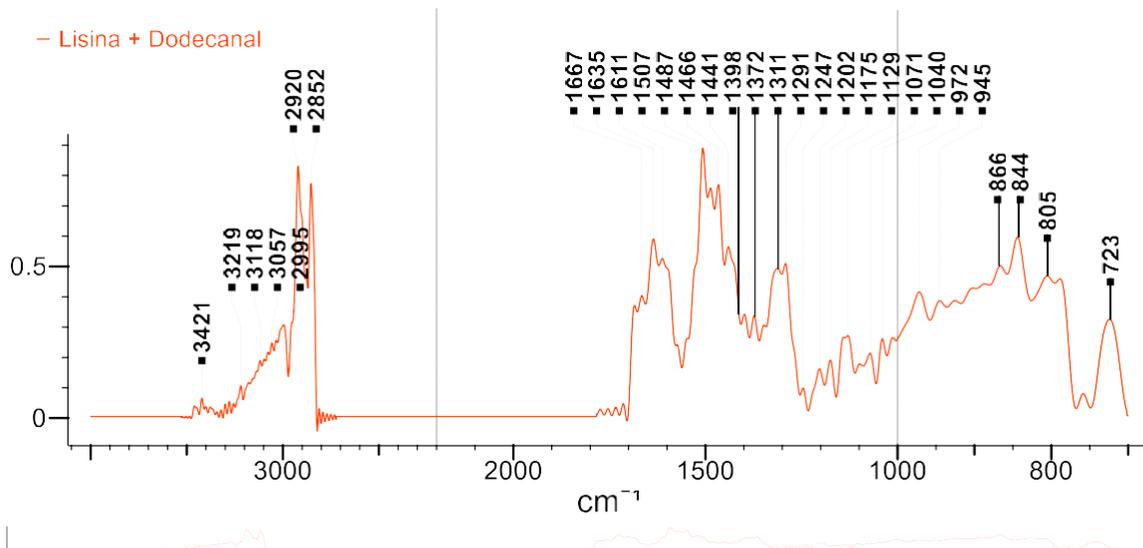
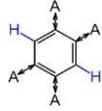
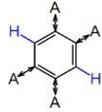
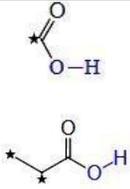
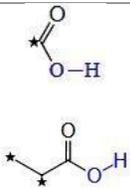
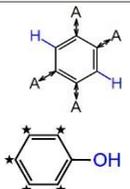
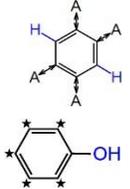
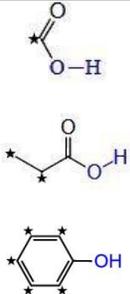
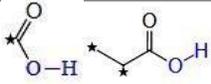
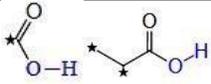


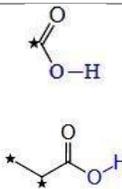
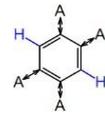
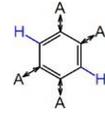
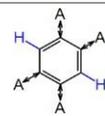
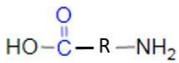
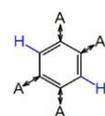
Figura 49. Espectro IR normalizado de la película de dodecanal + L-lisina.

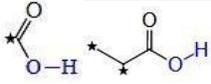
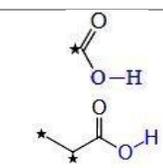
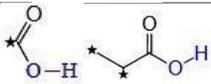
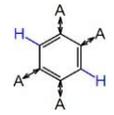
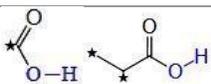
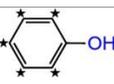
Los resultados de la lisina son de manera similar a los anteriores aminoácidos, y su análisis se presenta en la tabla 5.

Tabla 5. Análisis de los grupos funcionales presentes en el espectro IR del dodecanal + L-lisina (Figura 49).

Pico	Molécula	Enlace	Grupo funcional	Modo	Intensidad (%)
723	Lisina o Dodecanal	C-C	R-(CH ₂) _n -C	Vibración estructural	33
805	Lisina o Dodecanal	N-H o C-H	R-CH ₂ -NH ₂ R ₂ -CH-NH ₂ 	Vibración o Deformación	47
844	Lisina	N-H	R-CH ₂ -NH ₂ R ₂ -CH-NH ₂	Vibración	60
866	Dodecanal	C-H		Deformación	51

945	Lisina	O-H		Deformación	39
972	Lisina	O-H		Deformación	42
1040	Lisina	C-N	$R_2-CH-NH_2$	Estiramiento	26
1071	Lisina	C-O o C-N	$R-CH_2-OH$ $R-CH_2-NH_2$	Estiramiento	22
1129	Lisina	C-N	$R_2-CH-NH_2$	Estiramiento	27
1175	Dodecanal	C-H o C-O		Doblamiento o Estiramiento	19
1202	Dodecanal	C-H o C-O		Doblamiento o Estiramiento	16
1247	Lisina o Dodecanal	C-O		Estiramiento	10
1291	Lisina	C-O		Estiramiento	51
1311	Lisina	C-O		Estiramiento	49

1372	Dodecanal	C-H	R-CH ₃	Deformación simétrica	34
1398	Lisina	O-H		Deformación	34
1441	Lisina o Dodecanal	O-H o C-H o Anillo	R-CH ₂ -OH R-CH ₃ 	Deformación o Estiramiento antisimétrico o Estiramiento	56
1466	Lisina o Dodecanal	O-H o C-H	R-CH ₂ -OH R-(CH ₂) _n -C R-CH ₂ -R R-CH ₃	Deformación o Estiramiento antisimétrico	77
1487	Dodecanal	Anillo		Estiramiento	76
1507	Dodecanal	Anillo		Estiramiento	89
1611	Lisina o Dodecanal	NH ₂ o C=O o Anillo	R ₂ -CH-NH ₂ R-CH ₂ -NH ₂  	Deformación o Estiramiento	53
1635	Lisina	NH ₂	R ₂ -CH-NH ₂	Deformación	60

			R-CH ₂ -NH ₂		
1667	Lisina	C=O		Estiramiento	40
2852	Lisina o Dodecanal	C-H	R-(CH ₂) _n -C R-CH ₂ -R	Estiramiento simétrico	78
2920	Lisina o Dodecanal	O-H o C-H	 R-(CH ₂) _n -C R-CH ₂ -R	Estiramiento o Estiramiento antisimétrico	83
2995	Lisina	O-H		Estiramiento	31
3057	Lisina o Dodecanal	O-H o C-H	 	Estiramiento	25
3118	Lisina	O-H		Estiramiento	19
3219	Dodecanal	O-H		Estiramiento	11
3421	Lisina	N-H	R ₂ -CH-NH ₂ R-CH ₂ -NH ₂	Estiramiento antisimétrico	6

Estos resultados muestran muchos picos correspondientes a la L-lisina, pero también hay muchos picos a los cuales no se le pueden asignar a una molécula en particular, ya sea al dodecanal o a la lisina, debido a la superposición de señales en las que están sus respectivos grupos funcionales.

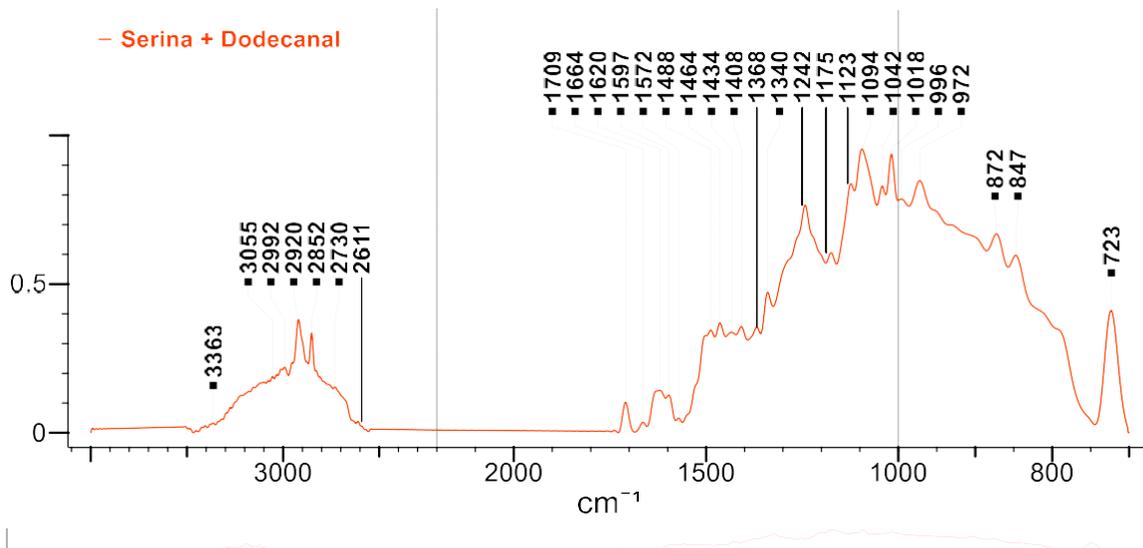
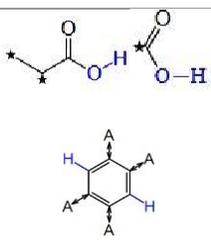
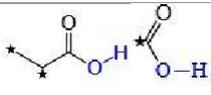
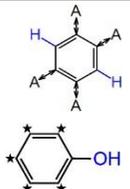
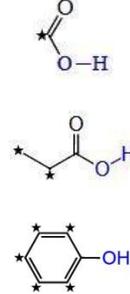
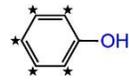
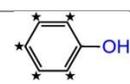
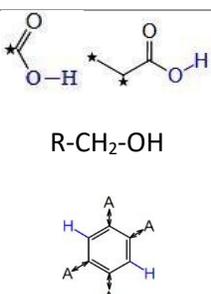
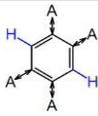
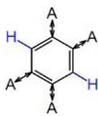
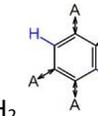
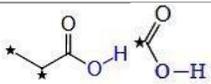
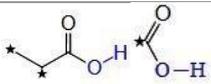


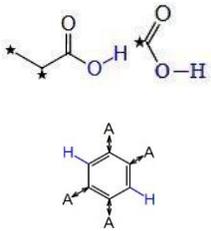
Figura 50. Espectro IR normalizado de la película de dodecanal + L-serina.

Tabla 6. Análisis de los grupos funcionales presentes en el espectro IR del dodecanal + L-serina (Figura 50).

Pico	Molécula	Enlace	Grupo funcional	Modo	Intensidad (%)
723	Dodecanal	C-C	R-(CH ₂) _n -C	Vibración estructural	41
847	Serina	N-H	R ₂ -CH-NH ₂	Vibración	60
872	Serina o Dodecanal	O-H o C-H		Deformación	67
972	Serina	O-H		Deformación	85
996	No Identificado				79
1018	Serina	C-O	R-CH ₂ -OH	Estiramiento	94
1042	Serina	C-O o C-N	R-CH ₂ -OH R ₂ -CH-NH ₂	Estiramiento	83

1094	Serina	C-N	$R_2-CH-NH_2$	Estiramiento	96
1123	Serina	C-N	$R_2-CH-NH_2$	Estiramiento	84
1175	Dodecanal	C-H o C-O		Doblamiento o Estiramiento	60
1242	Serina o Dodecanal	C-O		Estiramiento	77
1340	Serina o Dodecanal	C-H o O-H	$CH-R_3$ 	Deformación	47
1368	Dodecanal	O-H		Deformación	36
1408	Serina	C=O	$HO-C(=O)-R-NH_2$	Estiramiento	36
1434	Serina o Dodecanal	O-H o Anillo		Deformación o Estiramiento	34
1464	Serina o Dodecanal	C-H o O-H	$R-CH_2-OH$ $R-CH_2-R$ $R-(CH_2)_n-C$ $R-CH_3$	Deformación o Estiramiento antisimétrico	37

1488	Dodecanal	Anillo		Estiramiento	34
1572	Serina	C=O	$\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}-\text{NH}_2$	Estiramiento	5
1597	Serina o Dodecanal	C=O o NH ₂ o Anillo	$\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}-\text{NH}_2$ $\text{R}_2-\text{CH}-\text{NH}_2$ 	Estiramiento o Deformación	13
1620	Serina o Dodecanal	NH ₂ o Anillo	$\text{R}_2-\text{CH}-$  NH ₂	Deformación o Estiramiento	15
1664	Serina	O-H		Estiramiento	4
1709	Serina	O-H		Estiramiento	10
2611	No identificados				4
2730	No identificados				16
2852	Serina o Dodecanal	C-H	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{R}$ $\text{R}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}$	Estiramiento simétrico	34
2920	Serina o Dodecanal	O-H o C-H	 $\text{R}-\text{CH}_2-\text{R}$ $\text{R}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}$	Estiramiento o Estiramiento antisimétrico	38
2992	Serina	O-H		Estiramiento	22

3055	Serina o Dodecanal	O-H o C-H		Estiramiento	19
3363	Serina	N-H o O-H	$R_2-CH-NH_2$ $R-CH_2-OH$	Estiramiento antisimétrico o Estiramiento	4

Todos estos resultados nos indican la presencia de los aminoácidos en las películas de dodecanal, por lo que se puede demostrar que hubo un proceso de adsorción en las películas.

6. Formación del purpura de Ruhemann con ninhidrina.

El impedimento en el uso de la espectroscopia ultravioleta-visible para la obtención de espectros de absorción no impidió el uso de este equipo para la cuantificación de aminoácidos adsorbidos en las películas del resorcinareno.

Esta técnica nos permite, de manera indirecta, conocer la concentración de aminoácidos adsorbidos por los resorcinarenos partiendo del principio de que, al haber un proceso de adsorción, la solución que entró en contacto con el dodecanal presentará una disminución en su concentración de aminoácidos, la cual, podrá ser cuantificada por medio de la reacción con ninhidrina y la formación del purpura de Ruhemann.

Para conocer la concentración exacta de las soluciones de aminoácidos al inicio del experimento y después de la interacción con los resorcinarenos, fue necesario generar curvas de calibración para cada aminoácido, pues el trabajo en el laboratorio sugirió que la cinética de reacción en la formación del complejo purpura cambiaba dependiendo del aminoácido. Por lo tanto, no era recomendable generar una sola curva, pues esto generaría un error metodológico. Además, si la reacción no se cuantifica en un tiempo razonable, el complejo se precipita impidiendo así la cuantificación por espectroscopía UV-vis.

Para resolver este problema se determinó la formación de una curva de calibración para cada aminoácido utilizando soluciones preparadas el mismo día, y dejando correr la reacción por un tiempo promedio de media hora considerando los desfases que la manipulación de tantas muestras implicaba. Posterior al tiempo de interacción, se procedió a medir la reacción en el espectrofotómetro, y así generar la curva de calibración.

Para comprobar que la solución stock del buffer de fosfatos pH= 7.4 no se encontrara contaminada con aminoácidos, se realizó la prueba agregando ninhidrina en exceso a 5 mL de

buffer, y dejando incubar a temperatura ambiente por 24 h dando un resultado negativo a la presencia del color morado.

A continuación, se muestran los resultados de los diferentes aminoácidos.

- Formación del compuesto colorido con glicina.

Ya comprobado que el buffer de fosfatos no se encontraba contaminado, se comenzó con la preparación de las soluciones de aminoácidos de concentraciones conocidas para la generación de las curvas de calibración. Para mayor comodidad, y por prácticas ya realizadas en el laboratorio, se utilizaron concentraciones en ppm (partes por millón o mg/L) para la preparación de las soluciones. Sin embargo, en la tabla 7 se muestra también su equivalente en concentraciones M, y además, se muestra un ejemplo de las conversiones utilizadas.

Se preparó una “solución madre” de glicina a una concentración de 1000 ppm pesando 20 mg de glicina en polvo para prepararla en 20 mL aforando con buffer de fosfatos, y 8 mL de ninhidrina 0.1 M preparada en el laboratorio. Se utilizó este volumen para asegurar que la ninhidrina se encontrara en exceso para que no fuera el reactivo limitante en la reacción.

Después, se realizaron las diluciones correspondientes para formar los puntos en la curva. Cada solución resultante se llevó al aforo de 5 mL con buffer de fosfatos, para calcular el volumen de solución madre que se necesitaba para cada concentración en el intervalo de 0 y 400 ppm. A continuación, se muestra un cálculo ejemplificado con la solución de 400 ppm.

$$0.005 \text{ L volumen final} \left(\frac{400 \text{ mg concentración deseada}}{1 \text{ L concentración deseada}} \right) \left(\frac{1000 \text{ mL solución madre}}{1000 \text{ mg solución madre}} \right) \\ = 2 \text{ mL de alícuota de la solución madre.}$$

Tabla 7. Datos y resultados de las soluciones utilizadas para la curva de calibración de glicina.

Concentración (PPM)	Concentración (M)	Volumen de “solución madre” (mL)	Volumen de buffer de fosfatos pH 7.4 (mL)	Absorbancia a 750 nm
0	0	-	5	0
50	6.66 E-4	0.25	4.75	0.01878
70	9.32 E-4	0.35	4.65	0.03337
80	10.66 E-4	0.4	4.60	0.03224
100	13.32 E-4	0.5	4.5	0.04230
200	26.64 E-4	1	4	0.08489
400	53.28 E-4	2	3	0.20654

Para la conversión de ppm a M se utilizaron los siguientes factores de conversión. A continuación, se muestra como ejemplo la concentración de 50 ppm:

$$\left(\frac{50 \text{ mg}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol}}{75.067 \text{ g}} \right) = 6.66 \text{ E} - 04 \text{ M}$$

Usando los datos de la tabla anterior, se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación que permitió calcular la diferencia de las concentraciones antes y después de la interacción con el dodecanal.

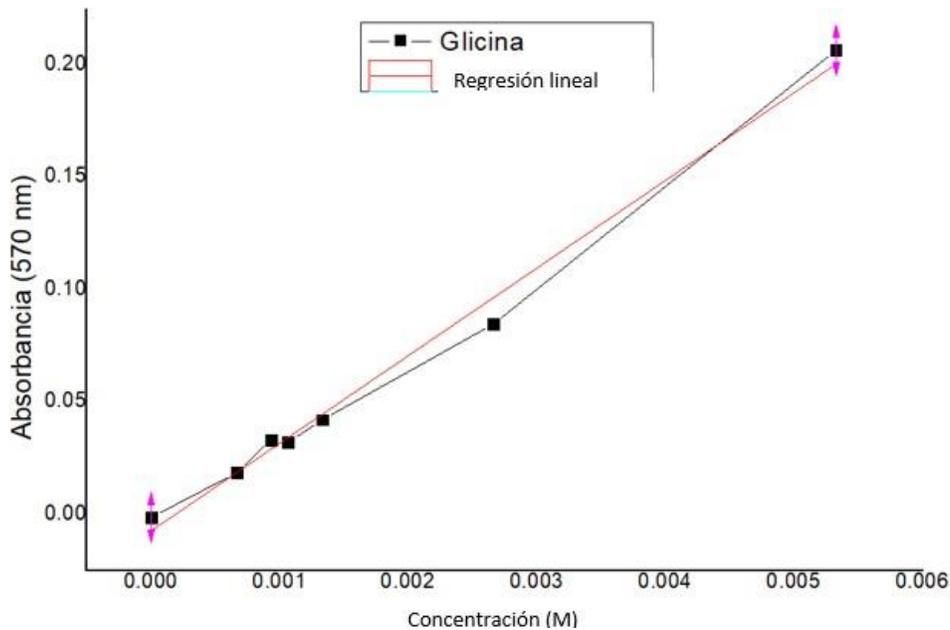


Figura 51. Curva de calibración de la glicina.

Tabla 8. Ecuación de la regresión lineal de glicina (Figura 51).

Ecuación para calcular la concentración (X)		X = (y - a) / b	Y = absorbancia
R cuadrada	0.9915		
		Valor	Error Estándar
Absorbancia	Intercepto (a)	- 0.00711	0.00377
Absorbancia	Pendiente (b)	38.93714	1.58375

La dilución de aminoácidos para los experimentos fue preparada intentando llegar a una concentración de 0.1 M, aproximadamente. Sin embargo, se detectó que el polvo se encontraba hidratado, por lo que se procedió a cambiar de concentración M a ppm en la solución preparada para los experimentos con el fin de diluirla, de tal manera que su concentración se encontrara dentro de los valores de la curva de calibración.

$$\left(\frac{0.1 \text{ mol de gly}}{1 \text{ L}}\right) \left(\frac{75.067 \text{ g}}{1 \text{ mol de gly}}\right) \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}\right) = 7506.7 \text{ ppm de glicina}$$

Como primera dilución, y debido a los materiales disponibles, se procedió a preparar una solución de 1000 ppm en un matraz aforado de 20 mL a partir de la solución stock o inicial que es la utilizada para los experimentos, llegando al aforo con buffer de fosfatos pH= 7.

$$0.02 \text{ L solución final} \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ L}}\right) \left(\frac{1000 \text{ mL}}{7506.7 \text{ mg solución stock}}\right) = 2.664 \text{ mL de solución stock}$$

$$F.D = 20/2.66$$

Por último, realizamos una dilución de la solución A con el fin de obtener una concentración de 100 ppm en un matraz de 5 mL, que nos permitiera ocuparla en la curva de calibración generada.

$$0.005 \text{ L solución final B} \left(\frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{1000 \text{ mL}}{1000 \text{ mg solución A}} \right) = 0.5 \text{ mL de solución A}$$

$$F.D = 5/0.5$$

Para llegar al aforo, se utilizó un buffer de fosfatos pH= 7 y ninhidrina 0.1 M. Para saber cuánta ninhidrina agregar para que fuera de manera equivalente a la agregada en la solución madre de la curva de calibración, se emplearon conversiones de equivalencia para encontrar el valor de ninhidrina requerido para un volumen de 5ml, que correspondió a 0.2 mL. Este fue el volumen agregado a la solución final B para poder ser medido en el espectrofotómetro.

El procedimiento anterior se realizó tanto para la solución de aminoácidos inicial como para la solución resultante después de la interacción con el dodecanal.

Ambas soluciones fueron medidas en el espectrómetro, y los resultados se ajustaron a la ecuación de la recta, donde los factores de dilución (F.D) fueron los siguientes:

Tabla 9. Resultados de las soluciones muestra, en donde la solución inicial se refiere a la solución de aminoácidos utilizada para los experimentos y solución final a la solución residual después de la interacción con la película de dodecanal.

	Absorción 750 nm	Concentración (M)	Factor de Dilución	Concentración real (M)
Solución inicial	0.05276	15.37 E-04	(20/2.66)(5/0.5)	0.1156
Solución final	0.02008	6.98 E-04	(20/2.66)(5/0.5)	0.0525

Al obtener las concentraciones de las soluciones de aminoácidos y sabiendo que la interacción con la película de dodecanal fue con un volumen de 5 mL, se pudo conocer la cantidad de glicina adsorbida por la película con los siguientes cálculos:

$$0.1156 \text{ M} - 0.0525 \text{ M} = 0.0631 \text{ M}$$

$$0.005 \text{ L} \left(\frac{0.0631 \text{ mol de gly}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{75.067 \text{ g}}{1 \text{ mol de gly}} \right) \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) = 23.68 \text{ mg de glicina adsorbida por el dodecanal}$$

- Formación del compuesto colorido con L-glutamato

De manera similar a lo realizado para la glicina, se preparó una solución madre de 1,000 ppm de L-glutamato para obtener los datos de la curva de calibración.

Tabla 10. Datos y resultados de las soluciones utilizadas para la curva de calibración del L-glutamato.

Concentración (PPM)	Concentración (M)	Volumen de "solución madre" (mL)	Volumen de buffer de fosfatos pH 7.4 (mL)	Absorbancia a 750 nm
0	0	-	5	0
50	2.96 E-4	0.25	4.75	0.00959
70	4.14 E-4	0.35	4.65	0.01355
80	4.73 E-4	0.4	4.60	0.01797
100	5.91 E-4	0.5	4.5	0.02034
200	11.80 E-4	1	4	0.05149
400	23.60 E-4	2	3	0.10254

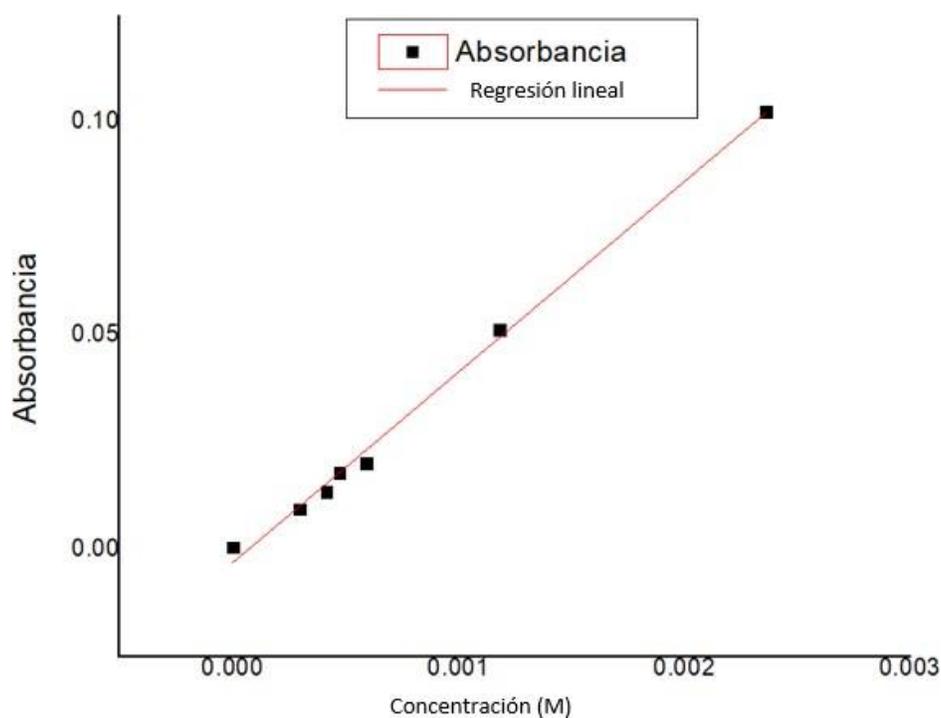


Figura 52. Curva de calibración del L-glutamato.

Tabla 11. Resultados regresión lineal de la curva de calibración de L-glutamato (Figura 52).

Ecuación para calcular la concentración (X)		$X = (y - a) / b$	Y = absorbancia
R cuadrada	0.9952		
		Valor	Error Estándar
Absorbancia	Intercepto (a)	-0.00298	0.00133
Absorbancia	Pendiente (b)	44.58914	1.2641

Tabla 12. Resultados de las soluciones muestra, en donde solución inicial se refiere a la solución de aminoácido utilizada para los experimentos y solución final a la solución residual después de la interacción con la película de dodecanal.

	Absorción 750 nm	Concentración (M)	Factor de Dilución	Concentración real (M)
Solución inicial	0.01017	2.95 E-4	169.1	0.0499
Solución final	0.00899	2.68 E-4	169.1	0.0453

Al obtener las concentraciones de las soluciones de aminoácidos, y sabiendo que la interacción con la película de dodecanal fue con un volumen de 5 mL se pudo conocer la cantidad de L-glutamato adsorbido por la película con los siguientes cálculos:

$$0.0499 M - 0.0453 M = 0.0046 M$$

$$0.005 L \left(\frac{0.0046 \text{ mol de glu}}{1 L} \right) \left(\frac{169.11 g}{1 \text{ mol de glu}} \right) \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 g} \right) = 3.89 \text{ mg de L - glutamato adsorbido por el dodecanal}$$

- Formación del compuesto colorido con L-lisina

En el procedimiento realizado para la L-lisina se utilizó una solución madre de 500 ppm.

Tabla 13. Datos y resultados de las soluciones utilizadas para la curva de calibración de L-lisina.

Concentración (PPM)	Concentración (M)	Volumen de "solución madre" (mL)	Volumen de buffer de fosfatos pH 7.4 (mL)	Absorbancia a 750 nm
0	0	-	5	0
10	6.84 E-4	0.25	4.75	0.10394
20	1.37 E-4	0.35	4.65	0.20919
50	3.42 E-4	0.4	4.60	0.51871
80	5.47 E-4	0.5	4.5	0.84911
100	6.84 E-4	1	4	1.11840
200	1.37 E-3	2	3	2.08341

Con el resultado anterior se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación que permitió calcular la diferencia de las concentraciones antes y después de la interacción con el dodecanal.

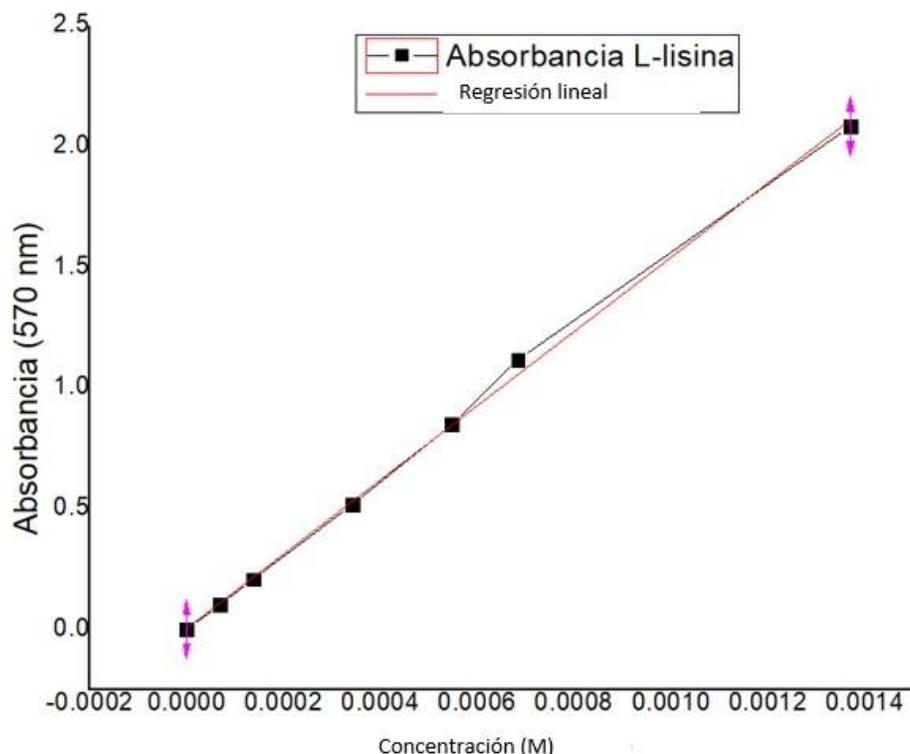


Figura 53. Curva de calibración de la L-lisina

Tabla 14. Resultados regresión lineal de la curva de calibración de la L-lisina (Figura 53).

Ecuación para calcular la concentración (X)		$X = (y - a) / b$		Y = absorbancia
R cuadrada	0.9982			
		Valor		Error Estándar
Absorbancia	Intercepto (a)	0.00701		0.01678
Absorbancia	Pendiente (b)	1535.2929		26.60

Tabla 15. Resultados de las soluciones muestra, en donde solución inicial se refiere a la solución de aminoácidos utilizada para los experimentos y solución final a la solución residual después de la interacción con la película de dodecanal.

	Absorción 750 nm	Concentración (M)	Factor de Dilución	Concentración real (M)
Solución inicial	0.86784	5.61 E-4	292.4	0.1640
Solución final	0.84755	5.47 E-4	292.4	0.1599

Al obtener las concentraciones de las soluciones de aminoácidos y sabiendo que la interacción con la película de dodecanal fue con un volumen de 5 mL se pudo conocer la cantidad de L-glutamato adsorbido por la película con los siguientes cálculos:

$$0.1640 M - 0.1599 M = 0.0041 M$$

$$0.005 \text{ L} \left(\frac{0.0041 \text{ mol de Lys}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{146.19 \text{ g}}{1 \text{ mol de Lys}} \right) \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) \\ = 2.99 \text{ mg de L - lisina adsorbida por el dodecanal}$$

- Formación del compuesto colorido con L-serina

De manera similar a los experimentos anteriores, se realizó el mismo procedimiento con la L-serina teniendo una solución madre de 4,000 ppm.

Tabla 16. Datos y resultados de las soluciones utilizadas para la curva de calibración del L-serina.

Concentración (PPM)	Concentración (M)	Volumen de "solución madre" (mL)	Volumen de buffer de fosfatos pH 7.4 (mL)	Absorbancia a 750 nm
0	0	-	5	0
500	4.76 E-3	0.625	4.375	0.11673
700	6.66 E-3	0.875	4.125	0.13482
800	7.61 E-3	1	4	0.13998
1000	9.52 E-3	1.25	3.75	0.15746
2000	19.03 E-3	2.5	2.5	0.43773

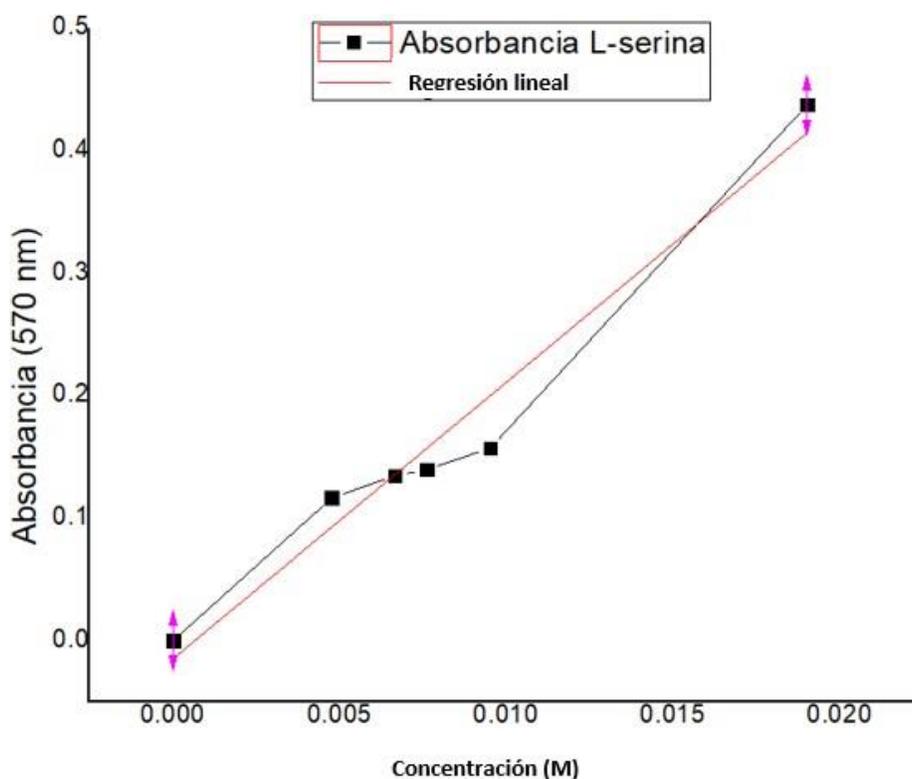


Figura 54. Curva de calibración de la L-serina.

Tabla 17. Resultados regresión lineal de la curva de calibración de la L-serina (Figura 54).

Ecuación para calcular la concentración (X)		$X = (y - a) / b$	Y = absorbancia
R cuadrada	0.95934		
		Valor	Error Estándar
Absorbancia	Intercepto (a)	-0.01454	0.02031
Absorbancia	Pendiente (b)	22.57171	2.0695

Tabla 18. Resultados de las soluciones muestra, en donde solución inicial se refiere a la solución de aminoácidos utilizada para los experimentos y solución final a la solución residual después de la interacción con la película de dodecanal.

	Absorción 750 nm	Concentración (M)	Factor de Dilución	Concentración real (M)
Solución inicial	0.13856	6.783 E-3	10.504	0.0712
Solución final	0.00521	8.75 E-4	10.504	0.0092

Al obtener las concentraciones de las soluciones de aminoácidos y sabiendo que la interacción con la película de dodecanal fue con un volumen de 5 mL se pudo conocer la cantidad de L-glutamato adsorbido por la película con los siguientes cálculos:

$$0.0712 \text{ M} - 0.0092 \text{ M} = 0.062 \text{ M}$$

$$0.005 \text{ L} \left(\frac{0.062 \text{ mol de Ser}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{105.09 \text{ g}}{1 \text{ mol de Ser}} \right) \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) = 32.58 \text{ mg de L-serina adsorbida por el dodecanal}$$

Tabla 19. Resultados de la adsorción de aminoácidos por el dodecanal utilizando el purpura de Ruhemann.

Dodecanal + a.a.	Concentración inicial (M)	Concentración final (M)	Cantidad adsorbida (mg)
Glicina	0.1156	0.0525	23.68
L-glutamato	0.0499	0.0453	3.89
L-lisina	0.1640	0.1599	2.99
L-serina	0.0712	0.0092	32.58

Los resultados obtenidos se muestran resumidos en la tabla 19, donde se puede observar que con base en los resultados obtenidos por las técnicas anteriores, los resultados mostrados con esta técnica apoyan la idea de que la glicina y serina tienden a formar agregados y por consiguiente la cantidad de aminoácido adsorbido es mayor a la de los otros dos aminoácidos.

El L-glutamato muestra, a comparación de los aminoácidos anteriores, una adsorción mucho menor lo cual va de acuerdo con la idea de que tiende a ocupar todos los espacios de adsorción disponibles por el dodecanal para posteriormente formar una película de aminoácidos adsorbidos. Después de la adsorción inicial, el L-glutamato tiende a formar agregados.

Después de ello se puede observar que la lisina es el aminoácido que presenta una menor adsorción, pues al igual que el L-glutamato, tiende a formar una película sobre el dodecanal, pero no hay evidencia que demuestre que también tiende a formar agregados posteriores por lo que la adsorción total se ve bastante disminuida.

7. QCM.

Como se mencionó en la introducción, la técnica de microbalanza de cuarzo ha sido muy utilizada para el seguimiento de la dinámica de adsorción debido a la gran sensibilidad que presenta.

Los resultados obtenidos miden el cambio en la frecuencia del cuarzo en función del tiempo. Este resultado, se puede relacionar al cambio en masa por medio de la ecuación de Sauerbrey, que señala una relación inversamente proporcional entre la disminución de la frecuencia y el aumento de masa en el cristal. En esta relación es necesario tomar en cuenta el área de interacción del cristal.

Para realizarlo se muestra el momento posterior a la inyección de la muestra de aminoácidos y su evolución durante 45 minutos, para monitorear el comportamiento que presentan durante la adsorción. Además, se realizó el experimento con buffer de fosfatos como control. El resultado se muestra en la Figura 55 para este caso.

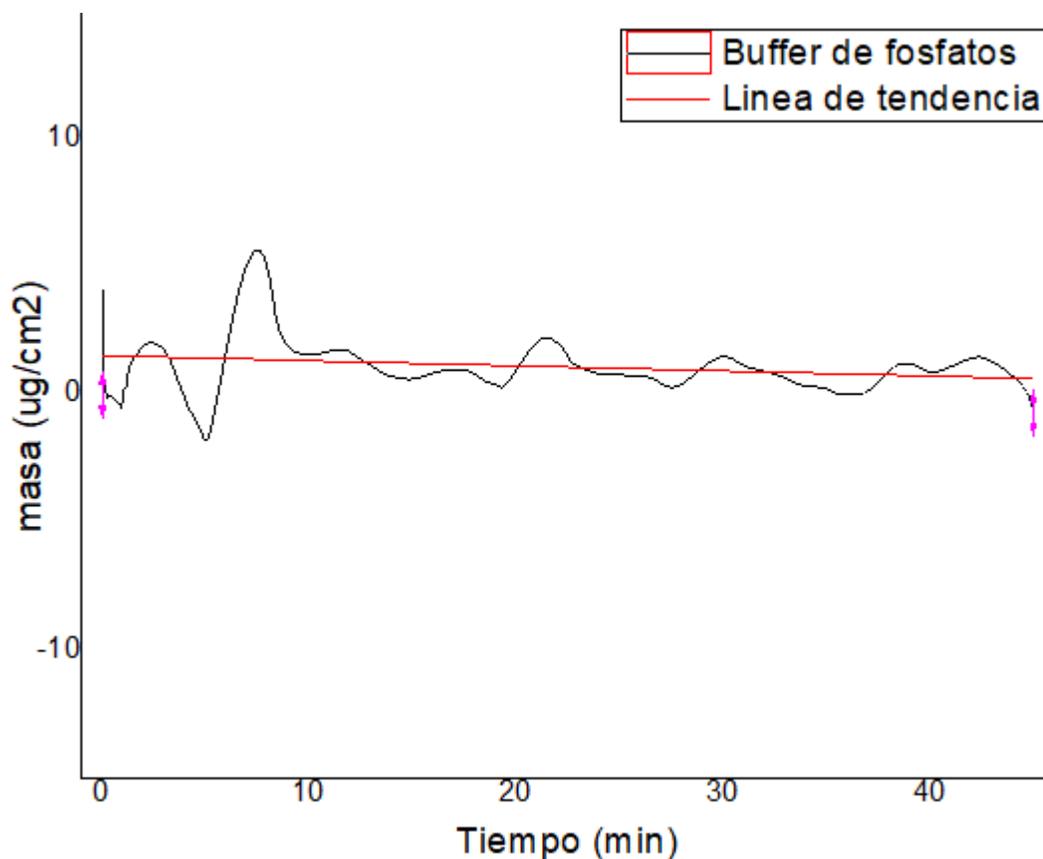


Figura 55. Evolución cinética de la adsorción de buffer de fosfatos por dodecanal medido por QCM.

Se puede ver que el buffer de fosfatos no presenta ninguna tendencia de adsorción por parte del dodecanal, manteniendo su valor cercano a cero.

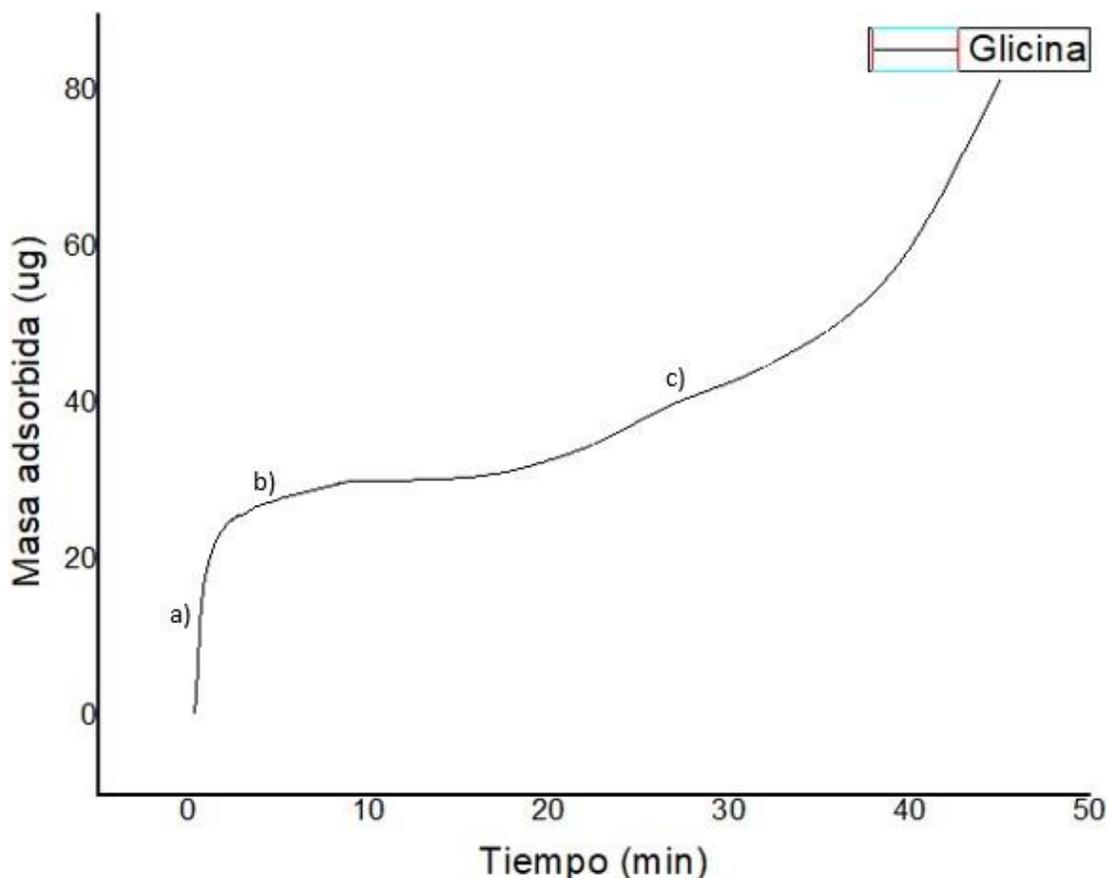


Figura 56. Evolución cinética de la adsorción de glicina por el dodecanal medido por QCM donde se identifican tres zonas con diferente comportamiento (a, b y c).

Región de la curva	a	b	C
Velocidad de adsorción ($\mu\text{g}/\text{min}$)	18.052	0.7387	—

Tabla 20. Comportamiento cinético de la adsorción de glicina en los estudios de QCM, las diferentes zonas se ajustaron a líneas rectas para la obtención del flujo de adsorción.

Como se puede observar (Figura 56), la adsorción de la glicina presenta un aumento rápido en la masa (a). Cuando se tienen flujos de adsorción elevados, generalmente se asocian a la formación de una o más capas homogéneas sobre toda la superficie. Después de esta primera etapa, se tiene un aumento más lento en la adsorción (b). Posteriormente, se llega a una nueva etapa de adsorción rápida (c) que podría indicar la etapa en la que se forman los agregados vistos en las pruebas de microscopía. Este tipo de crecimiento en la adsorción de las moléculas ha sido descrito

con anterioridad, y corresponde al modelo de nucleación mixto o de Stranski-Krastanov (Quintero Hernan, 2011). Primero se adsorben las moléculas para formar una o varias capas con un flujo de adsorción elevado, para posteriormente, continuar una adsorción en forma de islas (agregados) sobre las primeras capas. En las tablas colocadas por debajo de las curvas QCM, se muestran las velocidades de adsorción calculadas en las zonas indicadas en unidades de $\mu\text{g}/\text{min}$. Estas velocidades, se obtuvieron mediante un ajuste lineal a las zonas rectilíneas indicadas en cada gráfica.

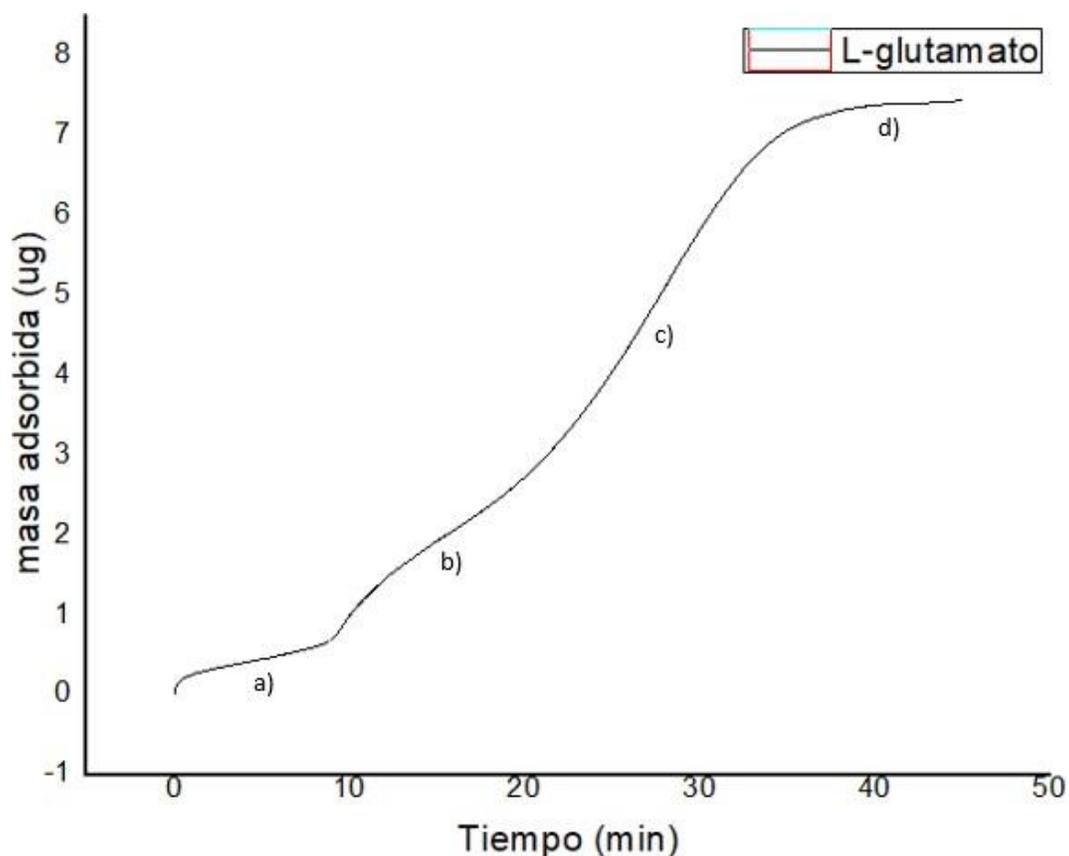


Figura 57. Evolución cinética de la adsorción de L-glutamato por el dodecanal medido por QCM donde se identifican cuatro zonas con diferente comportamiento (a, b, c y d).

Región de la curva	a	b	C	d
Velocidad de adsorción ($\mu\text{g}/\text{min}$)	0.0489	0.1616	0.3282	0.0484

Tabla 21. Comportamiento cinético de la adsorción de L-glutamato en los estudios de QCM. Las diferentes zonas se ajustaron a líneas rectas para la obtención de la velocidad de adsorción.

La Figura 57 muestra los resultados de la adsorción de L-glutamato por el dodecanal medidos por la QCM. Es evidente que la adsorción en este caso se lleva de una manera más lenta, pues no se presenta una caída de frecuencia tan drástica como con la glicina (Figura 56 y tabla 20) durante el lapso de adsorción medido. Los cambios en las pendientes de las primeras tres zonas (a, b y c) muestran un crecimiento paulatino en el flujo de adsorción. El flujo lento no es característico de la formación de una monocapa, sin embargo, se ha visto que cuando el ritmo de adsorción es lento se puede formar una monocapa si la energía de adsorción entre el adsorbato y el adsorbente es alta (Quintero Hernan, 2011). Esto, puede demostrar el hecho de que en las pruebas de microscopía se observe la formación de una capa de adsorción sobre toda la superficie de la película ajustándose al modelo de nucleación de Frank-Van der Merwe, donde los adsorbentes quedan adsorbidos en las posiciones de llegada; si la densidad de puntos de adsorción es uniforme, los núcleos se extienden sobre toda la superficie en forma homogénea, con la formación de una monocapa, y el crecimiento sería de monocapa en monocapa.

El último cambio de pendiente (d) sugiere la disminución de la adsorción hasta llegar a una pendiente cercana a cero. Esto indica que nos acercamos al punto máximo en que la interfase puede adsorber el L-glutamato, es decir, un punto de saturación.

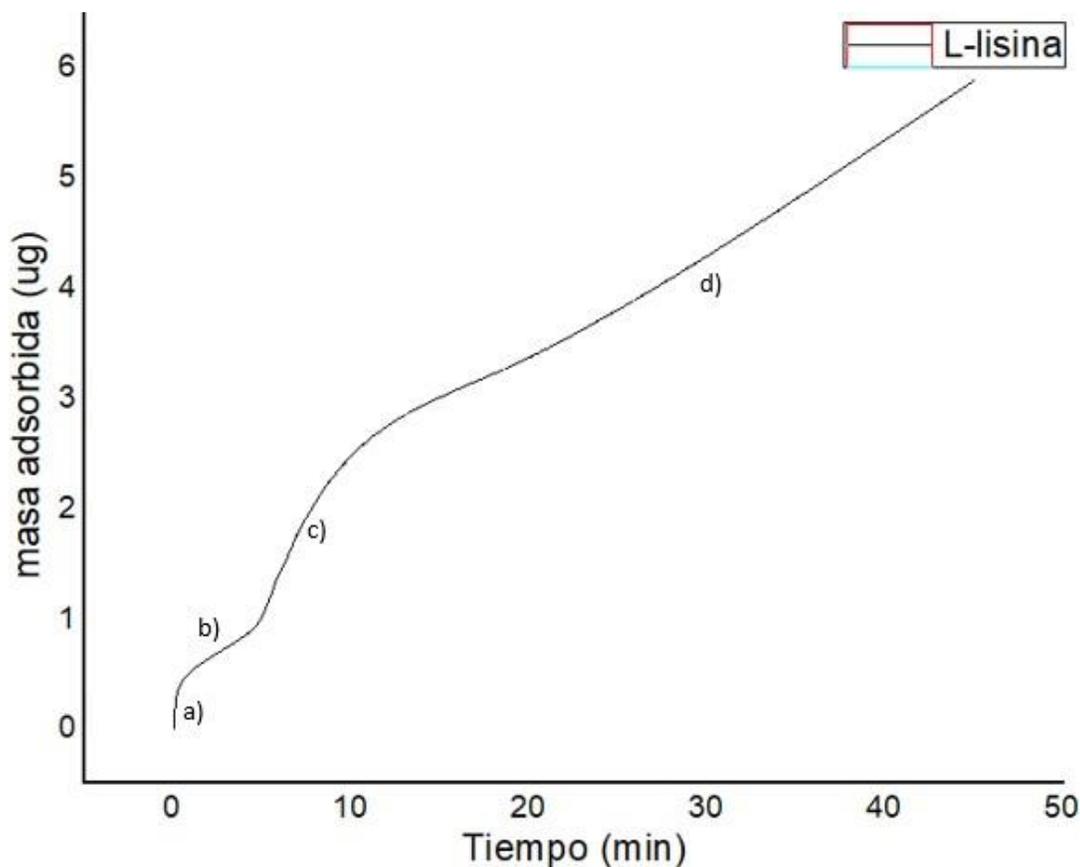


Figura 58. Evolución cinética de la adsorción de L-lisina por el dodecanal medido por QCM donde se identifican cuatro zonas con diferente comportamiento (a, b, c y d).

Región de la curva	a	b	C	d
Flujo de adsorción (µg/min)	0.6458	0.1066	0.2597	0.0973

Tabla 22. Comportamiento cinético de la adsorción de L-lisina en los estudios de QCM, las diferentes zonas se ajustaron a líneas rectas para la obtención del flujo de adsorción.

Los resultados de la L-lisina se presentan en la Figura 58. Al igual que el glutamato, la lisina presenta una adsorción pequeña y lenta pues sus pendientes no son pronunciadas. Sin embargo, se puede observar que en la pendiente “a” se comenzaba con un mayor flujo que se puede deber a su carga positiva y grupos funcionales que pueden formar puentes de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo con las cabezas del dodecanal. Estas interacciones parecen ser fuertes, aunque solo actúan durante los primeros minutos del experimento. El resto del comportamiento (b, c y d) muestra un flujo pequeño, y no se llegó a una asíntota final como en el caso del L-glutamato. Sin embargo, a partir de los primeros 10 min, se observa un crecimiento constante de tipo lineal. Este comportamiento se ajusta de igual manera con el modelo de Frank- Van der Merwe.

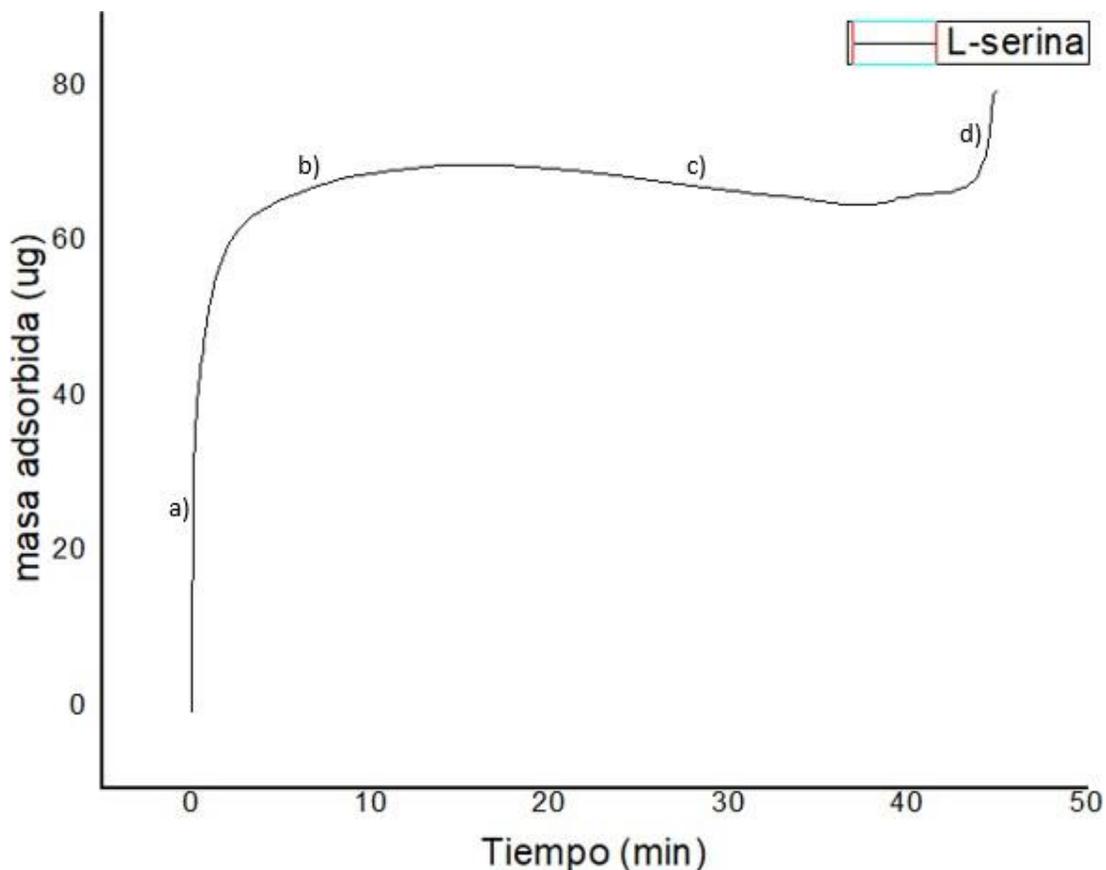


Figura 59. Evolución cinética de la adsorción de L-serina por el dodecanal medido por QCM donde se identifican cuatro zonas con diferente comportamiento (a, b, c y d).

Región de la curva	a	b	C	d
Flujo de adsorción (µg/min)	12.3740	0.7649	-0.2743	12.5010

Tabla 23. Comportamiento cinético de la adsorción de L-serina en los estudios de QCM, las diferentes zonas se ajustaron a líneas rectas para la obtención del flujo de adsorción.

Los resultados correspondientes a la L-serina (Figura 59) muestran un comportamiento diferente a los vistos previamente. Se puede observar que la adsorción se lleva a cabo de manera casi instantánea (a), presentando una pendiente muy grande durante los primeros dos minutos. Esto explica la formación de una capa homogénea. El flujo de adsorción disminuyó hasta que se llegó a la región (c) en donde se tiene un proceso de desorción. Sin embargo, el proceso de desorción fue corto y con un flujo de desorción pequeño. Al final de la medición se presentó una segunda etapa de adsorción (d) que indica el proceso de formar agregados como los observados en las microscopías. Los resultados se ajustan al modelo mixto de Stranski-Krastanov.

Cabe señalar que los experimentos en la QCM se dejaron correr por 45 minutos, aunque el resto de los experimentos se llevó a cabo durante 30 minutos; los resultados de QCM se presentan a continuación.

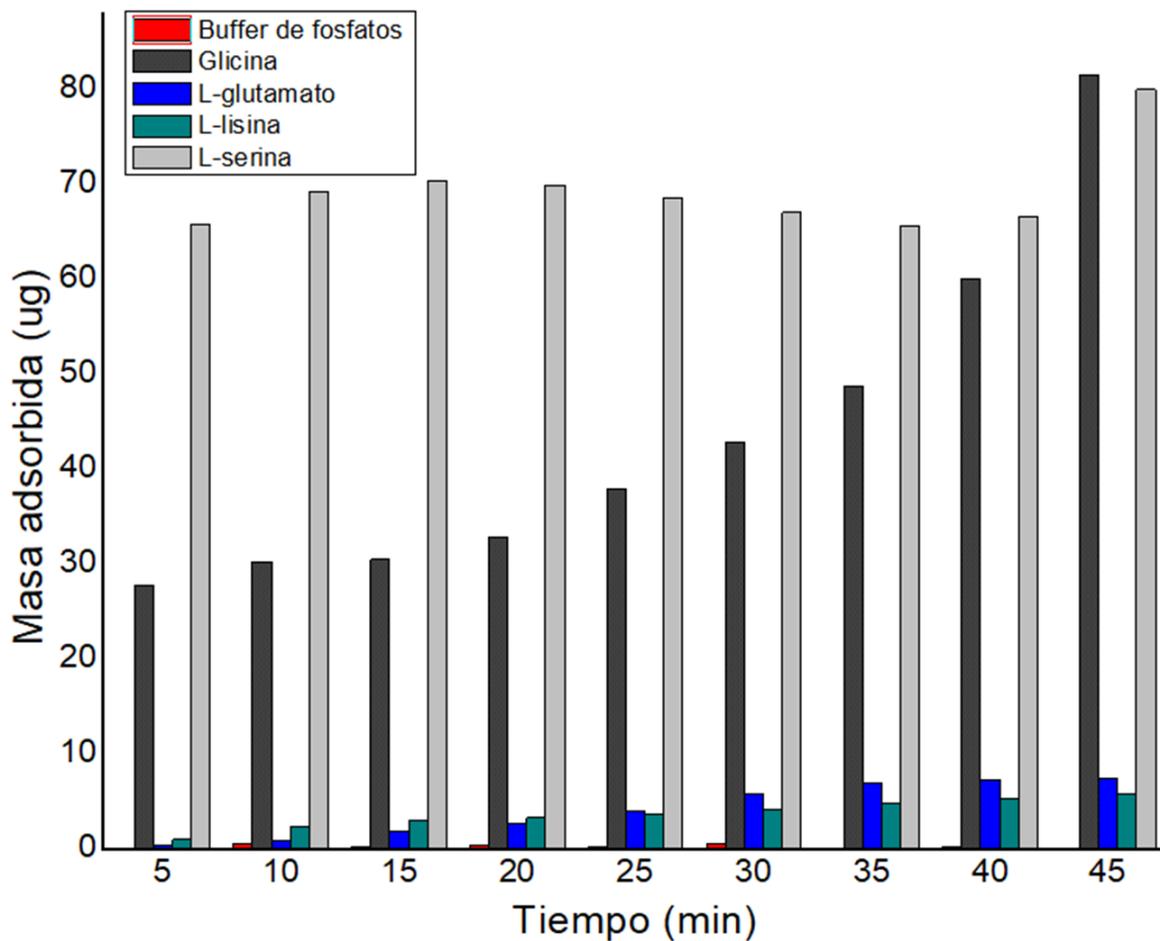


Figura 60. Resultado del cambio de masa de los aminoácidos adsorbidos por el dodecanal usando la QCM a diferentes tiempos.

Los resultados de la Figura 60 muestran el proceso de adsorción de los aminoácidos a diferentes tiempos, confirmando al igual que en los experimentos del purpura de Ruhemann, la tendencia del dodecanal de interactuar más con ciertos aminoácidos.

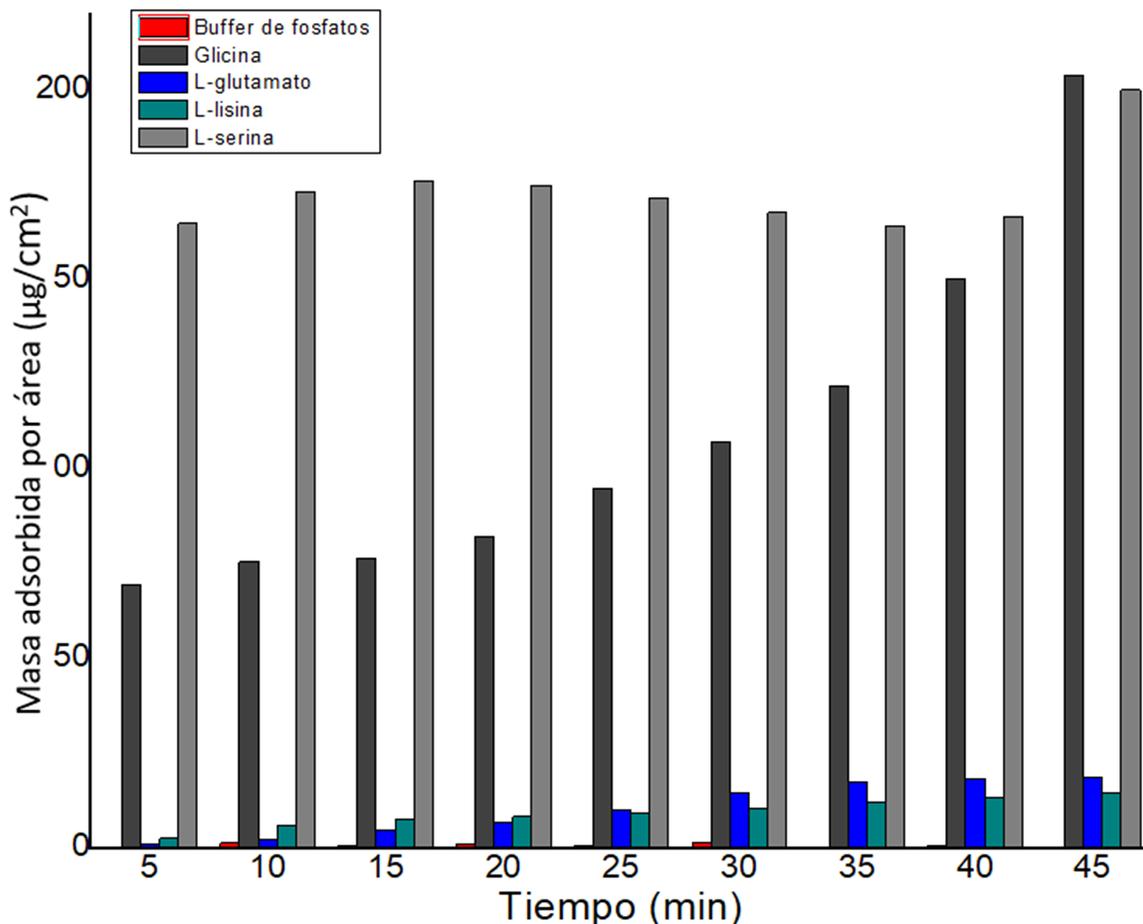


Figura 61. Resultados del cambio de masa de los aminoácidos adsorbidos por el dodecanal usando la QCM, considerando que el área de interacción del cristal de cuarzo es de 0.4 cm².

Los resultados obtenidos muestran la cantidad de aminoácido adsorbido por el dodecanal y muestran que la L-serina y la glicina son los aminoácidos que más se adsorben debido a que tienen a formar multicapas y agregados sobre la superficie de la película. La glicina es la más adsorbida y sus agregados son los más grandes.

Los dos aminoácidos restantes no forman agregados y generan una o más monocapas de adsorción con el dodecanal, siendo más afines debido a las cargas que presentan, pero resultando en una cantidad menor de aminoácido adsorbido.

Estos resultados están de acuerdo con el estudio del púrpura de Ruhemann que dio exactamente la misma tendencia de adsorción.

8. DFT.

La Figura 62 muestra las imágenes de la optimización geométrica de la interacción entre el dodecanal y los aminoácidos glicina y glutamato en agua, ya que la interacción inicial se dio en la solución buffer. La interacción entre la glicina por la parte de la corona y por las cadenas

hidrocarbonadas se observa en las figuras 62a y 62b, respectivamente. En el primer caso, se ve una interacción tipo puente de hidrógeno entre el grupo carboxilo del aminoácido con uno de los anillos aromáticos del macrociclo, el cual presenta la pérdida de un hidrógeno en uno de sus extremos. Lo anterior, tiene el efecto de levantar los grupos fenilos, dejando únicamente uno de ellos en dirección contraria en una configuración tipo silla. Las cadenas no sufren ninguna alteración importante. Por otro lado, debido al tamaño pequeño de la glicina, esta se acomoda perfectamente entre las cadenas expandiéndolas un poco para tener una mayor penetración hacia la corona.

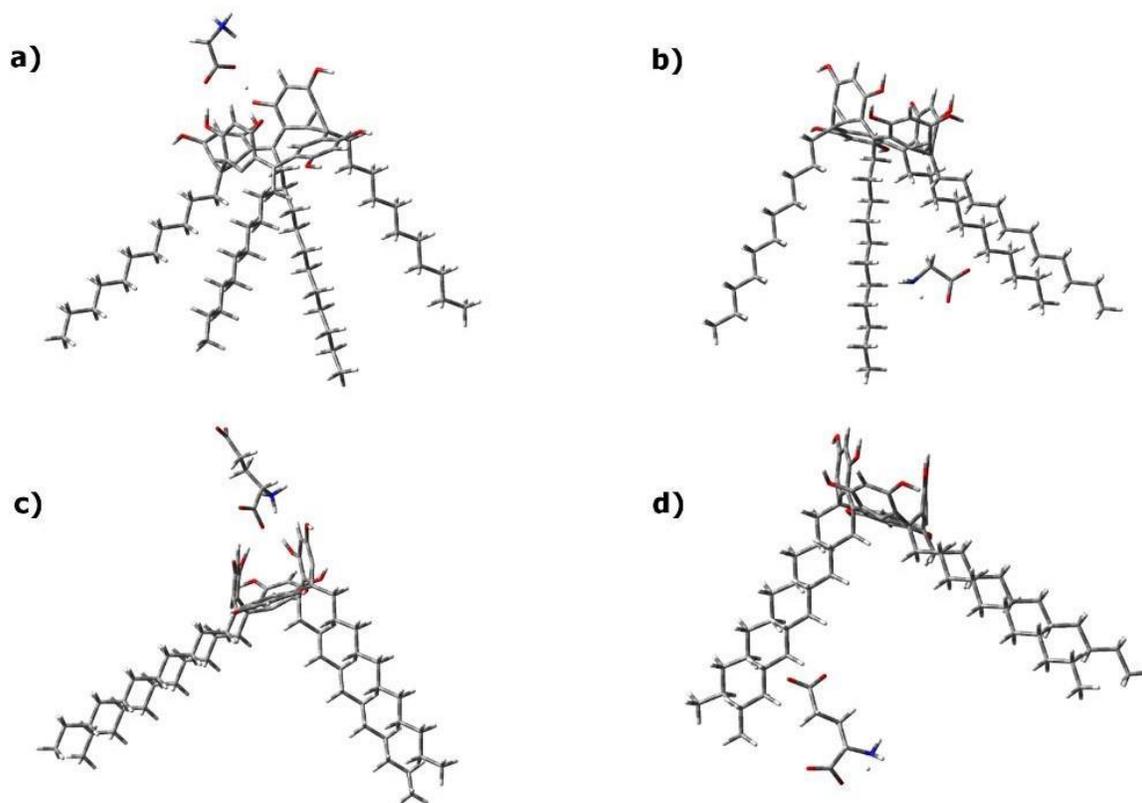


Figura 62. Interacción del dodecanal con los aminoácidos glicina (a y b) y L-glutamato (c y d), en las posiciones de la corona (a y c) y las cadenas (b y d).

Por otro lado, en el caso del L-glutamato, se observa una interacción fuerte entre los anillos de la corona y el grupo carboxilo, figura 62c, haciendo que la cadena R apunte en dirección contraria al resorcinareno. Lo anterior, debido al mayor tamaño y su falta de capacidad de acomodo en esta posición. Por otro lado, en la figura 62d, se observa que la interacción del aminoácido en la zona de las cadenas es mediante su grupo carboxilo de la cadena. El aminoácido, al tener mayor tamaño, se queda en la zona inferior de la molécula, y propicia una mayor separación entre las cadenas en comparación con la glicina.

En la Figuras 63a y 63b, se muestra la geometría optimizada de la interacción entre el dodecanal y la lisina, por la zona de la corona y las cadenas hidrocarbonadas, respectivamente. En el primer caso, la cabeza adopta una configuración tipo silla. Dada la longitud de la lisina, en este caso la interacción de mínima energía se da a través del grupo α -amino con los grupos fenilos de la

corona. Esto ocasiona que las cadenas se abran ampliamente, aunque no interaccionan entre sí. En el caso de la parte inferior, la lisina entra en el espacio de las cadenas a una distancia pequeña de la corona, lo que ocasiona que las cadenas cercanas se abran en gran medida debido a la interacción con el grupo R. Por otro lado, la serina al ser de menor tamaño se acomoda casi íntegramente en la parte superior de la corona, dando lugar a una configuración tipo “bote” (Figura 63c). Finalmente, la interacción de la serina con las cadenas le permite colocarse en medio de todas ellas, aunque se mantiene casi en el extremo inferior en posición vertical.

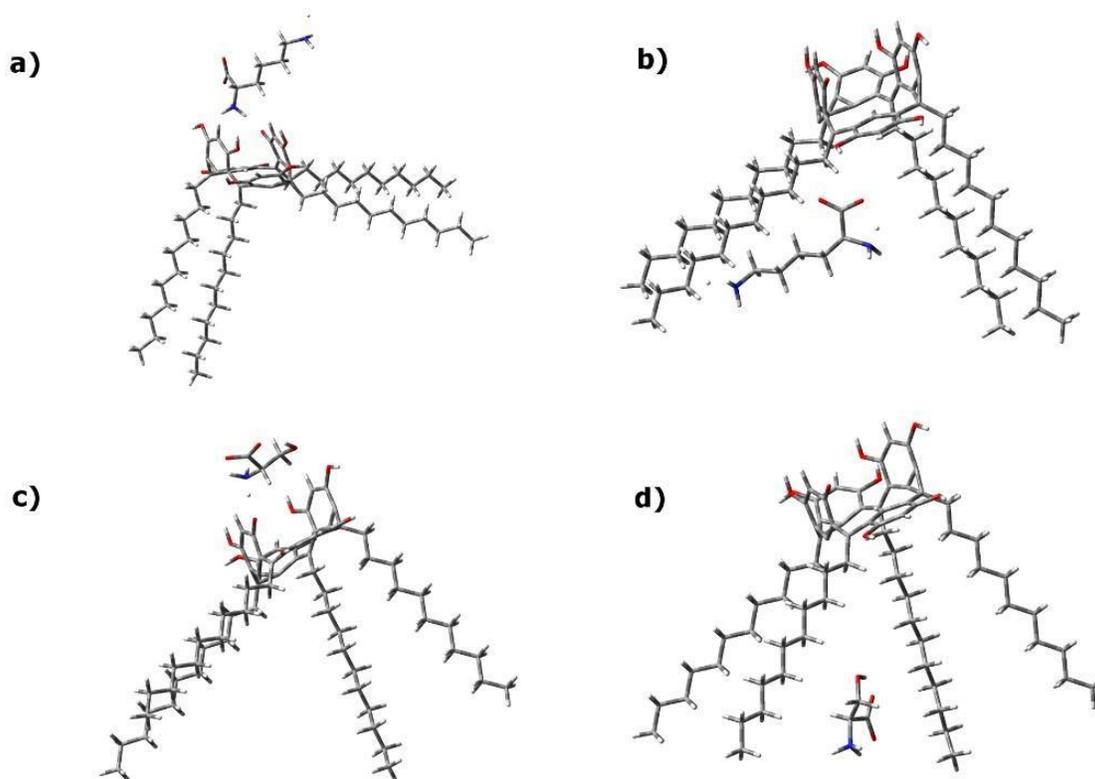


Figura 63. Interacción del dodecanal con los aminoácidos lisina (a y b) y serina (c y d), en las posiciones de la corona (a y c) y las cadenas (b y d).

Tabla 24. Se muestran las energías de enlace obtenidas para cada una de las configuraciones mostradas en las figuras 62 y 63.

Película de dodecanal con el aminoácido:	Energía de enlace kJ/mol
Glicina por la corona	-114.53
Glicina por las cadenas	-10.58
L-glutamato por la corona	-281.85
L-glutamato por las cadenas	-201.75
L-lisina por la corona	-71.02
L-lisina por las cadenas	-71.02
L-serina por la corona	-66.85
L-serina por las cadenas	-7.86

De los valores mostrados en la tabla 24, se puede observar que las interacciones de todos los aminoácidos en la región de la corona son más fuertes, dando lugar a enlaces de tipo químico. Por el contrario, todos los valores de la interacción entre los aminoácidos y las cadenas dan energías de enlace pequeñas, que sugieren interacciones débiles de tipo físico. Cabe resaltar como dato interesante, que la energía de enlace de la lisina tanto por la parte superior como la inferior da el mismo valor. Finalmente, otro aspecto a resaltar es que, en la región de la corona, la mayor interacción se da para el glutamato, seguido de la glicina, la lisina, y finalmente, la serina, en ese orden.

CONCLUSIONES.

- Se logró formar y caracterizar películas de un resorcinareno de nueva síntesis para ser empleadas como elementos de detección de Glicina (Gly), L-glutamato (Glu), L-lisina (Lys) y L-serina (Ser).
- La técnica de evaporación térmica en vacío comprobó ser práctica y eficaz, proporcionando películas muy delgadas con las mismas características, y con una morfología adecuada para su utilización en los estudios realizados en el presente proyecto.
- Dadas las diferentes características fisicoquímicas presentadas por los aminoácidos, se pudieron observar sus diferentes comportamientos en los diferentes experimentos, debido a las interacciones con el dodecanal, presumiblemente con la zona de la corona del resorcinareno.
- Los resultados obtenidos por la microscopía óptica, como un primer acercamiento a los cambios obtenidos por la exposición de las películas a soluciones de aminoácidos; resultaron muy útiles para comprender la tendencia de la glicina y la L-serina a formar agregados adsorbidos en la superficie.
- La morfología macroscópica, antes y después de la exposición a los aminoácidos mediante SEM, fue relevante, pues demostró que los aminoácidos se adsorben de diferentes maneras en la película de dodecanal. La glicina y la L-serina fueron los aminoácidos que provocan los cambios más evidentes al presentar agregados bien definidos por toda la película a diferentes aumentos. Sin embargo, también fue posible demostrar que los aminoácidos restantes muestran una tendencia a formar una o varias monocapas de adsorción muy finas sobre toda la superficie del dodecanal.
- Los cambios observados a diferentes aumentos en las imágenes de SEM corresponden con los observados en las imágenes de AFM. Debido a las características de la técnica, las zonas medidas no mostraron agregados, pero fue posible ver a mayor detalle las características de la película. Además, se pudo observar un aumento en las alturas y las rugosidades de la película, indicativo de la deposición de las moléculas de aminoácidos en la superficie.

- Después de exponer las películas de dodecanal a los diferentes aminoácidos se comparó el espectro ultravioleta-visible, en donde se observó la tendencia de los aminoácidos a generar un ensanchamiento y un corrimiento hacia el rojo en el pico de los 471 nm debido a las interacciones entre los aminoácidos y el dodecanal. Lo anterior, da lugar a una disminución que la energía del orbital π^* haciendo que la energía necesaria para excitar al electrón sea menor, lo que ocasiona un corrimiento hacia longitudes de onda más grandes. Este efecto demuestra la presencia de los aminoácidos adsorbidos en las superficies.
- Los resultados de la espectroscopia IR muestran la presencia de picos atribuibles a grupos funcionales diferentes a los que tiene el dodecanal, y que corresponden a los grupos característicos de los aminoácidos utilizados. Lo anterior, demuestra que el fenómeno de adsorción entre los aminoácidos y el dodecanal se llevó a cabo.
- Los resultados mostrados en el análisis cuantitativo del purpura de Ruhemann muestran que la L-serina y la glicina son los aminoácidos más adsorbidos, pues sus resultados arrojan una considerable diferencia en comparación con los otros dos aminoácidos analizados. Se llegó a la conclusión, de que estos resultados podrían demostrar que los aminoácidos L-serina y glicina tienden a formar agregados que representan una cantidad mayor de adsorción en comparación a la L-lisina y L-glutamato que no tienden a formar agregados.
- Los aminoácidos glicina y L-serina son los más adsorbidos debido a su tendencia a formar agregados o capas gruesas, de acuerdo con los estudios de QCM, según se observa en las curvas dinámicas de adsorción. Los aminoácidos cargados (L-lisina y L-glutamato) presentan una gran afinidad por el dodecanal, pero no un gran flujo de adsorción por lo que su adsorción se ve principalmente formada por monocapas de adsorción con un tiempo de formación relativamente lento. En cambio, los aminoácidos glicina y L-serina, presentan un flujo de adsorción considerablemente mayor, lo que permite en primera instancia formar un crecimiento de adsorción por monocapas, y posteriormente, un crecimiento por islas que permita la formación de agregados.
- Los resultados de QCM muestran que el proceso de adsorción de todos los aminoácidos no es lineal en el tiempo, y que presenta diferentes procesos con diferentes comportamientos demostrados por la presencia de distintas pendientes o velocidades de adsorción. Un aspecto importante para considerar es el tamaño del aminoácido. De los resultados mostrados, la glicina y serina presentan los tamaños más pequeños. Posiblemente esta cualidad, les permite tener una mejor movilidad hacia la superficie, y quizá, tener algún tipo de absorción entre las cadenas o cabezas del resorcinareno, aumentando así la masa total de absorción de las películas.
- Finalmente, los resultados obtenidos usando DFT, muestran que la interacción más fuerte entre el resorcinareno y los aminoácidos se da por la zona de la corona, como era de esperarse. En varios casos la interacción da lugar a puentes de hidrógeno, mientras que, en la zona de las cadenas, las interacciones son principalmente de tipo físico.

APÉNDICE.

Valor de pKa de los aminoácidos.

Los aminoácidos presentan características fisicoquímicas como su polaridad que está en función del pH del medio, en el presente proyecto los experimentos fueron realizados a un valor de pH de 7.0, aproximadamente. Es por lo que se presentan los valores de pKa en la tabla 25:

Tabla 25. Valores de pKa de los aminoácidos utilizados en el proyecto y la especie predominante en los experimentos (Nelson & Cox., 2008).

Aminoácido	pKa asociado al grupo carboxilo	pKa 2 asociado al grupo amino	pKa 3 asociado al grupo R	Especie predominante a pH 7.0
Glicina	2.34	9.60	---	
L-glutamato	2.19	9.67	4.25	
L-lisina	2.18	8.95	10.53	
L-serina	2.21	9.15	---	

Modelos de formación de capas de adsorción.

Existen tres modelos principales de formación de capas de adsorción que dependen de las interacciones que se tiene entre las moléculas y el sustrato. Estos modelos son (Quintero Hernan, 2011)

- **Modelo de Volmer-Weber (crecimiento en 3D)**

Este modelo se basa en que los átomos al llegar a la superficie del sustrato tienden a difundirse sobre la superficie y unirse para formar pequeños núcleos; el crecimiento inicia a partir de estos núcleos en forma de aglomerados o islas que se unen para acabar formando una capa continua. Una de las características principales en este modelo es que las moléculas tienen una mayor fuerza de enlace entre ellas que con la película o sustrato.

- **Modelo de Frank-Van der Merwe (crecimiento capa por capa en 2D)**

Este modelo se fundamenta en que los átomos quedan adsorbidos en las posiciones de llegada; si la densidad de puntos de adsorción es uniforme, los núcleos se extienden sobre toda la superficie en forma homogénea, dando como resultado la formación de una capa, y el crecimiento sería de capa en capa.

Esta tendencia es debido a que los átomos de las moléculas a adsorberse presentan una mayor fuerza de enlace hacia el sustrato (película) que entre sí. Aunque generalmente se caracteriza por una velocidad de adsorción rápida, también pueden existir casos en los que exista una adsorción lenta, pero se forman las películas de adsorción por la gran fuerza de enlace entre las moléculas y el sustrato.

- **Modelo de Stranski-Krastanov (crecimiento mixto)**

Este modelo representa un caso intermedio, en el cual primero se forma una o varias capas y después se continúa en forma de islas sobre las primeras capas.

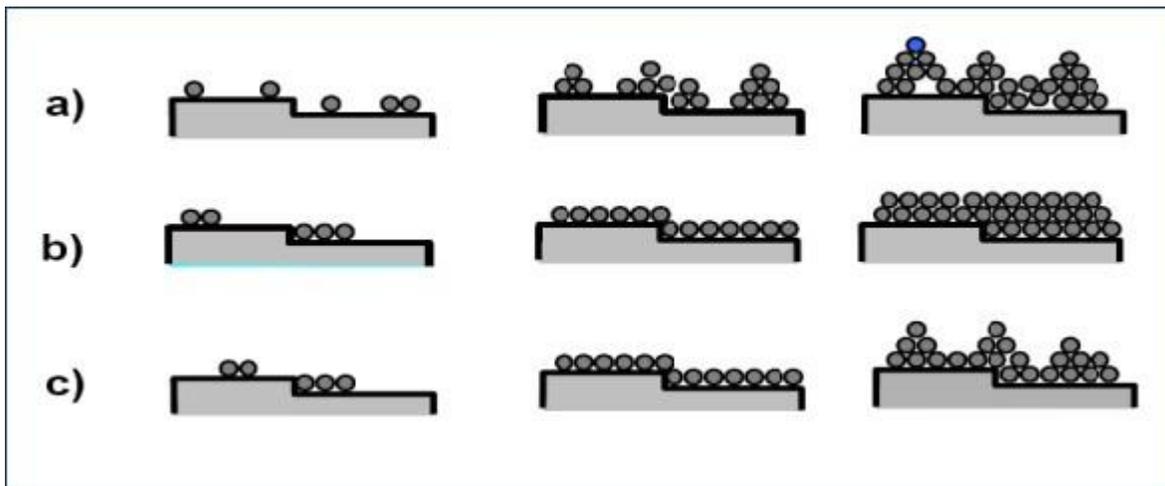


Figura 64. Representación gráfica de los diferentes modelos de formación de películas de adsorción. Donde a) corresponde al modelo de Volmer-Weber, b) representa al modelo de Frank-Van der Merwe y c) muestra los procesos de formación en el modelo de Stranski-Krastanov.

REFERENCIAS.

- Adachi, H., & Wasa, K. (2012). Thin Films and Nanomaterials. *Handbook of Sputter Deposition Technology: Fundamentals and Applications for Functional Thin Films, Nano-Materials and MEMS: Second Edition*, (Dlc), 3–39. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-3483-6.00001-2>
- Aliu, E., Kanungo, S., & Arnold, G. L. (2018). Amino acid disorders. *Annals of Translational Medicine*, 6(24), 471–471. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.12.12>
- Báez, E. G. (2019). Teoría del funcional de la densidad-DFT. Retrieved May 1, 2020, from NUSGREM - Asociación Nacional de Estudiantes de Física website: <https://nusgrem.es/teoria-del-funcional-de-la-densidad-dft/>
- Behboodi-Sadabad, F., Trouillet, V., Welle, A., Messersmith, P. B., & Levkin, P. A. (2018). Surface Functionalization and Patterning by Multifunctional Resorcinarenes. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(45), 39268–39278. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b14771>
- Belhamdi, B., Merzougui, Z., Trari, M., & Addoun, A. (2016). A kinetic, equilibrium and thermodynamic study of L-phenylalanine adsorption using activated carbon based on agricultural waste (date stones). *Journal of Applied Research and Technology*, 14(5), 354–366. <https://doi.org/10.1016/j.jart.2016.08.004>
- Bernhardt, P. V., & Moore, E. G. (2003). Functionalized macrocyclic compounds: Potential sensors of small molecules and ions. *Australian Journal of Chemistry*, 56(4), 239–258. <https://doi.org/10.1071/CH02225>
- Eddaif, L., Trif, L., Telegdi, J., Egyed, O., & Shaban, A. (2019). Calix[4]resorcinarene macrocycles: Synthesis, thermal behavior and crystalline characterization. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 137(2), 529–541. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7978-0>
- Evans, E. M., & Wood, E. J. (1986). Metabolic pathways. *Biochemical Education*, 14(2), 88–88. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(86\)90076-2](https://doi.org/10.1016/0307-4412(86)90076-2)
- Expanding the Vision of Sensor Materials. (1995). In *The National Academies Press*. <https://doi.org/10.17226/4782>
- Gacía Solé, J., Bausá Lopez, L., & Jaque Garcia, D. (1996). *An introduction to the optical spectroscopy of inorganic solids* (Vol. 44). <https://doi.org/10.1109/8.496250>
- Gruber, T. (2018). Synthetic Receptors for the Recognition and Discrimination of Post-Translationally Methylated Lysines. *ChemBioChem*, 19(22), 2324–2340. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800398>
- Hassen, W. M., Martelet, C., Davis, F., Higson, S. P. J., Abdelghani, A., Helali, S., & Jaffrezic-Renault, N. (2007). Calix[4]arene based molecules for amino-acid detection. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 124(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.11.044>
- Haugstad, G. (2012). *Atomic Force Microscopy* (Vol. 17). New Jersey: John Wiley & Sons.
- Hilton, J. F., Christensen, K. E., Watkins, D., Raby, B. A., Renaud, Y., De la Luna, S., ... Rosenblatt, D. S. (2003). The molecular basis of glutamate formiminotransferase deficiency. *Human Mutation*, 22(1), 67–73. <https://doi.org/10.1002/humu.10236>

- Hoskins, C., & Curtis, A. D. (2015). Simple Calix[n]arenes and Calix[4]resorcinarenes as Drug Solubilizing Agents. *Journal of Nanomedicine Research J Nanomed Res*, 2(3), 28. <https://doi.org/10.15406/jnmr.2015.02.00028>
- Houten, S. M., Te Brinke, H., Denis, S., Ruitter, J. P. N., Knecht, A. C., De Klerk, J. B. C., ... Duran, M. (2013). Genetic basis of hyperlysinemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-57>
- Jain, V. K., & Kanaiya, P. H. (2011). Chemistry of calix[4]resorcinarenes. *Russian Chemical Reviews*, 80(1), 75–102. <https://doi.org/10.1070/RC2011v080n01ABEH004127>
- Kolthoff, I. M. (1979). Application of Macrocyclic Compounds in Chemical Analysis. *Analytical Chemistry*, 51(5), 1–22. <https://doi.org/10.1021/ac50041a001>
- Kondyurin, A., Rautenberg, C., Steiner, G., Habicher, W. D., & Salzer, R. (2001). Vibrational spectra of calix[4]resorcinarene isomers. *Journal of Molecular Structure*, 563–564, 503–511. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(01\)00455-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(01)00455-0)
- Li, N., Harrison, R. G., & Lamb, J. D. (2014). Application of resorcinarene derivatives in chemical separations. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 78(1–4), 39–60. <https://doi.org/10.1007/s10847-013-0336-8>
- Mecea, V. M. (2006). Is quartz crystal microbalance really a mass sensor? *Sensors and Actuators, A: Physical*, 128(2), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2006.01.023>
- Moreira, W. C., Dutton, P. J., & Aroca, R. (1994). Langmuir-Blodgett Monolayers and Vibrational Spectra of Calix[4]Resorcinarene. *Langmuir*, 10(11), 4148–4152. <https://doi.org/10.1021/la00023a039>
- Mutihac, L., Lee, J. H., Kim, J. S., & Vicens, J. (2011). Recognition of amino acids by functionalized calixarenes. *Chemical Society Reviews*, 40(5), 2593–2643. <https://doi.org/10.1039/c0cs00015a>
- Naik Kardile, A. (1975). *Fundamentos del microscopio electrónico y su aplicación en la investigación textil*.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger Principles of biochemistry* (5ta ed.). New York: W.H. Freeman.
- Özbek, Z., Çapan, R., Göka, H., Sceden, S., Ince, F. G., Özel, M. E., & Davis, F. (2011). Optical parameters of calix[4]arene films and their response to volatile organic vapors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 158(1), 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.06.011>
- Panahi, T. (2016). Glutamic Acid Resorcinarene-based Molecules and Their Application in Developing New Stationary Phases in Ion Chromatography. Retrieved from <https://scholarsarchive.byu.edu/etd/6436>
- Quartz Crystal Microbalance Digital Controller. (2010). *Stanford Research Systems*, Vol. 3.
- Quintero Hernan, J. (2011). *Sintesis de películas delgadas de AuNx por medio del sistema de deposición física en fase vapor asistida por plasma(PAPVD)*. Universidad Nacional de Colombia.
- Robinson, J., Skelly Frame, E., & Frame, G. (2005). *Undergraduate Instrumental Analysis* (sixth).

New York: Marcel Dekker.

- Roca, P., Oliver, J., Rodríguez, A., & ... (2003). Bioquímica, Técnicas y Metodos. In *Book of Chemical Information*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Seyedhosseini, E., Kholkin, A. L., Vasileva, D., Nuraeva, A., Vasilev, S., Zelenovskiy, P., & Shur, V. Y. (2015). Patterning and nanoscale characterization of ferroelectric amino acid beta-glycine. *2015 Joint IEEE International Symposium on the Applications of Ferroelectric, International Symposium on Integrated Functionalities and Piezoelectric Force Microscopy Workshop, ISAF/ISIF/PFM 2015*, 207–210. <https://doi.org/10.1109/ISAF.2015.7172707>
- Stone, M. M., Franz, A. H., & Lebrilla, C. B. (2002). Complexes Formed by MALDI-MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, 0305(02), 964–974.
- Sugden, M. W., Richardson, T. H., Davis, F., Higson, S. P. J., & Faul, C. F. J. (2008). Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Langmuir and LB properties of two calix [4] resorcinarenes : Interactions with various analytes. *Colloids and Surfaces*, 321(Mayo), 43–46. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.02.048>
- Timmerman, P., Verboom, W., & Reinhoudt, D. N. (1996). Resorcinarenes. *Tetrahedron*, 52(8), 2663–2704. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)00984-1](https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)00984-1)
- West, A. R. (2014). *Solid state chemistry and its applications* (seguna edi, Vol. 41). <https://doi.org/10.1107/s0108768185002476>
- Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L., & Joy, D. (2007). Fundamentals of scanning electron microscopy. *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*, 1–40. https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0_1
- Zhou, X. C., Ng, S. C., Chan, H. S. O., & Li, S. F. Y. (1997). Detection of organic amines in liquid with chemically coated quartz crystal microbalance devices. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 42(2), 137–144. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(97\)00209-8](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(97)00209-8)