



**BUAP**



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Química Analítica

**TESIS PROFESIONAL**

*“Inmovilización de aminoácidos utilizando un polímero  
funcionalizado con un complejo metálico”*

Tesis presentada para obtener el título de:  
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

PRESENTA

Marlen Romero Zempoalteca

DIRECTOR DE TESIS

Dr. José Luis Garate Morales

Puebla, Pue.

JULIO, 2016

"Lo que la mente del hombre puede concebir y crear,  
es lo que la mente del hombre puede lograr."

Napoleón Hill

1

## *Dedicado a...*

*Mis padres.*

*Porque con su esfuerzo, amor, confianza, dedicación, consejos  
y muchos sacrificios, me han permitido culminar mi carrera universitaria.  
Espero que su satisfacción sea tan grande como la mía.*

# AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección del Dr. José Luis Garate Morales.

Agradezco sinceramente al Dr. José Luis Garate Morales por permitirme formar parte de su equipo de trabajo. Al aceptar dirigir mi tesis de licenciatura me dio la oportunidad de abandonar mi zona de confort y tomar el riesgo que implica la Química Inorgánica. Agradezco la confianza otorgada, así como el tiempo, apoyo, consejos y conocimientos compartidos.

No hay palabras que describan mi profundo agradecimiento a mi asesor de tesis, el M. C. Esteban Sánchez Muñoz, que me enseñó a cuestionarme antes de hacer las cosas, que me llamó la atención cuando bajaba la guardia, y que además de compartir conmigo sus conocimientos, me brindó su amistad.

Al jurado, la Dra. Rocío Aguilar Sánchez, la Dra. María del Pilar Trujillo García y la MSP. María de la Cruz Meneses Sánchez, por el tiempo invertido en este trabajo y por cada crítica constructiva.

A Lourdes Paola Flores Martínez, tesista de licenciatura en el Centro de Química (ICUAP) bajo la dirección de la Dra. Lourdes Millán Pérez Peña, por facilitarme el aminoácido requerido en este proyecto.

Al M. C. Vladimir Carranza Téllez, por las facilidades otorgadas para los estudios de masas.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio, Beto, Ceci, Carmen, Silvia y Karen, por sus aportaciones a este trabajo y a mi persona, hicieron amena mi estancia en este lugar.

A mis amigos de la licenciatura, porque iniciamos juntos y terminamos juntos. Valoro mucho cada momento bueno y malo que tuve la fortuna de compartir con ustedes, siempre estarán presentes en mis mejores y más felices recuerdos.

# ÍNDICE

RESUMEN 11

CAPÍTULO 1 12

1.1 Antecedentes 13

1.1.1 Proteínas 13

1.1.1.1 Niveles estructurales 14

1.1.2 Aminoácidos 14

1.1.2.1 Clasificación según su grupo R 15

1.1.2.2 Química de los aminoácidos 17

1.1.2.3 Aminoácidos fluorescentes 18

1.1.3 Compuestos de coordinación 19

1.1.3.1 Complejos de coordinación 20

1.1.3.2 Metaloproteínas 20

1.1.4 Iminas 21

1.1.4.1 Síntesis de iminas 22

1.1.5 Métodos de inmovilización 23

CAPÍTULO 2 24

2.1 Hipótesis 25

2.2 Justificación 25

2.3 Objetivos 26

2.3.1 Objetivo general 26

2.3.2 Objetivos específicos 26

CAPÍTULO 3 27

3.1 Desarrollo experimental 28

3.1.1 Reactivos y disolventes 28

3.1.2 Equipos 28

3.1.3 Metodología de síntesis 29

3.1.3.1 Tratamiento previo del material 29

3.1.3.2 Síntesis, purificación y caracterización del ligante 2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)amino)fenol [MRZ] 29

3.1.3.3 Síntesis, purificación y caracterización de los compuestos de coordinación 30

3.1.3.3.1	(2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimi-no)metil)bencilidina)amino)fenol)Cu(II)	[MRZ-Cu (II)]	30
3.1.3.3.2	(2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimi-no)metil)bencilidina)amino)fenol)Fe(III)	[MRZ- Fe (III)]	31
3.1.4	Metodología de inmovilización		31
3.1.4.1	Preparación de soluciones		31
3.1.4.2	Inmovilización del aminoácido		31
3.1.5	Pruebas de fluorescencia		32
	<b>3.2 Técnicas espectroscópicas</b>		<b>32</b>
3.2.1	Espectroscopia de UV-Vis		32
3.2.2	Espectroscopia infrarroja		33
3.2.3	Espectrometría de masas		33
3.2.4	Espectroscopia de fluorescencia		34

## CAPÍTULO 4 35

	<b>4.1 Resultados y discusión</b>		<b>36</b>
4.1.1	Ligante MRZ		36
4.1.1.1	Mecanismo de reacción		36
4.1.1.2	Espectroscopia de UV-Vis		38
4.1.1.3	Espectroscopia infrarroja (ATR-IR)		40
4.1.1.4	Espectrometría de masas		41
4.1.2	Complejo MRZ-Cu (II)		42
4.1.2.1	Espectroscopia de UV-vis		42
4.1.2.2	Espectroscopia infrarroja (FT-IR)		43
4.1.2.3	Espectrometría de masas		44
4.1.2.4	Espectroscopia de fluorescencia		45
4.1.3	Complejo MRZ-Fe (III)		47
4.1.3.1	Espectroscopia de UV-vis		47
4.1.3.2	Espectroscopia infrarroja (FT-IR)		48
4.1.3.3	Espectrometría de masas		49
4.1.3.4	Espectroscopia de fluorescencia		50

## 4.2 Conclusiones 52

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 53

## APÉNDICE 55

## Índice de figuras

- Figura 0.1      Ligante 2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)amino)-  
fenol [MRZ]    11
- 
- Figura 1.1      Niveles estructurales de la hemoglobina    14  
Figura 1.2      Fórmula general de un aminoácido    15  
Figura 1.3      Aminoácidos neutros alifáticos apolares    15  
Figura 1.4      Aminoácidos aromáticos    16  
Figura 1.5      Comparación de los espectros de absorción de la luz de los aminoáci-  
dos aromáticos a pH 6.0    16  
Figura 1.6      Aminoácidos polares sin carga    16  
Figura 1.7      A) Aminoácidos con carga negativa, B) Aminoácidos con carga positiva    17  
Figura 1.8      Fórmula general de un aminoácido ionizado    17  
Figura 1.9      Complejo de esfera interna    20  
Figura 1.10      Hemoglobina, la metaloproteína más conocida    20  
Figura 1.11      Estructura general de una imina    21  
Figura 1.12      Formación de iminas    22
- 
- Figura 3.1      Transiciones electrónicas entre orbitales    32  
Figura 3.2      Modos de vibración de las moléculas    33  
Figura 3.3      Procesos físicos que pueden ocurrir cuando una molécula absorbe un  
fotón    34
- 
- Figura 4.1      Mecanismo de reacción del ligante 2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimi-  
no)metil)bencilidina)amino)fenol [MRZ]    36-37  
Figura 4.2      Espectro de absorción de UV-Vis del ligante 2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidrox-  
ifenilimino)metil)bencilidina)amino)fenol [MRZ], CHCl<sub>3</sub>    38  
Figura 4.3      Espectro comparativo de absorción de UV-Vis entre el ligante 2-((E)-((E)-  
3-((E)-(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)amino)fenol [MRZ] y las mate-  
rias primas: 2-aminofenol e isoftalaldehído    39  
Figura 4.4      Espectro de absorción de infrarrojo (ATR-IR) del ligante 2-((E)-((E)-3-((E)-  
(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)amino)fenol [MRZ]    40  
Figura 4.5      Patrón de fragmentación propuesto para el ligante 2-((E)-((E)-3-((E)-(2-

	hidroxifenilimino)metil)bencilidina)amino)fenol [MRZ], FAB <sup>+</sup>	41
Figura 4.6	Espectro de absorción de UV-Vis del complejo MRZ-Cu (II), EtOH	42
Figura 4.7	Espectro de absorción de infrarrojo (FT-IR) del complejo MRZ-Cu (II)	43
Figura 4.8	Patrón de fragmentación propuesto para el complejo MRZ-Cu (II), FAB <sup>+</sup>	44
Figura 4.9	Titulación espectrofotométrica del complejo MRZ-Cu (II) (2.6x10 <sup>-4</sup> M) con una solución de triptófano (1x10 <sup>-3</sup> M), EtOH	45
Figura 4.10	Espectro de emisión de fluorescencia del triptófano (solución 1x10 <sup>-3</sup> M) al titular con una solución del complejo MRZ-Cu (II) (2.6x10 <sup>-4</sup> M), EtOH	46
Figura 4.11	Espectro de absorción de UV-Vis del complejo MRZ-Fe (III), EtOH	47
Figura 4.12	Espectro de absorción de infrarrojo (FT-IR) del complejo MRZ-Fe (III)	48
Figura 4.13	Patrón de fragmentación propuesto para el complejo MRZ-Fe (III), FAB <sup>+</sup>	49
Figura 4.14	Titulación espectrofotométrica del complejo MRZ-Fe (III) (1x10 <sup>-4</sup> M) con una solución de triptófano (1x10 <sup>-3</sup> M), EtOH	50
Figura 4.15	Espectro de emisión de fluorescencia del triptófano (solución 1x10 <sup>-3</sup> M) al titular con una solución del complejo MRZ-Fe (III) (1x10 <sup>-4</sup> M), EtOH	51

---

Figura 1	Espectro de UV-Vis de 2-aminofenol, EtOH	56
Figura 2	Espectro de UV-Vis de isoftalaldehído, EtOH	56
Figura 3	Espectro de UV-Vis de MRZ-Cu (II), EtOH	57
Figura 4	Espectro de UV-Vis de MRZ-Fe (III), EtOH	57
Figura 5	Espectro de masas del ligante 2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimino)-metil)bencilidina)amino)fenol [MRZ], FAB <sup>+</sup>	58
Figura 6	Espectro de masas de MRZ-Cu (II), FAB <sup>+</sup>	58
Figura 7	Espectro de masas de MRZ-Fe (III), FAB <sup>+</sup>	59
Figura 8	Espectro de UV-Vis de triptófano, EtOH	59
Figura 9	Titulación espectrofotométrica de MRZ-Cu (II) (2.6x10 <sup>-4</sup> M) con una solución de triptófano (1x10 <sup>-3</sup> M), EtOH	60
Figura 10	Titulación espectrofotométrica de MRZ-Fe (III) (1x10 <sup>-4</sup> M) con una solución de triptófano (1x10 <sup>-3</sup> M), EtOH	60

## Índice de tablas

Tabla 1.1	Absorción UV-Vis, emisión de fluorescencia y rendimiento cuántico de los aminoácidos aromáticos	18
-----------	---	----

---

Tabla 4.1	Transiciones electrónicas del ligante 2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)amino)fenol [MRZ]	38
Tabla 4.2	Vibraciones moleculares del ligante 2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)amino)fenol [MRZ]	40
Tabla 4.3	Espectro de masas del ligante 2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)amino)fenol [MRZ]	41
Tabla 4.4	Vibraciones moleculares del complejo MRZ-Cu (II)	43
Tabla 4.5	Espectro de masas del complejo MRZ-Cu (II)	44
Tabla 4.6	Vibraciones moleculares del complejo MRZ-Fe (III)	48
Tabla 4.7	Espectro de masas del complejo MRZ-Fe (III)	49

## Glosario

aa	Aminoácido
Abs	Absorbancia
Ar	Aromático
ATR-IR	<i>Attenuated Total Reflectance</i> (Reflexión total atenuada)
cm	Centímetro
EtOH	Etanol
FAB <sup>+</sup>	<i>Fast Atom Bombardment</i> (Bombardeo rápido de átomos)
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
g	Gramo
M	Concentración molar
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mmol	Milimol
MRZ	2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)amino)fenol
MS	Espectrometría de masas
m/z	Relación masa/carga
nm	Nanómetros

OM	Orbital molecular
Pa	Pascal (unidad de presión)
p. f.	Punto de fusión
Phe	Fenilalanina
RET	Transferencia de energía por resonancia
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
UV-Vis	Región Ultravioleta-Visible
°C	Grados Celsius
μL	Microlitro
λ	Longitud de onda (nm)
λ <sub>ex</sub>	Longitud de onda de excitación (nm)
λ <sub>em</sub>	Longitud de onda de emisión (nm)
$\tilde{\nu}$	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )
ε	Coefficiente de extinción molar (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )

## RESUMEN

Este trabajo describe el proceso de síntesis y purificación del ligante 2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)amino)fenol [MRZ] (Figura 0.1), así como las técnicas espectroscópicas y espectrométricas utilizadas para su caracterización.

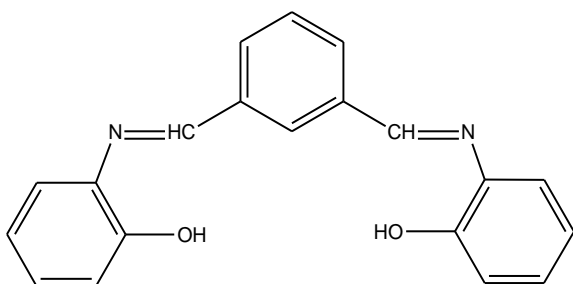


Figura 0.1 Ligante MRZ

Los compuestos de coordinación se obtienen a partir del ligante MRZ y los metales de transición  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , provenientes del cloruro férrico y acetato de cobre, respectivamente. En los capítulos 3 y 4 se explica a detalle la purificación y caracterización de estos compuestos.

Los complejos metálicos se soportan sobre un polímero inerte para luego realizar la inmovilización de triptófano, el sistema se analiza bajo luz ultravioleta.

El trabajo experimental concluye al verificar mediante un espectrofluorímetro que el triptófano conserva su fluorescencia y si ésta aumenta o disminuye después de la interacción con el complejo de coordinación.

Las técnicas espectroscópicas utilizadas para la caracterización de los compuestos antes mencionados son UV-Vis, infrarrojo (FT-IR/ATR-IR), fluorescencia y espectrometría de masas.

# Capítulo 1

# 1.1 ANTECEDENTES

## 1.1.1 Proteínas

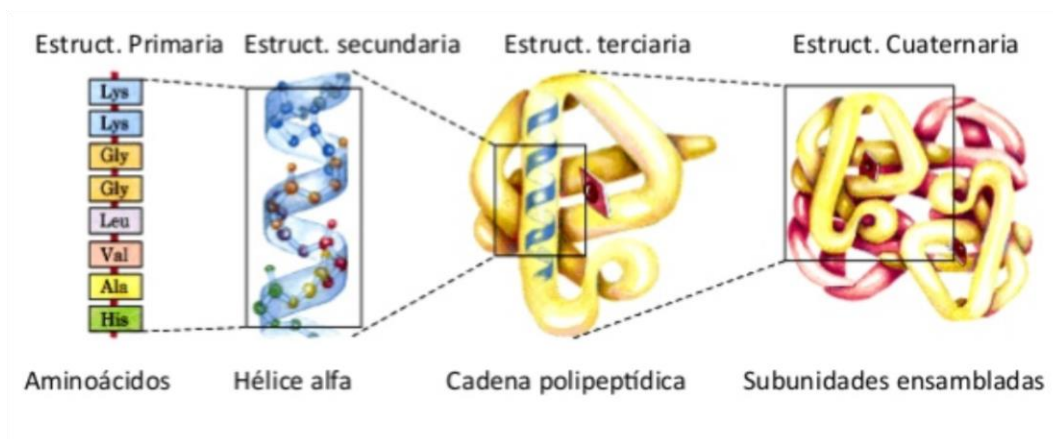
Las proteínas son las macromoléculas más abundantes de las células vivas, muestran una gran diversidad en cuanto a su función biológica, unas transportan y almacenan moléculas pequeñas, otras constituyen gran parte de la organización estructural de las células y los tejidos. Su papel central se manifiesta, de forma evidente, en el hecho de ser los productos finales más importantes de las rutas de información. En cierto sentido son los instrumentos moleculares mediante los que se expresa la información genética.<sup>1</sup>

Todas las proteínas, tanto si provienen de los linajes bacterianos más antiguos como de las formas más complejas de vida, están construidas a partir del mismo conjunto de 20 L- $\alpha$ -aminoácidos, unidos de forma covalente en secuencias lineales características. Debido a que cada uno de estos aminoácidos tiene una cadena lateral propia que determina sus propiedades químicas, se puede considerar a este grupo de 20 moléculas precursoras como el alfabeto en el que está escrito el lenguaje de la estructura proteica.<sup>1</sup> Sin embargo, los 20 aminoácidos comunes no son de ninguna manera los únicos que aparecen en los sistemas biológicos, éstos sufren un número desconcertante de transformaciones químicas que producen otros aminoácidos y compuestos relacionados, como parte de su síntesis celular normal y su degradación. Muchos aminoácidos no se sintetizan para ser residuos de polipéptidos sino para funcionar de manera independiente. Numerosos organismos los utilizan para transportar nitrógeno en forma de grupos amino, también pueden oxidarse como combustibles metabólicos para producir energía y a menudo actúan como mensajeros químicos para la comunicación entre las células. Los residuos de aminoácidos “no estándares” son parte importante de proteínas y péptidos biológicamente activos.<sup>2</sup>

Las proteínas se dividen en dos clases principales basándose en su composición: proteínas *simples* y proteínas *conjugadas*. Las proteínas *simples* son aquellas que por hidrólisis producen solamente aminoácidos, sin ningún otro producto principal, orgánico o inorgánico. Las proteínas *conjugadas* son aquellas que por hidrólisis producen no solamente aminoácidos, sino también otros componentes orgánicos o inorgánicos. La porción no aminoácida de una proteína conjugada se denomina *grupo prostético*.<sup>1</sup>

### 1.1.1.1 Niveles estructurales

Esquemáticamente, puede considerarse que hay cuatro niveles de estructuración de las proteínas. (1) *Estructura primaria*: este término indica que se conoce el número y la secuencia precisa de los aminoácidos unidos por los enlaces peptídicos y la localización de los puentes disulfuro.<sup>3</sup> (2) *Estructura secundaria*: se refiere a las disposiciones regulares y repetitivas en el espacio de los aminoácidos en una cadena polipeptídica. Existen unas pocas clases básicas de estructura secundaria, siendo las más importantes la hélice  $\alpha$  y la conformación  $\beta$ .<sup>1</sup> (3) *Estructura terciaria*: esta denominación alude a la tendencia de una cadena polipeptídica a sufrir dobleces o enrollamientos extensos y producir una estructura compleja y algo rígida. La estabilización de tal estructura se atribuye a diferentes reactividades asociadas a los grupos R de los residuos de aminoácidos.<sup>3</sup> (4) Las proteínas que poseen varias cadenas polipeptídicas, como la hemoglobina (*Figura 1.1*), tienen un nivel adicional de estructura, la *estructura cuaternaria*, que se refiere a la relación espacial de los polipéptidos o subunidades en la proteína global.<sup>1</sup>



*Figura 1.1* Niveles estructurales de la hemoglobina

## 1.1.2 Aminoácidos

Los aminoácidos tienen en común la existencia de un átomo de carbono, denominado *carbono  $\alpha$* , al que se unen los siguientes grupos funcionales: un grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ), un grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) y un átomo de hidrógeno. La cuarta valencia del carbono está unida a un radical o cadena lateral (grupo R), que sirve para diferenciar los 20 aminoácidos que constituyen la mayor parte de las proteínas ya que difieren uno de otro en estructura, tamaño y carga eléctrica (*Figura 1.2*). La única excepción es la prolina, que posee una estructura cíclica y un grupo amino secundario. Cuando el grupo R contiene carbonos adicionales en cadena, se designan  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , etc., empezando a partir del carbono  $\alpha$ .<sup>4</sup>

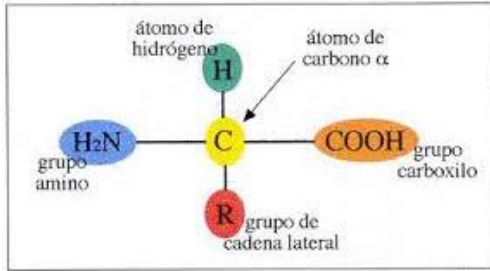


Figura 1.2 Fórmula general de un aminoácido

Debido a que los carbonos  $\alpha$  de todos los aminoácidos estándar (excepto la glicina) están unidos a cuatro grupos sustituyentes diferentes, se denominan *carbonos asimétricos o quirales*. Las moléculas con carbonos quirales pueden existir como *estereoisómeros*, moléculas que sólo se diferencian en la disposición

espacial de sus átomos; cuando estas moléculas son imágenes especulares no superponibles se denominan *enantiómeros*. Las propiedades físicas de los enantiómeros son idénticas, excepto que desvían la luz polarizada plana en direcciones opuestas.

Siguiendo la representación de Fischer, propuesta para los azúcares, aquellos aminoácidos que tienen una configuración relacionada con la del L-gliceraldehído se designan L (de levógiro, proveniente de *levo*, “izquierda”) y los relacionados con el D-gliceraldehído se designan D (de dextrógiro, proveniente de *dextro*, “derecha”).<sup>5</sup> Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen configuración “L”, mientras que la forma “D” se encuentra en antibióticos y en la pared celular de algunas bacterias. Es importante señalar que las letras L y D se refieren a la configuración absoluta con respecto al carbono asimétrico y no a la actividad óptica.<sup>6</sup>

### 1.1.2.1 Clasificación según su grupo R

El tema se puede simplificar agrupando los aminoácidos en clases basadas en las propiedades de sus grupos R, en especial su polaridad o tendencia a interactuar con el agua a pH fisiológico (cerca de 7.0). La polaridad de los grupos R varía enormemente desde totalmente apolar o hidrofóbico (insoluble en agua) a altamente polar o hidrofílico (soluble en agua).<sup>1</sup>

Existen cinco clases principales de aminoácidos: (1) con los grupos R apolares y alifáticos, (2) aromáticos (generalmente apolares), (3) polares sin carga, (4) cargados negativamente y (5) cargados positivamente. Dentro de cada clase existe variación en la polaridad, tamaño y forma de los grupos R.<sup>1</sup>

- *Grupos R apolares alifáticos.*

Las cadenas laterales de *glicina*, *alanina*, *valina*, *leucina*, *isoleucina*, *prolina* y *metionina*, son

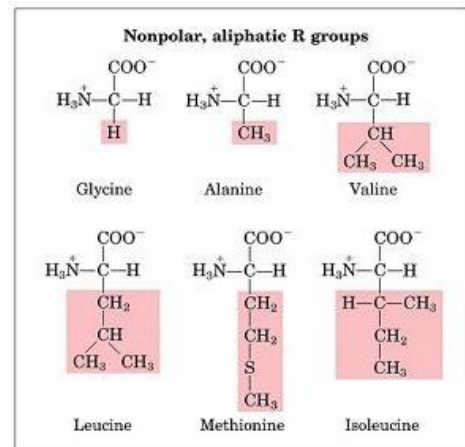


Figura 1.3 Aminoácidos neutros alifáticos apolares

importantes para la promoción de interacciones hidrofóbicas dentro de las estructuras proteicas. Los grupos R hidrocarbonados de esta clase de aminoácidos son apolares e hidrofóbicos (Figura 1.3).<sup>7</sup>

- Grupos R aromáticos.

La fenilalanina, la tirosina y el triptófano, con sus cadenas laterales aromáticas son relativamente apolares (Figura 1.4). Todos ellos pueden participar en interacciones hidrofóbicas, las cuales son especialmente fuertes cuando los grupos aromáticos se apilan (*stacking*) unos sobre otros. El grupo hidroxilo de la tirosina puede formar puentes de hidrógeno y actúa como un grupo funcional importante en la actividad de algunas enzimas. La tirosina y el triptófano son significativamente más polares que la fenilalanina debido al grupo hidroxilo de la tirosina y al nitrógeno del anillo indólico del triptófano. El triptófano y la tirosina, y en menor grado la fenilalanina, por presentar anillos aromáticos en su estructura tienen la

capacidad de absorber luz ultravioleta a determinadas longitudes de onda (alrededor de 280 nm). En la Figura 1.5 se muestran los espectros de absorción de UV-Vis de estos aminoácidos, presentes en cantidades equimolares ( $10^{-3}$  M) en idénticas condiciones (pH 6.0). La absorción de la luz del triptófano es cuatro veces mayor que la de la tirosina.<sup>7</sup>

- Grupos R polares sin carga.

Los grupos R de estos aminoácidos son más solubles en agua, o hidrofílicos, que los de los aminoácidos apolares, debido a que contienen grupos funcionales que forman

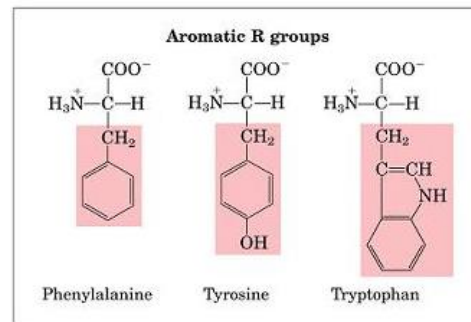


Figura 1.4 Aminoácidos aromáticos

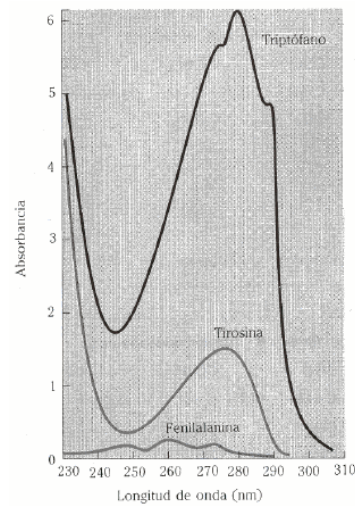


Figura 1.5 Comparación de los espectros de absorción de UV-Vis de los aminoácidos aromáticos

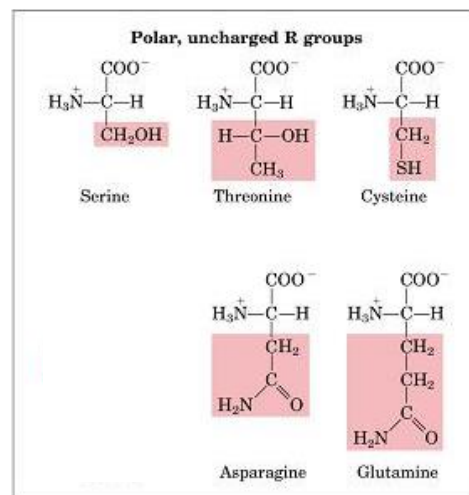


Figura 1.6 Aminoácidos polares sin carga

puentes de hidrógeno con el agua. En esta clase de aminoácidos se incluyen la *serina*, *treonina*, *cisteína*, *asparagina* y *glutamina* (Figura 1.6). La polaridad de la serina y la treonina proviene de sus grupos hidroxilo; la de la asparagina y glutamina de los grupos amida y de la cisteína y metionina de su átomo de azufre.<sup>7</sup>

- *Grupos R cargados positivamente (básicos).*

Los aminoácidos en los que los grupos R tienen una carga neta positiva a pH 7.0 son la *lisina*, que tiene un segundo grupo amino en la posición ε de su cadena alifática; *arginina*, que tiene un grupo guanidino cargado positivamente y la *histidina*, que contiene un grupo imidazol (Figura 1.7-A). La histidina es el único aminoácido estándar que tiene una cadena lateral con un  $pK_a$  próximo a la neutralidad.<sup>7</sup>

- *Grupos R cargados negativamente (ácidos).*

Los dos aminoácidos que tienen grupos R con carga neta negativa a pH 7.0 son *aspartato* y *glutamato* (Figura 1.7-B), cada uno de los cuales tiene un segundo grupo carboxilo. Estos aminoácidos son los compuestos precursores de la asparagina y la glutamina, respectivamente.<sup>7</sup>

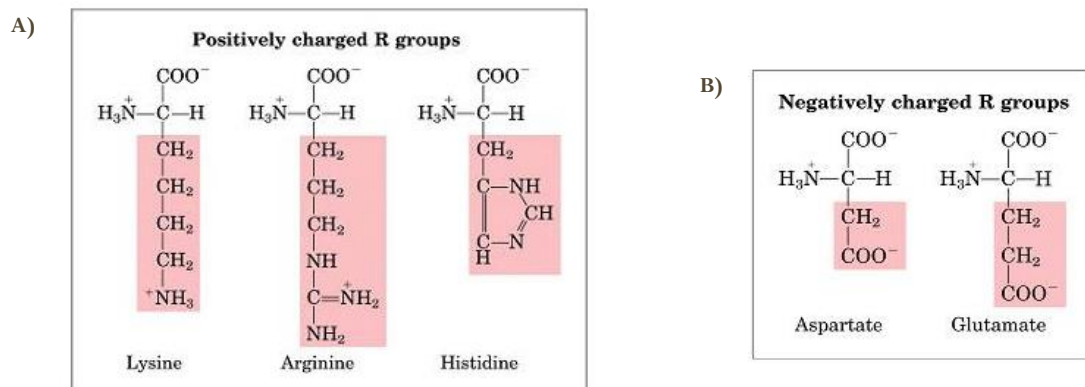


Figura 1.7 A) Aminoácidos con carga positiva. B) Aminoácidos con carga negativa.

### 1.1.2.2 Química de los aminoácidos



Figura 1.8 Fórmula general de un aminoácido ionizado

Los aminoácidos poseen propiedades diferentes a los compuestos orgánicos de bajo peso molecular y semejan más bien sales inorgánicas. En solución acuosa están ionizados y pueden actuar como ácidos o como bases, pero en solventes

orgánicos se comportan como especies poco solubles o insolubles. Los  $\alpha$ -aminoácidos que tienen un solo grupo amino y un solo grupo carboxilo cristalizan a partir de soluciones acuosas neutras en forma de especies totalmente ionizadas denominadas *zwitteriones* (del alemán “iones híbridos”) que tienen una carga positiva y una carga negativa (*Figura 1.8*). Estos iones son eléctricamente neutros por lo que permanecen estacionarios en un campo eléctrico.<sup>6</sup> La red cristalina de los aminoácidos se mantiene unida mediante fuerzas electrostáticas fuertes entre los grupos funcionales cargados positiva y negativamente de moléculas vecinas de forma parecida a la red cristalina iónica del NaCl.<sup>1</sup> Sus puntos de fusión son muy altos (>200°C), comparados con los compuestos orgánicos de bajo peso molecular, debido a la gran cantidad de energía requerida para romper los enlaces iónicos en la red cristalina.<sup>6</sup>

### 1.1.2.3 Aminoácidos fluorescentes

Hay sólo tres aminoácidos fluorescentes aromáticos que absorben luz en la región del ultravioleta cercano ( $\lambda > 240$  nm) y son: fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp). Tienen distinta absorción y emisión de fluorescencia, como se muestra en la *Tabla 1.1*.

**Tabla 1.1** Absorción UV-Vis, emisión de fluorescencia y rendimiento cuántico de los aminoácidos aromáticos

	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	$\Phi_F$
<b>Trp</b>	295	353	0,20
<b>Tyr</b>	275	304	0,14
<b>Phe</b>	260	282	0,02

La fluorescencia de una proteína resulta de la sumatoria de las fluorescencias individuales de los residuos aromáticos que posee, pero generalmente se estudia entre 280-295 nm siguiendo la fluorescencia del triptófano, debido a su mayor rendimiento cuántico y a su vida media más prolongada.<sup>8</sup> El *rendimiento cuántico*, o *eficiencia cuántica*, de la fluorescencia molecular es simplemente el cociente entre el número de moléculas que presentan fluorescencia y el número total de moléculas excitadas (o el cociente de fotones emitidos a fotones absorbidos).<sup>9</sup>

Además, la proximidad de estos tres aminoácidos en la estructura de una proteína permite que ocurra la transferencia de energía por resonancia (RET) entre Phe y Tyr y entre Tyr y Trp, siendo la fluorescencia del Trp la única que no se transfiere. Las proteínas usualmente tienen un número limitado de triptófano y generalmente se encuentra en su sitio activo.<sup>8</sup>

La tirosina es un emisor más débil que el triptófano, pero puede contribuir significativamente a la fluorescencia de una proteína ya que se encuentra en mayor cantidad que los otros residuos aromáticos. Tanto la tirosina como el triptófano tienen una fuerte banda de absorción a 280 nm.

La fenilalanina, con sólo un anillo bencénico y un grupo metileno, es débilmente fluorescente. La sensibilidad experimental (el producto del rendimiento cuántico y absorptividad molar) es especialmente baja para este residuo. Su fluorescencia se observa sólo en ausencia de tirosina y triptófano.<sup>9</sup>

En las proteínas los residuos de Trp se encuentran generalmente formando parte del núcleo hidrofóbico de las mismas y por lo tanto está en regiones donde las moléculas de agua tienen poco acceso, el espectro de emisión de este aminoácido presenta un máximo generalmente en 330 nm. Esto se debe a que la energía emitida es mayor que cuando la cadena lateral se encuentra en contacto con el disolvente, donde parte de la energía absorbida es transferida a las moléculas de agua y por lo tanto la longitud de onda del máximo de emisión es mayor (340-350).<sup>6</sup>

### 1.1.3 Compuestos de coordinación

Un *compuesto de coordinación* es un compuesto eléctricamente neutro en el cual al menos uno de los iones es un complejo. Sin embargo, los términos *compuesto de coordinación* (el compuesto neutro) y *complejo* (iones o especies neutras presentes en el compuesto) se emplean a menudo indistintamente. Los compuestos de coordinación incluyen complejos en los cuales el átomo metálico central es eléctricamente neutro, como  $\text{Ni}(\text{CO})_4$ , y compuestos iónicos, como  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ .<sup>10</sup>

Gran parte de la investigación se centra en las estructuras, las propiedades y los usos de los complejos formados por los iones de metales de transición (ácidos de Lewis), también llamados *metales d* debido a su configuración electrónica, y una variedad de ligantes (bases de Lewis), en parte debido a que intervienen en muchas reacciones biológicas. Los complejos de los metales *d* son a menudo magnéticos y de colores brillantes y se utilizan en química para análisis, para disolver iones en el galvanizado de metales y para catálisis, además son objeto de investigación en conversión de la energía solar, fijación de nitrógeno atmosférico y productos farmacéuticos.<sup>10</sup>

Los complejos también pueden estar formados por iones metálicos de los grupos principales. Por ejemplo, la clorofila, que acumula energía solar en la fotosíntesis, es un complejo de magnesio. Sin embargo, los metales *d* forman la variedad más rica de complejos.<sup>10</sup>

### 1.1.3.1 Complejos de coordinación

El término *complejo* implica un átomo o ion metálico central (ácido de Lewis) rodeado por un conjunto de ligantes (bases de Lewis). Un *ligante* es un ion o molécula que puede tener una existencia independiente. El átomo en la base de Lewis que se enlaza al átomo central se denomina *átomo donador*, debido a que cede los electrones utilizados en la formación del enlace. El átomo o ion metálico, del complejo, es el *átomo aceptor*.<sup>10</sup>

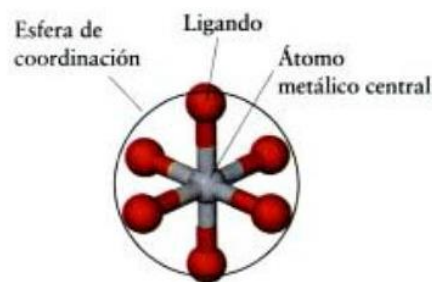


Figura 1.9 Complejo de esfera interna

En un *complejo de esfera interna*, los ligantes se unen directamente al átomo o ion metálico central (Figura 1.9).<sup>11</sup> El número de puntos en los cuales los ligantes se unen al átomo metálico central se denomina *número de coordinación del complejo*.<sup>10</sup> Se debe tener en cuenta que los cationes complejos pueden asociarse electrostáticamente con ligantes aniónicos (y con moléculas de disolvente, por medio de otras interacciones débiles) sin desplazamiento de los ligantes ya existentes. El producto de esta asociación se denomina *complejo de esfera externa*.<sup>11</sup>

### 1.1.3.2 Metaloproteínas

Algunas de las enzimas críticas de nuestras células son *metaloproteínas*, moléculas orgánicas grandes constituidas por cadenas polimerizadas y plegadas de aminoácidos que también incluyen al menos un átomo metálico. Los metales del bloque *d* catalizan reacciones redox, forman componentes de la membrana, del músculo, de la piel y del hueso, catalizan reacciones ácido-base, controlan el flujo de la energía y del oxígeno y llevan a cabo la fijación del nitrógeno.<sup>10</sup>

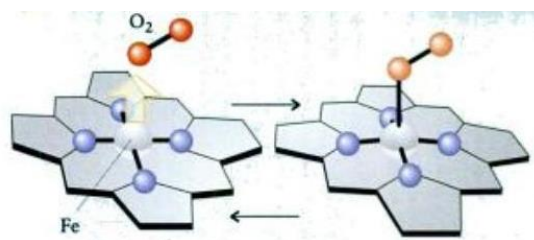


Figura 1.10 Hemoglobina, la metaloproteína más conocida.

El oxígeno molecular se transporta a través del cuerpo mediante su unión con el hierro (II) presente en el grupo hemo de la hemoglobina. El átomo de hierro (II) se encuentra en el centro de un complejo plano cuadrado formado por átomos de nitrógeno. Cuando la molécula de  $O_2$  se une al hierro, el plano del grupo hemo se distorsiona (Figura 1.10).

El cobalto es un metal *d* necesario para prevenir la anemia perniciosa y algunos tipos de enfermedad mental. Es parte esencial de la cobalamina, una coenzima necesaria para la

actividad de la vitamina B<sub>12</sub>.

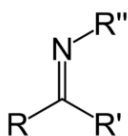
Las enzimas que poseen zinc desempeñan varias funciones importantes en el metabolismo, entre ellas la expresión de nuestros genes, la digestión de los alimentos, el almacenamiento de la insulina y la síntesis del colágeno.

Otros metales de transición también son vitales para la salud. Por ejemplo, el cromo (III) cumple una función en la regulación del metabolismo de la glucosa. El cobre (I) es un nutriente esencial para conservar a las células sanas y es el único ácido de Lewis con carga +1 disponible biológicamente.<sup>10</sup>

### 1.1.4 Iminas

Las *iminas*, también conocidas como *Bases de Schiff*, son análogos nitrogenados de las cetonas y aldehídos, con un enlace C=N en lugar del enlace C=O;<sup>12</sup> se trata de ligantes polidentados acíclicos.

Estos compuestos son designados estructuralmente como RR'C=NR'' (*Figura 1.11*).<sup>13</sup> Se encuentran principalmente en forma de fenilhidrazonas, semicarbazonas y oximas, todas ellas sólidos cristalinos estables y de punto de fusión alto.<sup>14</sup> Se consideran intermediarios versátiles para la síntesis de componentes farmacéuticos biológicamente activos.<sup>12</sup>



**Figura 1.11** Estructura general de una imina

El enlace C=N es usado ampliamente en reacciones orgánicas tales como reducción, adición, ciclación y aziridinación. Tiene características en el espectro de infrarrojo muy similares a las del enlace C=O, mostrando absorciones en la vecindad de 1670 cm<sup>-1</sup>.<sup>14</sup> Tradicionalmente, son sintetizadas por condensación de una amina con un compuesto carbonilo, especialmente aldehídos.<sup>12</sup>

La naturaleza de los grupos R se limita a sustituyentes alquilo, arilo, o hidrógeno. Así tenemos a las aldminas y cetiminas, las primeras se refieren a compuestos en los que R es alquilo o arilo y R' es un hidrógeno, y las segundas a compuestos en los que R y R' son alquilo o arilo.<sup>13</sup> Los nombres sustitutivos de las iminas se pueden obtener utilizando el sufijo “-imina”, si es el grupo principal, o el prefijo “imino-”, si no lo es. Las azometinas (aldminas y cetiminas) se pueden nombrar como iminas N-sustituidas.<sup>15</sup>

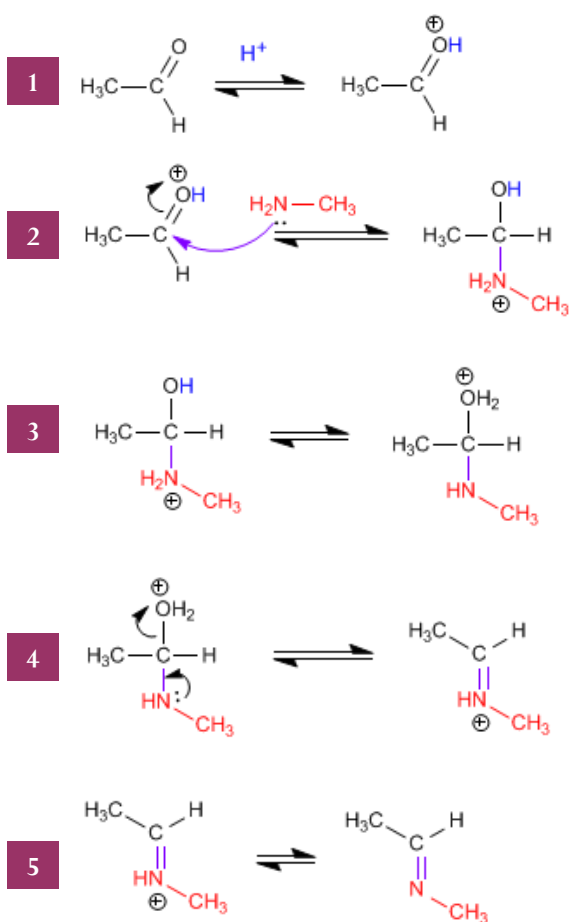
En el desarrollo de la Química de coordinación clásica, uno de los tipos de ligantes más significativos han sido las bases de Schiff,<sup>16</sup> denominadas así porque fue *Ugo (Hugo) Joseph Schiff* el primero que reportó su preparación, en el año de 1864.<sup>17</sup> Por conveniencia, el término *Base de Schiff*, se limita para designar únicamente iminas donde R es un grupo arilo, R' es un hidrógeno, y R'' es un grupo arilo o alquilo.<sup>13</sup>

En la formación de complejos quelatos tanto en la química de coordinación de metales de transición como de los elementos de los grupos principales, las Bases de Schiff han jugado un importante papel como modelos estereoquímicos tanto por su accesibilidad preparativa como por su variabilidad estructural.<sup>16</sup>

En los últimos años las *Bases de Schiff* se han utilizado con más frecuencia para el mejoramiento de los sistemas agrícolas y el bienestar humano debido a su amplio espectro de actividad biológica: como citotoxicidad, anticancerígenos, antifúngicos, y actividad herbicida.<sup>18</sup>

#### 1.1.4.1 Síntesis de iminas

La formación de una *imina* ( $RR'C=NR$ ) es una reacción de condensación, en la que una amina primaria ( $RNH_2$ ) reacciona con una cetona o un aldehído; es una reacción típica de adición nucleofílica en la que el agua se elimina del intermediario tetraédrico formado inicialmente y se genera un nuevo enlace  $C=N$ .<sup>12</sup> Es reversible y en la mayoría de los casos se puede volver a hidrolizar para obtener la amina y la cetona o aldehído iniciales.<sup>19</sup>



El mecanismo de formación se puede dividir en 5 etapas: (1) Protonación del grupo carbonilo, (2) adición nucleofílica catalizada por ácido de la amina primaria al grupo carbonilo del aldehído, (3) protonación del grupo hidroxilo que lo convierte en un buen grupo saliente, seguida por la desprotonación del átomo de nitrógeno, generando un intermediario inestable llamado carbinolamina, (4) pérdida de agua, el catión resultante es catalizado por formas de resonancia y (5) la pérdida de un protón forma la imina.<sup>19</sup>

El pH apropiado es crucial para la formación de iminas. La síntesis es lenta a pH alto y a pH bajo, pero alcanza una velocidad máxima a un pH débilmente ácido de alrededor de 4.5.<sup>12</sup> Si la disolución es demasiado ácida, la amina vuelve a protonarse y deja de ser nucleofílica.

Figura 1.12 Formación de una imina

### 1.1.5 Métodos de Inmovilización

La inmovilización es el proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de moléculas por su unión a un soporte. Los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos categorías: retención física y unión química.<sup>20</sup>

En este trabajo el método empleado es retención física, específicamente atrapamiento.

Consiste en la retención física del compuesto en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión del compuesto en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico.<sup>20</sup>

El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, el compuesto queda atrapado en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso se encuentra ocluido dentro de las microcavidades de una fibra sintética. El atrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de moléculas para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, el compuesto no sufre alteración alguna en su estructura. De todas formas, el atrapamiento requiere un control, riguroso de las condiciones de polimerización, así como de la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos del compuesto.<sup>20</sup>

# Capítulo 2

## 2.1 HIPÓTESIS

Es posible inmovilizar triptófano mediante enlaces covalentes coordinados, uniéndolo a un complejo metálico de hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) soportado sobre un polímero de silicona, conservando su actividad de fluorescencia una vez inmovilizado.

## 2.2 JUSTIFICACIÓN

La inmovilización se ideó como una alternativa para hacer factible que un proceso fisicoquímico o biotecnológico sea rentable. Este método ha sido utilizado para resolver problemas de estabilidad, reutilización y dificultad para separar sustratos de productos.

Existen sistemas de inmovilización que emplean moléculas biológicas y algunos polímeros, pero involucran enlaces covalentes entre los grupos activados de los soportes y los grupos funcionales de los aminoácidos, como resultado de esta interacción se generan enlaces peptídicos, de arilación, de alquilación, de formación de enlace diazo, Base de Schiff o de intercambio tiol-disulfuro, que pueden llegar a inhibir la actividad del aminoácido.

En este trabajo se propone un método de inmovilización mediante la unión de triptófano a un complejo de coordinación que se encuentra soportado sobre silicona. La silicona es un polímero inerte que no es compatible con el crecimiento microbiano, presenta baja reactividad química, buena estabilidad térmica y baja toxicidad. Los enlaces covalentes coordinados permiten que el aminoácido conserve su actividad y pueda liberarse de forma sencilla al cambiar el pH del medio, para así ser reutilizado en estudios posteriores.

## 2.3 OBJETIVOS

### 2.3.1 Objetivo general

- Inmovilizar triptófano, sobre un polímero funcionalizado con un complejo metálico mediante enlaces covalentes coordinados, conservando la actividad de fluorescencia del aminoácido.

### 2.3.2 Objetivos específicos

- Encontrar las condiciones de reacción adecuadas para sintetizar el ligante 2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)amino)fenol (**MRZ**).
- Caracterizar el ligante mediante técnicas espectroscópicas de UV-vis, infrarrojo ATR-IR y espectrometría de masas por la técnica de FAB<sup>+</sup>.
- Encontrar las condiciones de reacción adecuadas para sintetizar los complejos de coordinación a partir del ligante *MRZ* y los metales de transición Fe<sup>3+</sup> y Cu<sup>2+</sup>.
- Purificar y caracterizar los complejos mediante técnicas espectroscópicas de UV-Vis, infrarrojo FT-IR y espectrometría de masas por FAB<sup>+</sup>.
- Formar películas del polímero sobre una superficie limpia y plana.
- Soportar el complejo sobre la película y realizar la inmovilización del aminoácido.
- Comprobar que el aminoácido conserva su actividad de fluorescencia utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia.

# Capítulo 3

## 3.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 3.1.1 Reactivos y disolventes

Los reactivos y disolventes utilizados en este proyecto se obtuvieron de las compañías *Sigma Aldrich* y *Golden Bell*, sin ninguna purificación adicional.

2-aminofenol ( $C_6H_7NO$ , Sigma Aldrich, 109.13 g/mol, 99%), isoftalaldehído ( $C_8H_6O_2$ , Sigma Aldrich, 134.13 g/mol, 97%), cloruro férrico hexahidratado ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , Golden Bell, 270.3 g/mol), acetato de cobre ( $Cu(CO_2CH_3)_2 \cdot H_2O$ , Sigma Aldrich, 199.65 g/mol), triptófano ( $C_{11}H_{12}N_2O_2$ , Sigma Aldrich, 204.23 g/mol), metanol ( $CH_3OH$ , Golden Bell, 32.04 g/mol), cloroformo ( $CHCl_3$ , Golden Bell, 119.38 g/mol), hexano ( $CH_3(CH_2)_4CH_3$ , Golden Bell, 86.18 g/mol), bromuro de potasio (KBr, Sigma Aldrich, 119.0 g/mol, 99%), gel de sílice ( $SiO_2$ , Sigma Aldrich, 60.0843 g/mol).

### 3.1.2 Equipos

- Los espectros de UV-vis se realizaron en un espectrofotómetro *Cary-50 Conc Varian*, a temperatura ambiente en un intervalo de 200 a 800 nm; las celdas utilizadas son de cuarzo con camino óptico de 1 cm.
- Se utilizó un espectrofotómetro *Digilab Scmitar FT-IR/ATR-IR* para obtener los espectros de infrarrojo; cada medición fue realizada a temperatura ambiente en la zona del Infrarrojo Medio ( $400-4000\text{ cm}^{-1}$ ).
- Los espectros de masas se realizaron en un espectrofotómetro *Jeol YMS-700D Ion Model EI Resolution 1000*, mediante la técnica FAB<sup>+</sup>.
- El punto de fusión fue determinado en un equipo *AYSPEL punto de fusión modelo PDF-A2*, en un rango de temperatura de 25 a 300 °C.
- Los espectros de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro *Varian modelo Cary Eclipse, software Cary Eclipse 2000*, lámpara de xenón con disminución de ruido.
- La evaporación a presión reducida y suave se realizó en un Rotavapor-Mini *VICHI Modelo MNR-250*.
- Para acelerar la disolución de sólidos se utilizó un sonicador *Cole-Parmer modelo 8892*.

### 3.1.3 Metodología de síntesis

#### 3.1.3.1 Tratamiento previo del material

El material de vidrio utilizado en cada síntesis es lavado previamente con una mezcla de jabón y cloro, se enjuaga con agua destilada y posteriormente se agrega acetona para remover algún residuo que aún permanezca adherido, este proceso se repite cuantas veces sean necesarias. Una vez que el material está completamente limpio se deja secar a temperatura ambiente. Cuando va a ser utilizado de forma inmediata, se coloca dentro de la estufa, tapado con papel aluminio para evitar una posible contaminación; esta acción se realiza para todo el material de vidrio a excepción del material de aforación.

Las balas magnéticas se colocan en un vaso de precipitados de 10 ml con acetona durante 10 segundos.

#### 3.1.3.2 Síntesis, purificación y caracterización del ligante 2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)amino)fenol [MRZ]

En un matraz de bola se colocan 0.218 g (2 mmol) de 2-aminofenol (más 20% de exceso), 0.268 g (2 mmol) de isoftalaldehído y 20 ml de metanol; la mezcla de reacción se deja en agitación constante durante 2 horas en condiciones de reflujo. Después de este tiempo, se detiene el calentamiento y el crudo de reacción se deja enfriar a temperatura ambiente. Se obtiene un líquido amarillento translucido y trazas de un sólido blanquecino, se filtra a vacío y el líquido es colocado en un matraz tipo pera para evaporar el disolvente a presión reducida y suave, utilizando un Rotavapor-Mini, o en su defecto se realiza una destilación simple. Cuando el disolvente se ha evaporado casi en su totalidad se detiene el equipo y el líquido se traspasa a un vaso de precipitados utilizando un poco de cloroformo si es necesario. Se seca a vacío y se obtiene un sólido viscoso de color anaranjado.

Se realiza una cromatografía en columna para purificar el compuesto. El sistema elegido es una mezcla 70% cloroformo:30% hexano.

Se coloca una cantidad de gel de sílice en un vaso de precipitados y se agrega metanol para obtener una suspensión, ésta se vierte poco a poco en una bureta con el paso cerrado. Una vez que se ha empacado la columna se agrega hexano para lavar el metanol, luego se hacen pasar 10 ml de la mezcla y se agrega el compuesto, disuelto en cloroformo, en un solo paso. La mezcla se va agregando hasta separar cada fracción en vasos de precipitados distintos.

Se obtienen los espectros de UV-vis de cada una de las fracciones para descartar aquellas donde no se encuentre el ligante, las fracciones en las que sí esté presente se colocan en el rotavapor para evaporar el disolvente. El compuesto se traspasa a un matraz de bola y se seca a vacío.

Posteriormente el ligante se coloca en una cámara oscura y se irradia con luz ultravioleta para corroborar que no presenta fluorescencia y puede ser utilizado para la síntesis de los complejos de coordinación.

**MRZ:** Rendimiento 83.46% (crudo de reacción), 33.54% (ligante puro); **UV-Vis** ( $\lambda$  nm, CH<sub>3</sub>OH) 245 ( $\pi \rightarrow \pi^*$ , C=C), 275 ( $\pi \rightarrow \pi^*$ , C=C, Ar), 359 ( $n \rightarrow \pi^*$ , N=C); **FT-IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>)  $\tilde{\nu}$  3398 (OH-fenol), 2964 (C-H, Ar), 1693 (C=N), 1624, 1581, 1485, 1450 (C=C, Ar), 1247 (C-O, fenol), 746 (C-H, benceno *orto*-disustituido); **MS** 317 m z<sup>-1</sup> (PM= 316.12 g mol<sup>-1</sup>); **p. f.** 40°C.

### 3.1.3.3 Síntesis, purificación y caracterización de los compuestos de coordinación

#### 3.1.3.3.1 (2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)-amino)fenol)Cu(II) [MRZ-Cu (II)]

Se agregan 30 ml de metanol a un matraz de bola que contiene 0.424 g ( $1.34 \times 10^{-3}$  mol) de ligante *MRZ* y se coloca en agitación. Una vez que se obtenga una mezcla homogénea, se añaden 0.487 g ( $2.683 \times 10^{-3}$  mol) de acetato de cobre, se mantiene la agitación constante durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se detiene la agitación, el crudo de reacción se filtra a vacío y se obtiene un sólido color café claro.

Este sólido es parcialmente soluble en metanol. La parte insoluble es filtrada y el líquido obtenido se traspasa a un matraz de bola, posteriormente se coloca a baño María para evaporar el disolvente, aplicando vacío. Finalmente se obtiene un sólido color café oscuro.

**MRZ-Cu (II):** Rendimiento 39.48%; **UV-Vis** ( $\lambda$  nm, CH<sub>3</sub>OH) 232 ( $\pi \rightarrow \pi^*$ , C=C), 434 ( $d \rightarrow d$ ) N ----Cu); **FT-IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>)  $\tilde{\nu}$  3373 (OH-fenol), 3051 (C-H, Ar), 1701 (C=N), 1600, 1446 (C=C, Ar), 1244 (C-O, fenol), 750 (C-H, benceno *orto*-disustituido); **MS** 441 m z<sup>-1</sup> (PM=439.96 g mol<sup>-1</sup>).

### 3.1.3.3.2 (2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)-amino)-fenol)Fe(III) [MRZ-Fe (III)]

Se agregan 30 ml de metanol en el matraz de bola que contiene 2.0254 g ( $6.4 \times 10^{-3}$  mol) del ligante MRZ y se coloca en agitación. Una vez que se obtenga una mezcla homogénea, se añaden 0.540 g (2 mmol) de cloruro férrico, se mantiene la agitación constante durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se detiene la agitación, el crudo de reacción se coloca a baño María para evaporar el disolvente, aplicando vacío. Una vez seco se lava con éter etílico, se obtiene un sólido color negro.

**MRZ-Fe (III): Rendimiento** 29.32%; **UV-Vis** ( $\lambda$  nm, CH<sub>3</sub>OH) 377 ( $d \rightarrow d$ , N ---- Fe); **FT-IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>)  $\tilde{\nu}$  3390 (OH-fenol), 3051 (C-H, Ar), 1693 (C=N), 1600 (C=C, Ar), 750 (C-H, benceno orto-disustituido), **MS** 370 m z<sup>-1</sup> (PM= 425.97 g mol<sup>-1</sup>).

Ambos complejos se colocan en una cámara oscura y se irradian con luz ultravioleta para corroborar que no presentan fluorescencia y pueden ser utilizados para la inmovilización del aminoácido.

## 3.1.4 Metodología de inmovilización

### 3.1.4.1 Preparación de soluciones

Trp: Se prepara una solución  $1 \times 10^{-3}$  M.

En un matraz de aforado de 10 ml se colocan 0.002 g del aminoácido y se agrega poco a poco metanol hasta llegar a la marca de aforo. Posteriormente se tapa el matraz y se coloca en el Sonicador durante 10 minutos.

MRZ-Cu (II): Se prepara una solución  $2.6 \times 10^{-4}$  M.

La solución se encuentra en una concentración  $7.95 \times 10^{-6}$  M. En un matraz aforado se colocan 3 mg del complejo y se afora con metanol.

MRZ-Fe (III): Se prepara una solución  $1 \times 10^{-3}$  M.

En un matraz de aforado de 10 ml se colocan 0.002 g del aminoácido y se agrega poco a poco metanol hasta llegar a la marca de aforo.

### 3.1.4.2 Inmovilización del aminoácido

La silicona se disuelve en cloroformo para formar una película sobre un cubreobjetos. En un vial se agrega aproximadamente 1 g del polímero y se vierten 5 ml de cloroformo, se coloca sobre una parrilla con agitación constante y calentamiento suave. Cuando el polímero está

totalmente fundido, se sumerge un cubreobjetos durante 10 segundos y se deja secar a temperatura ambiente. Posteriormente este cubreobjetos se introduce rápidamente en la solución del complejo, se elimina el exceso y finalmente se sumerge en la solución de Trp.

La preparación se coloca en una cámara oscura para observar la fluorescencia al hacer incidir sobre ella luz ultravioleta.

Se hace una comparación entre la preparación, la película de polímero, y el complejo unido a la película, en portaobjetos diferentes.

### 3.1.5 Pruebas de fluorescencia

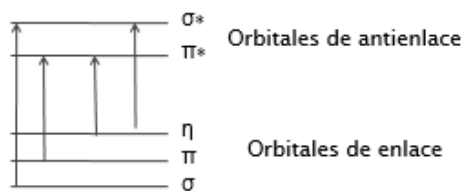
En una celda especial para fluorescencia se colocan 1 ml de etanol y 1 ml de la solución del aminoácido para obtener el espectro base. Posteriormente se agregan 10  $\mu\text{L}$  de la solución del complejo y se obtiene el espectro correspondiente, esta acción se repite hasta que dejen de observarse cambios.

Para ambos complejos es el mismo procedimiento.

## 3.2 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

### 3.2.1 Espectroscopia de UV-Vis

Se basa en las transiciones electrónicas ( $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$  y  $n \rightarrow \pi^*$ ) y ofrece información sobre el estado electrónico de la molécula en la muestra (*Figura 3.1*). Para medir el espectro de UV-Vis de un compuesto, se disuelve la muestra en un disolvente que no absorba sobre 200 nm. La solución de la muestra se coloca en una celda de cuarzo, y el disolvente utilizado se coloca en una celda de referencia. Un espectrofotómetro de UV-Vis opera comparando la cantidad de luz transmitida a través de la muestra y la transmitida a través del disolvente. Como el espectrofotómetro utiliza las longitudes de onda en la región UV-Vis, un equipo de cómputo registra una gráfica (llamada *espectro*), de la absorbancia de la muestra como una función de la longitud de onda.<sup>21</sup>



*Figura 3.1* Transiciones electrónicas entre orbitales

### 3.2.2 Espectroscopia infrarroja

Se debe a las vibraciones de los enlaces y proporciona evidencia de los grupos funcionales presentes.

Los fotones infrarrojos no tienen la energía suficiente para ocasionar transiciones electrónicas, pero pueden ocasionar que los grupos de átomos vibren con respecto a los enlaces que los conectan. Estas transiciones vibracionales corresponden a distintas energías, y las moléculas absorben la radiación infrarroja sólo a ciertas longitudes de onda y frecuencias. Los modos de vibración fundamentales de una molécula son “estiramiento” (simétrico o asimétrico) y “flexión” (de balanceo, de tijera, de oscilación y de torsión). En la vibración de la flexión, las longitudes de enlace permanecen constantes, pero los ángulos de enlace vibran alrededor de sus valores de equilibrio, aparecen en la región de la huella digital ( $600$  a  $1400\text{ cm}^{-1}$ ). Las vibraciones de los estiramientos sencillos en la región de  $1600$  a  $3500\text{ cm}^{-1}$  son las más características y predecibles.<sup>22</sup>



Figura 3.2 Modos de vibración de las moléculas

### 3.2.3 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas no es una técnica espectroscópica, debido a que no mide la absorción o la emisión de luz. Un espectrómetro de masas ioniza moléculas al alto vacío, las bombardea con electrones de alta energía y las fragmenta, clasifica los iones de acuerdo a sus masas y registra la abundancia de los iones de cada masa. Esta información se usa para reconstruir la molécula.<sup>22</sup>

Para obtener un espectro de masas las moléculas se ionizan, los iones son atraídos a una placa aceleradora con carga negativa, la cual tiene una abertura estrecha para permitir que algunos de los iones pasen. El haz de iones entra en un tubo analizador o tubo de vuelo, con una porción curva posicionada entre los polos de un imán grande,<sup>22</sup> donde se separan según su relación masa/carga ( $m/z$ ). El tubo se mantiene a un alto grado de vacío ( $\sim 10^{-5}$  Pa), de forma que los iones no se desvían por colisiones con otras moléculas. El campo magnético modifica la trayectoria de los iones, afectando en mayor medida a los iones ligeros. Al final del tubo de vuelo hay otra abertura seguida por el detector conectado

a un amplificador, cada ion que llega desencadena una cascada de electrones.<sup>21</sup> La señal del detector es proporcional al número de iones que lo golpean.

### 3.2.4 Espectroscopia de fluorescencia

La *fluorescencia* es la emisión de un fotón durante una transición entre estados con los mismos números cuánticos de espín.<sup>21</sup> Es un fenómeno físico mediante el cual ciertas sustancias llamadas *fluoróforos* absorben energía en forma de radiación electromagnética emitiéndola en una longitud de onda mayor en un periodo de tiempo muy corto; el tiempo

entre la absorción y emisión de la luz es del orden de  $10^{-8}$  segundos.<sup>23</sup>

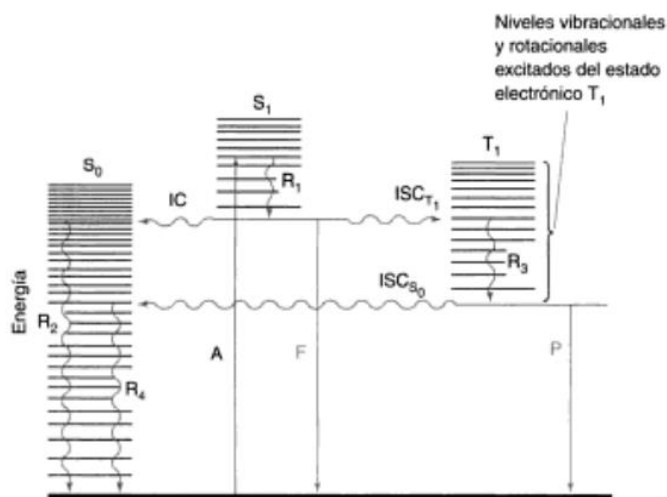


Figura 3.3 Procesos físicos que pueden ocurrir cuando una molécula absorbe un fotón.

Supongamos que la absorción hace pasar a una molécula desde el estado electrónico fundamental, S<sub>0</sub>, a un estado vibracional y rotacional excitado del estado electrónico excitado S<sub>1</sub>. El proceso después de esta absorción es una *relajación vibracional*; esta transición puede ser no radiante (sólo se convierte luz en calor) mediante *conversión interna* (IC) o *cruce entre sistemas* (ISC), o la molécula podría relajarse

emitiendo un fotón (Figura 3.3). Existen dos tipos de transición radiante, este trabajo se enfoca en la transición S<sub>1</sub>→S<sub>0</sub> llamada *fluorescencia*.<sup>21</sup>

Los fluoróforos se pueden dividir en dos clases generales: extrínsecos e intrínsecos. Se denomina fluoróforo intrínseco a aquel que por sí mismo presenta fluorescencia. Por ejemplo, el grupo indol del triptófano en las proteínas.<sup>23</sup>

Los componentes principales de cualquier espectrofotómetro de fluorescencia son: la fuente de luz, el selector de onda, la celda para la muestra, un segundo selector de onda para aislar la fluorescencia emitida y el detector. Una propiedad de la fluorescencia es que el mismo espectro de emisión se observa generalmente independientemente de la longitud de onda de excitación, debido a la rápida relajación del exceso de energía de un fluoróforo.<sup>24</sup>

# Capítulo 4

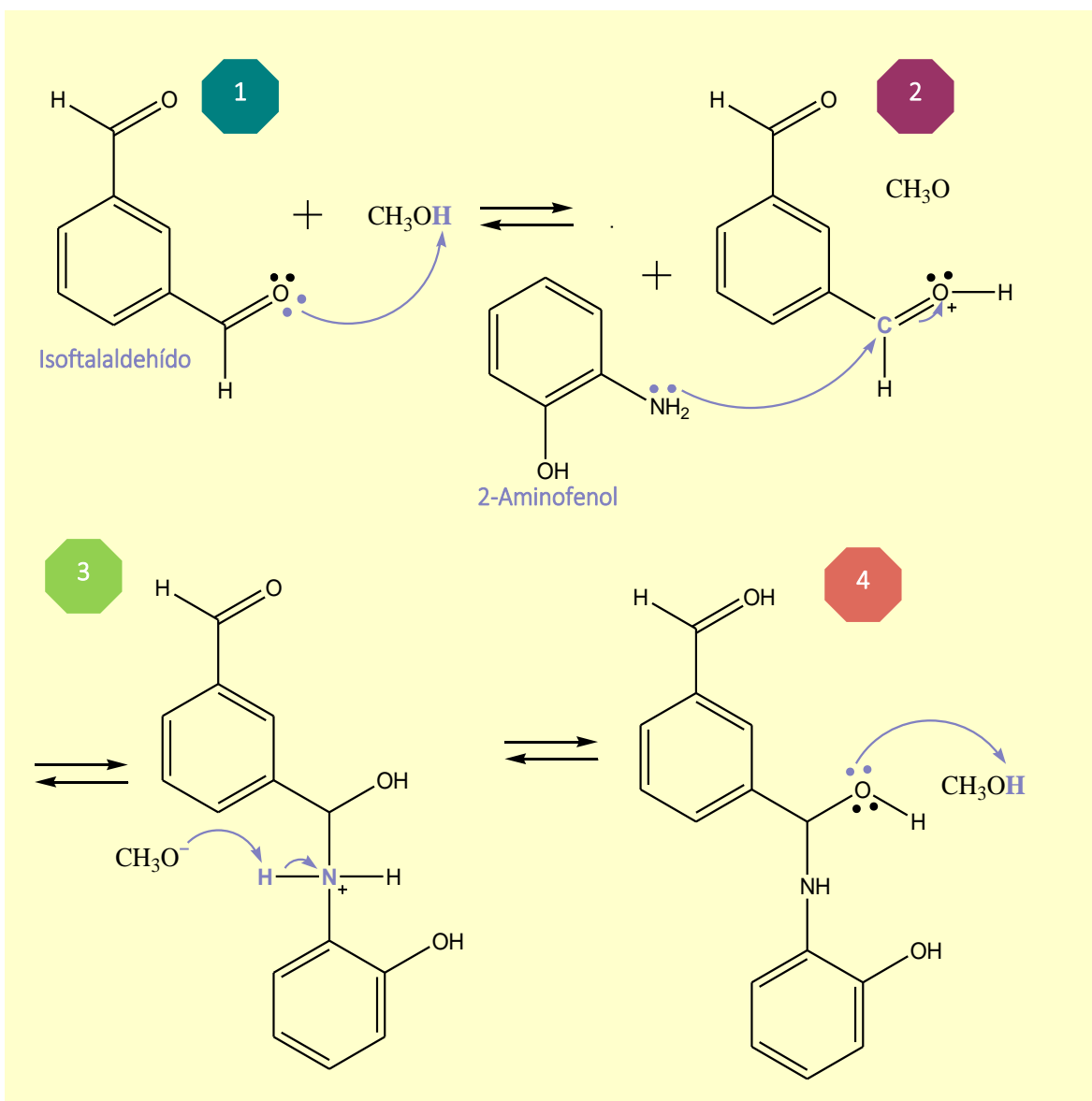
## 4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1.1 Ligante MRZ

#### 4.1.1.1 Mecanismo de reacción

El mecanismo de reacción propuesto para la reacción de condensación del 2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)amino)fenol (MRZ) se muestra en la *Figura 4.1*, donde el disolvente actúa como catalizador.

36



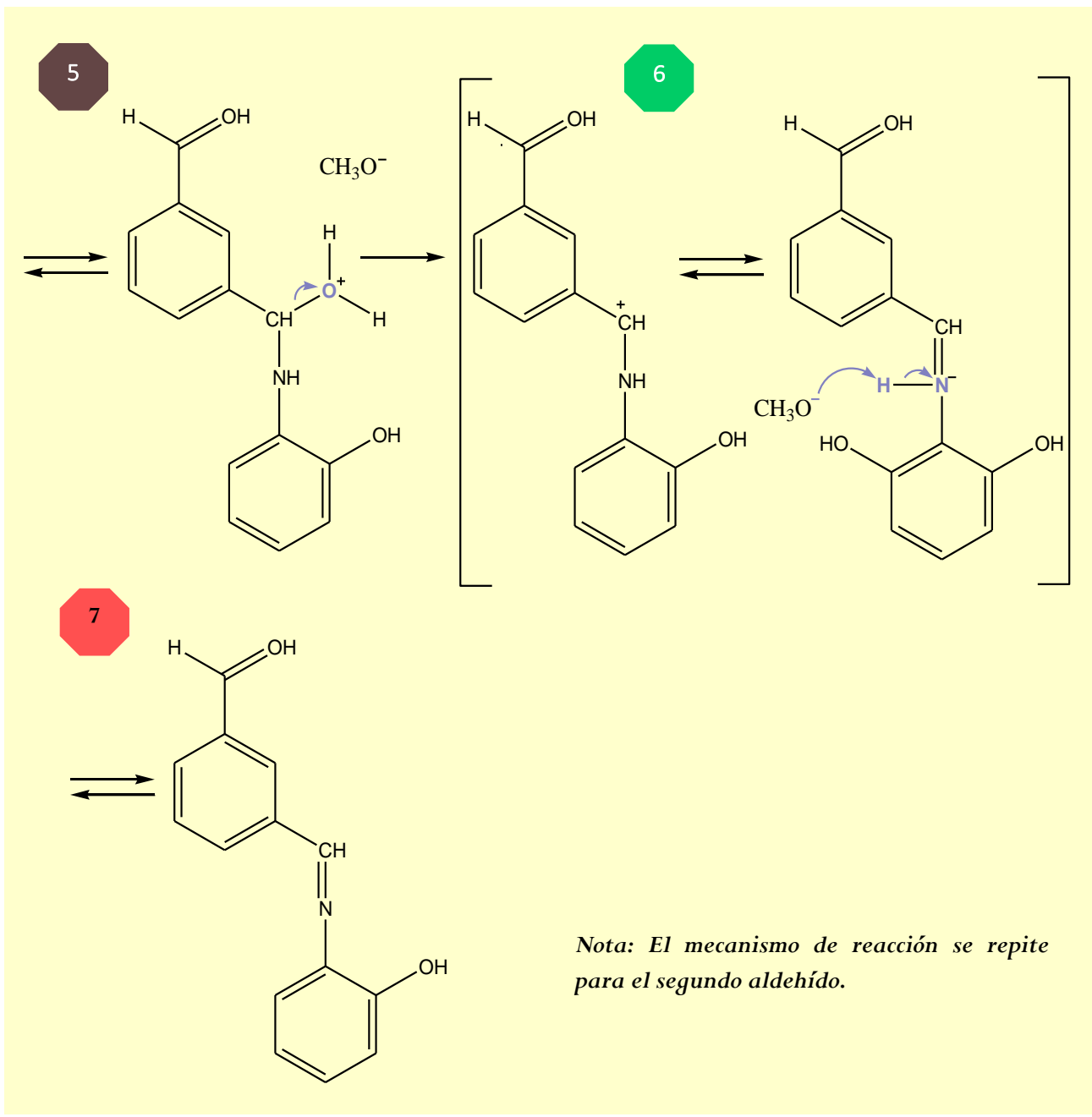


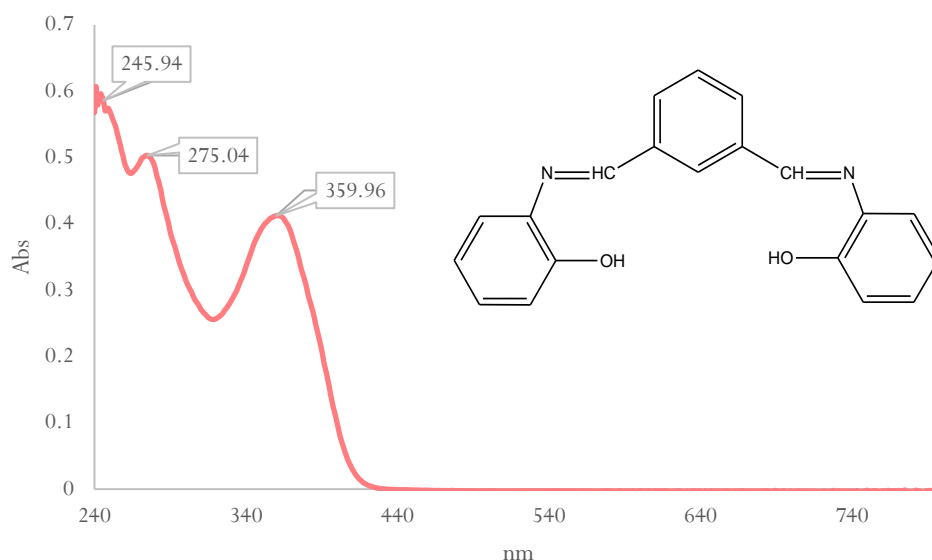
Figura 4.1 Mecanismo de reacción propuesto para el compuesto 2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)amino)fenol [MRZ]

### 4.1.1.2 Espectroscopia de UV-Vis

El espectro de absorción del ligante *MRZ*, mostrado en la *Figura 4.2*, presenta tres bandas de baja intensidad. Las bandas en 245 y 275 nm se asignan a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  del grupo C=C. La banda en 359 nm es asignada a la transición  $n \rightarrow \pi^*$  generada por los pares electrónicos no compartidos del grupo N=C.

La banda en 245 nm pertenece al aldehído y la encontrada en 284 nm a la amina, ésta se ve ligeramente desplazada hacia mayor energía (275 nm), ambas asignadas a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  de los grupos C=C en sus anillos correspondientes, mientras que la banda en 359 nm es nueva, generada por la formación del grupo imino (*Figura 4.3*).

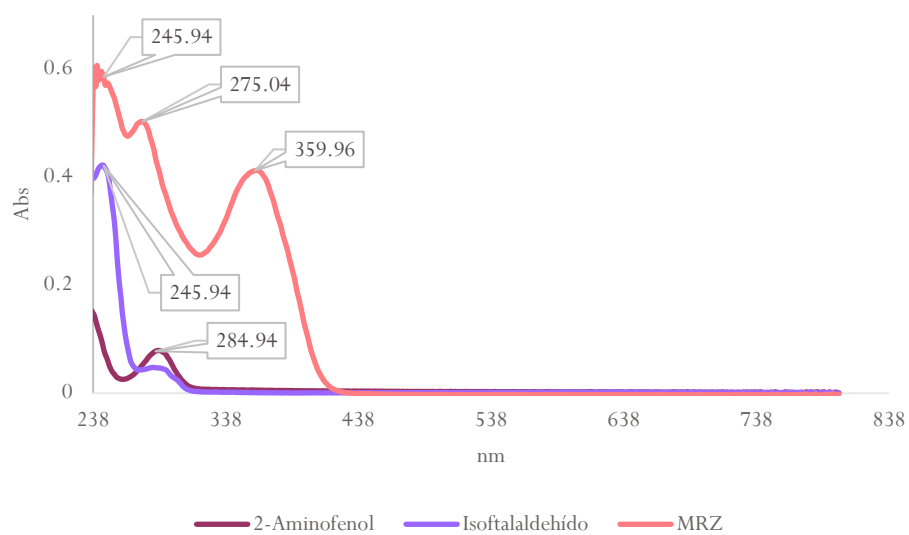
Los espectros de UV-vis de las materias primas, *2-aminofenol* e *isofitalaldehído*, se muestran en el Apéndice como *Figura 1* y *Figura 2*, respectivamente.



*Figura 4.2* Espectro de absorción de UV-Vis del ligante *MRZ*,  $\text{CHCl}_3$

**Tabla 4.1** Transiciones electrónicas del ligante *MRZ*

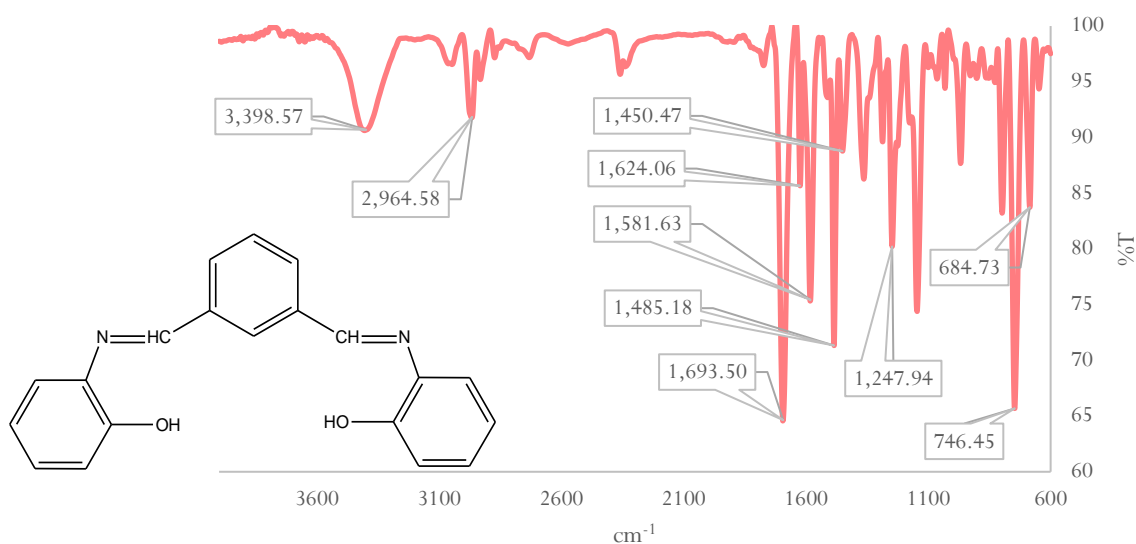
<b>Longitud de onda (nm)</b>	<b>Transición electrónica</b>	<b>Átomos</b>
245	$\pi \rightarrow \pi^*$	C=C
275	$\pi \rightarrow \pi^*$	C=C
359	$n \rightarrow \pi^*$	N=C



**Figura 4.3** Espectro comparativo de absorción de UV-Vis entre el ligante *MRZ* y las materias primas: 2-aminofenol e isoftalaldehído

### 4.1.1.3 Espectroscopia infrarroja (ATR-IR)

En la *Figura 4.4* se muestra el espectro de IR del ligante *MRZ*, se presentan las bandas características del compuesto: alrededor de  $1693\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda que pertenece a las vibraciones de tensión del enlace C=N; la banda de tensión en  $3398\text{ cm}^{-1}$  y la banda de flexión en  $684\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones del enlace O-H; las vibraciones de enlace del anillo aromático se observan en las regiones de  $1450$ ,  $1485$ ,  $1581$  y  $1624\text{ cm}^{-1}$ ; alrededor de  $1247\text{ cm}^{-1}$  se encuentra una banda que pertenece a las vibraciones de tensión del enlace C-O; la banda de flexión en  $746\text{ cm}^{-1}$  y la banda de tensión en  $2964\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones del enlace C-H del anillo aromático, con hibridación  $sp^2$ .



*Figura 4.4* Espectro de absorción de infrarrojo (ATR-IR) del compuesto *MRZ*

**Tabla 4.2** Vibraciones moleculares del compuesto *MRZ*

<b>Número de onda (<math>cm^{-1}</math>)</b>	<b>Enlace</b>
684	O-H [Fenol]
746	C-H [Benceno orto-disustituido]
1247	C-O [Fenol]
1450	C=C [Ar]
1485	
1581	
1624	
1693	C=N [Imina]
2964	C-H [Ar]
3398	O-H [Fenol]

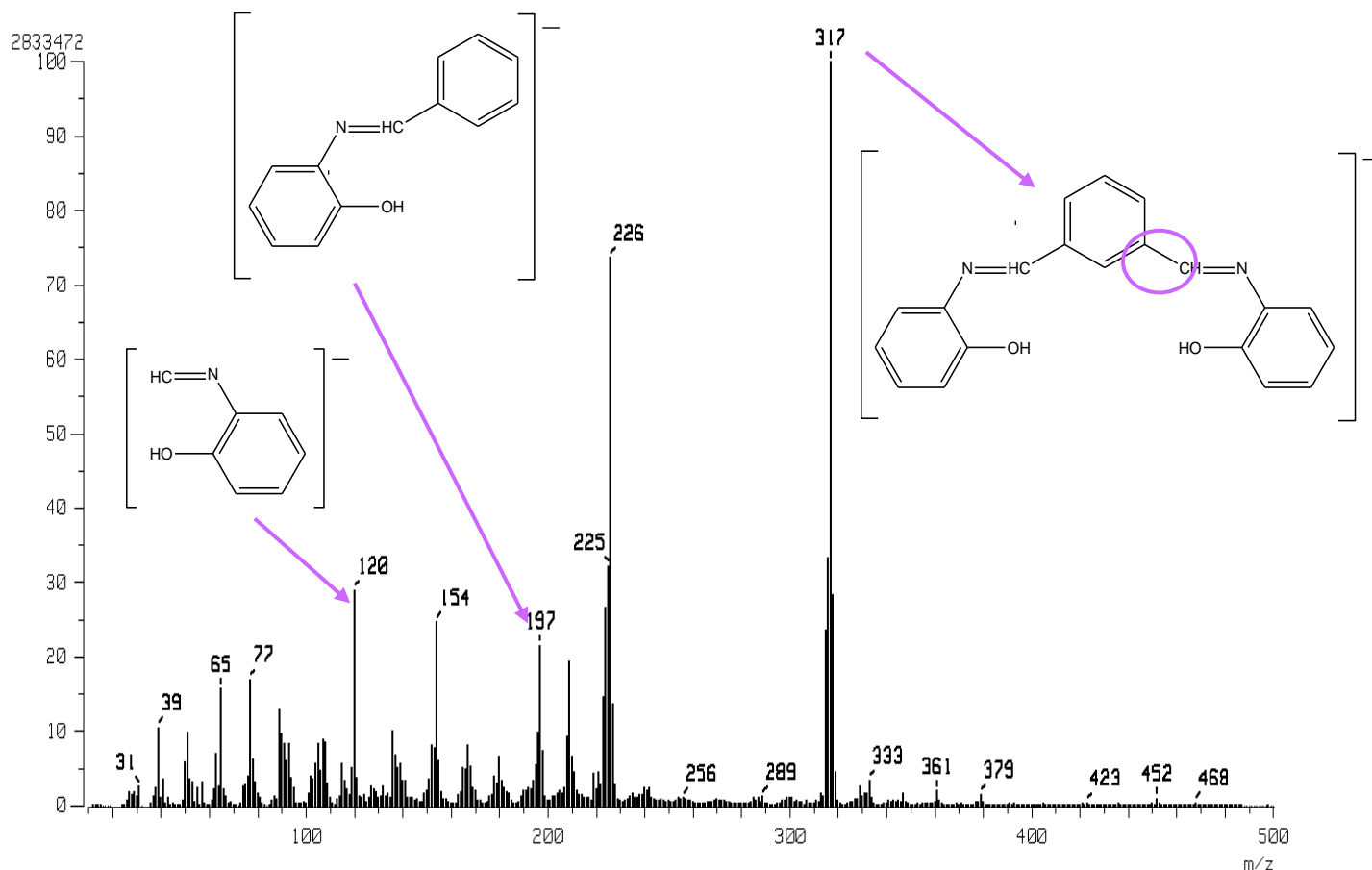
#### 4.1.1.4 Espectrometría de masas

En la *Tabla 4.3* se muestra la relación  $m/z$  del ion molecular del ligante MRZ, originado durante el proceso de fragmentación propuesto (*Figura 4.5*). El *pico ion molecular* presenta una  $m/z$  de 317 que corresponde a la masa molecular del ligante. La técnica utilizada fue  $FAB^+$  generando una ruptura entre los dos átomos de carbono señalados en la figura.

**Tabla 4.3** Espectro de masas del compuesto MRZ

$m/z$	Ion molecular	Fragmentos
	317	197
		120

41

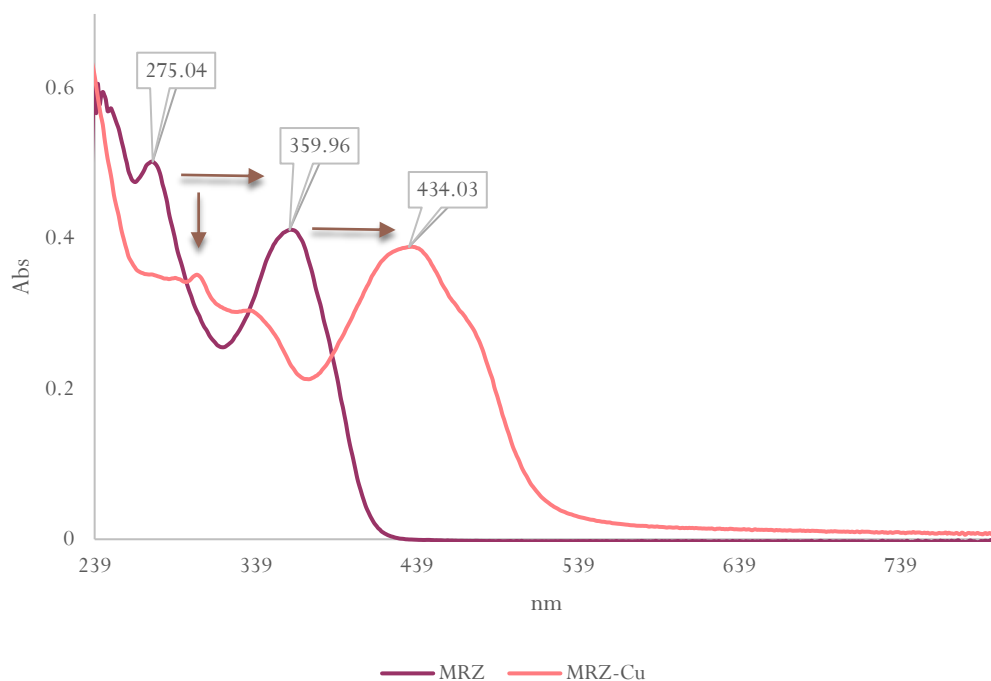


**Figura 4.5** Patrón de fragmentación propuesto para el compuesto MRZ,  $FAB^+$

## 4.1.2 Complejo *MRZ-Cu (II)*

### 4.1.2.1 Espectroscopia UV-Vis

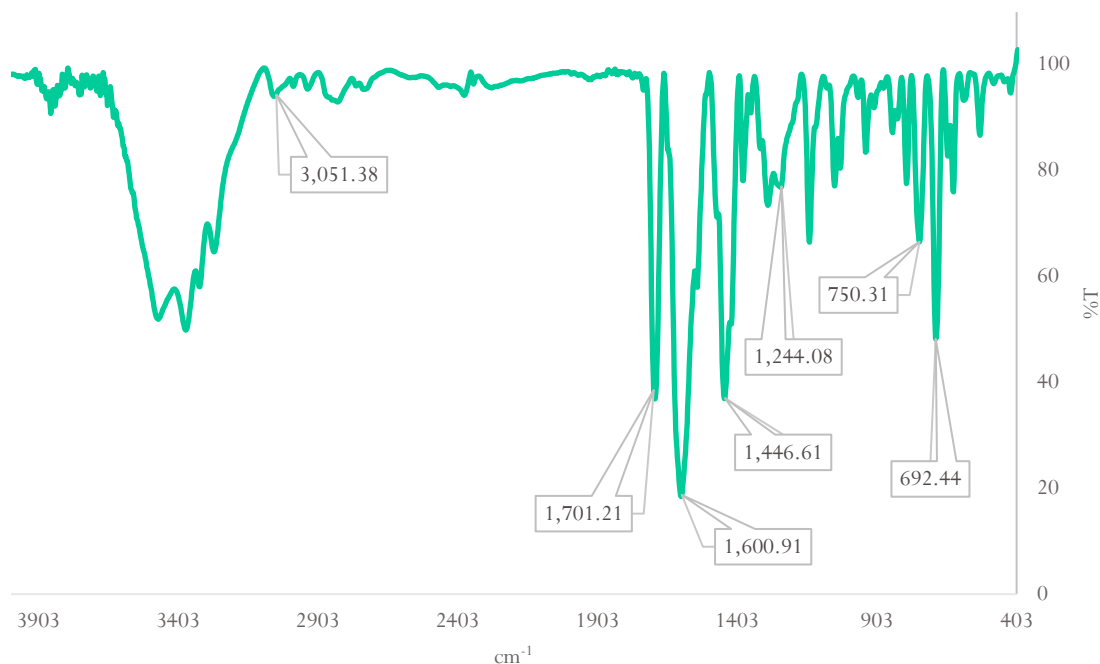
En la *Figura 4.6* se muestra el espectro comparativo de absorción de UV-Vis entre el ligante *MRZ* y el complejo de cobre *MRZ-Cu (II)*. La banda en 359 nm asignada a la transición electrónica  $n \rightarrow \pi^*$  del grupo  $N=C$  en el ligante, se ve desplazada hacia mayor longitud de onda (434 nm), menor energía y menor frecuencia en el complejo de coordinación, esto se debe a la presencia del enlace covalente coordinado entre el átomo de nitrógeno y el de cobre, generando transiciones electrónicas  $d \rightarrow d$ . La banda observada en 275 nm asignada a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  del grupo  $C=C$  en el ligante, disminuye su intensidad en el complejo y se ve desplazada también hacia mayor longitud de onda y por ende menor frecuencia y menor energía.



*Figura 4.6* Espectro de absorción de UV-Vis del complejo *MRZ-Cu (II)*, EtOH

#### 4.1.2.2 Espectroscopia infrarroja (FT-IR)

En la *Figura 4.7* se muestra el espectro de infrarrojo del complejo de coordinación *MRZ-Cu (II)*. La banda en la región de  $1693\text{ cm}^{-1}$ , que pertenece a las vibraciones de tensión del enlace C=N en el ligante, se ve desplazada hacia mayor número de onda ( $1701\text{ cm}^{-1}$ ) en respuesta a la formación del enlace covalente coordinado entre el átomo de nitrógeno y el de cobre.



*Figura 4.7* Espectro de absorción de infrarrojo (FT-IR) del complejo *MRZ-Cu (II)*

**Tabla 4.4** Vibraciones moleculares del complejo *MRZ-Cu (II)*

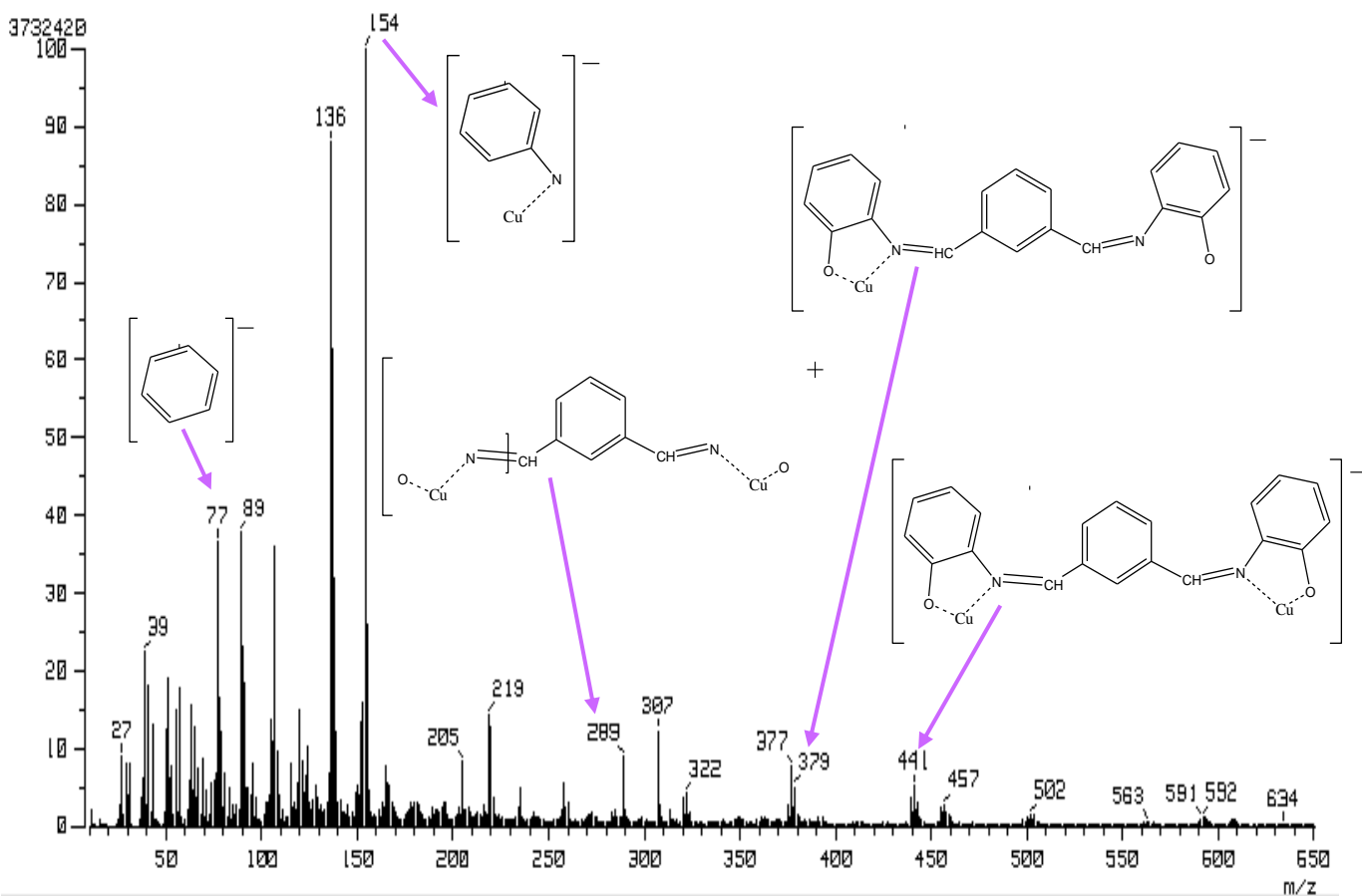
<b>Número de onda (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>Enlace</b>
692	O-H [Fenol]
750	C-H [Benceno orto-disustituido]
1244	C-O [Fenol]
1446	C=C [Ar]
1600	
1701	C=N [Imina]
3051	C-H [Ar]

### 4.1.2.3 Espectrometría de masas

En la *Tabla 4.5* se muestra la relación  $m/z$  del ion molecular del complejo *MRZ-Cu (II)*, originado durante el proceso de fragmentación propuesto (*Figura 4.8*). El *pico ion molecular* presenta una  $m/z$  de 441, lo que significa que un número detectable de iones moleculares alcanza el detector sin fragmentarse. La técnica utilizada fue FAB<sup>+</sup>.

**Tabla 4.5** Espectro de masas del complejo *MRZ-Cu (II)*

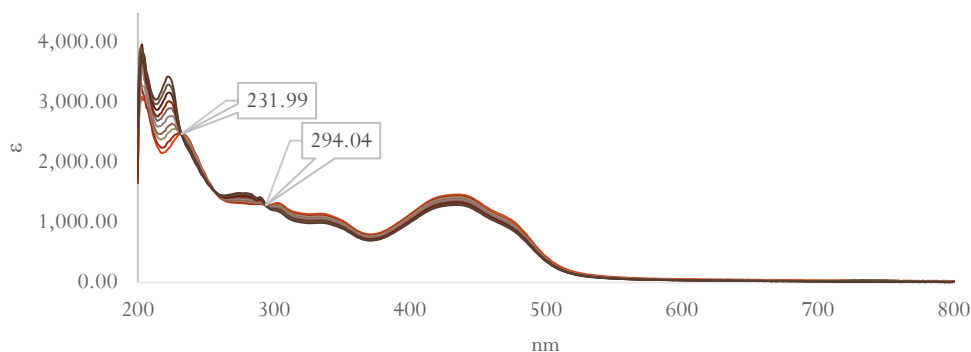
<i>m/z</i>	<i>Ion molecular</i>	<i>Fragmentos</i>
	441	379
		289
		154
		77



**Figura 4.8** Patrón de fragmentación propuesto para el complejo *MRZ-Cu (II)*, FAB<sup>+</sup>

#### 4.1.2.4 Espectroscopia de fluorescencia

Previo al análisis de fluorescencia en el equipo, se realizó una titulación espectrofotométrica adicionando alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  de una solución de triptófano ( $1 \times 10^{-3}$  M) al complejo *MRZ-Cu (II)*, también en solución ( $2.6 \times 10^{-4}$  M). Se observa en la *Figura 4.9* la formación de dos puntos isobásticos, lo cual indica que existe interacción entre el aminoácido y el complejo, generando nuevas especies químicas.<sup>21</sup>



**Figura 4.9** Titulación espectrofotométrica del complejo *MRZ-Cu (II)* ( $2.6 \times 10^{-4}$  M) con una solución de triptófano ( $1 \times 10^{-3}$  M), EtOH

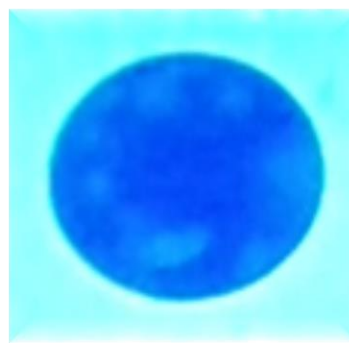
El análisis de fluorescencia en este trabajo, es fundamental para corroborar que la interacción *complejo-aminoácido* no se realiza a través del grupo funcional del triptófano, el cual le confiere la propiedad de fluorecer. Las imágenes que se presentan a continuación muestran el comportamiento del triptófano al interactuar con el complejo metálico *MRZ-Cu (II)* en solución y en fase sólida, cuando se exponen a radiación ultravioleta.



**Imagen A** Complejos de coordinación, *MRZ-Cu (II)* y *MRZ-Fe (III)*, irradiados con luz ultravioleta.



**Imagen B** Complejos de coordinación, *MRZ-Cu (II)* y *MRZ-Fe (III)*, irradiados con luz ultravioleta después de agregar alícuotas de Trp.

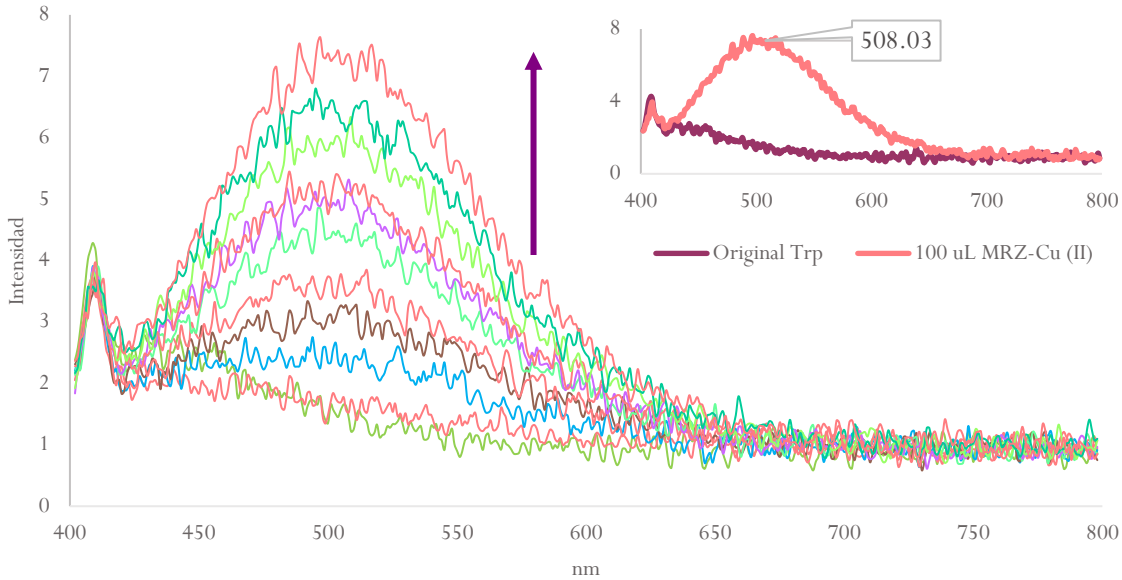


**Imagen C** Película de silicona impregnada con el complejo *MRZ-Cu (II)*, irradiada con luz ultravioleta después de sumergirla en una solución de Trp.

Para tener la certeza de que la fluorescencia proviene del aminoácido y no del complejo o del disolvente cuando interaccionan en solución, se realizaron pruebas individuales. Los complejos de coordinación, *MRZ-Cu (II)* y *MRZ-Fe (III)* disueltos en etanol, no presentan fluorescencia cuando son irradiados con luz ultravioleta (*Imagen A*). Sin embargo, al agregar pequeñas alícuotas de triptófano a las soluciones la fluorescencia es evidente (*Imagen B*).

El comportamiento es similar en fase sólida. No se observa fluorescencia cuando sólo la película de silicona es irradiada con luz ultravioleta ni cuando el complejo está soportado sobre ella. La fluorescencia se presenta cuando el triptófano interacciona con el complejo de coordinación (*Imagen C*).

Se realizó el experimento de forma más sistemática en un espectrofotómetro de fluorescencia. El espectro de emisión del triptófano, cuando está en contacto con el disolvente, presenta un máximo entre 340-350 nm, cuando interacciona con el complejo de coordinación, *MRZ-Cu (II)*, se genera una nueva especie química cuyo espectro de emisión presenta un máximo en 508 nm (*Figura 1.10*). La actividad de fluorescencia del aminoácido no sólo se conserva al reaccionar con el complejo metálico, sino que también se intensifica.

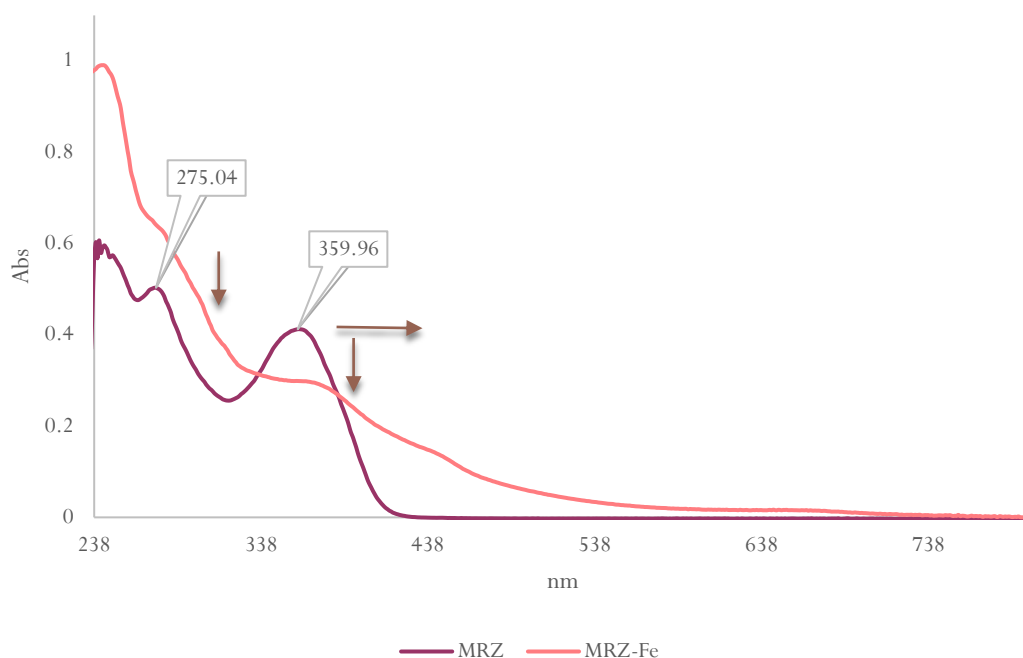


**Figura 4.10** Espectro de emisión de fluorescencia del triptófano (solución 1x10<sup>-3</sup> M) al titular con una solución del complejo *MRZ-Cu (II)* (2.6x10<sup>-4</sup> M), EtOH

### 4.1.3 Complejo *MRZ-Fe (III)*

#### 4.1.3.1 Espectroscopia de UV-Vis

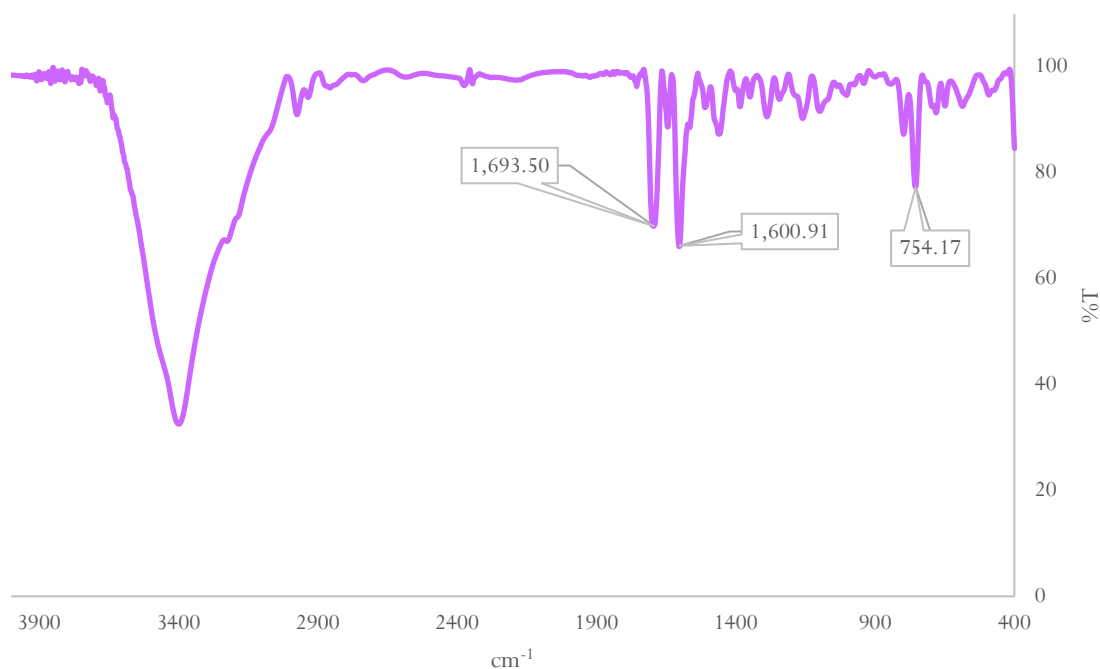
En la *Figura 4.11* se muestra el espectro comparativo de absorción de UV-Vis entre el ligante *MRZ* y el complejo de hierro *MRZ-Fe (III)*. La banda en 359 nm asignada a la transición electrónica  $n \rightarrow \pi^*$  del grupo  $N=C$  en el ligante, se ve desplazada hacia mayor longitud de onda, menor energía y menor frecuencia en el complejo de coordinación, además de que su intensidad decrece, esto se debe a la presencia del enlace covalente coordinado entre el átomo de nitrógeno y el de hierro. La banda observada en 275 nm asignada a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  del grupo  $C=C$  en el ligante, disminuye su intensidad en el complejo de coordinación.



**Figura 4.11** Espectro de absorción de UV-Vis del complejo *MRZ-Fe (III)*, EtOH

### 4.1.3.2 Espectroscopia infrarroja (FT-IR)

En la *Figura 4.12* se muestra el espectro de infrarrojo del complejo de coordinación *MRZ-Fe (III)*. La banda en la región de  $1693\text{ cm}^{-1}$ , que pertenece a las vibraciones de tensión del enlace C=N en el ligante, no presenta desplazamiento en el espectro de absorción del complejo y disminuye su intensidad.



48

*Figura 4.12* Espectro de absorción de infrarrojo (FT-IR) del complejo *MRZ-Fe (III)*

**Tabla 4.6** Vibraciones moleculares del complejo *MRZ-Fe (III)*

<b>Número de onda (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>Enlace</b>
754	C-H [Benceno orto-disustituido]
1600	C=C [Ar]
1693	C=N [Imina]

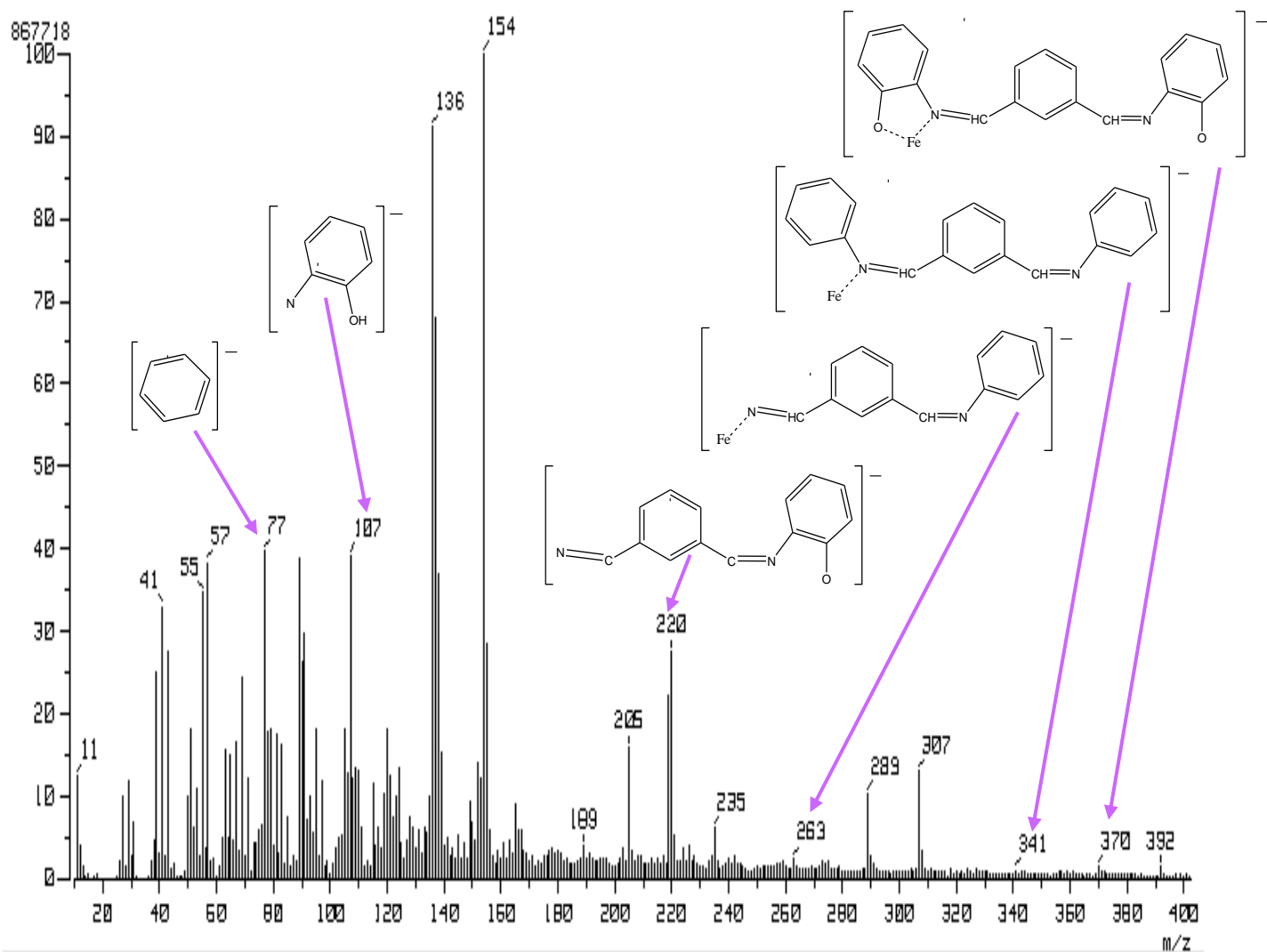
### 4.1.3.3 Espectrometría de masas

En la *Tabla 4.8* se muestra la relación  $m/z$  del ion molecular del complejo *MRZ-Fe (III)*, originado durante el proceso de fragmentación propuesto (*Figura 4.13*). El ion molecular presenta una  $m/z$  de 370. La técnica utilizada fue FAB<sup>+</sup>.

**Tabla 4.7** Espectro de masas del complejo *MRZ-Fe (III)*

<i>m/z</i>	<i>Ion molecular</i>	<i>Fragmentos</i>
	370	341
		263
		220
		107
		77

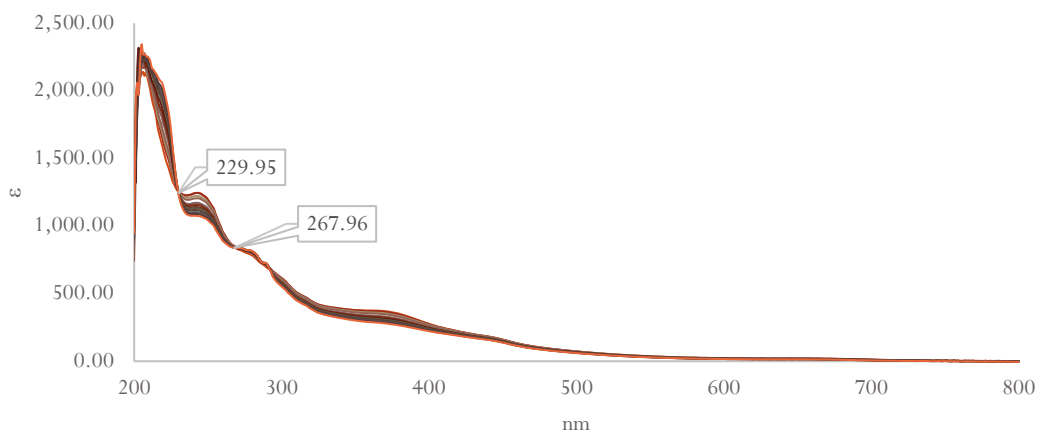
49



**Figura 4.13** Patrón de fragmentación propuesto para el complejo *MRZ-Fe (III)*, FAB<sup>+</sup>

#### 4.1.3.4 Espectroscopia de fluorescencia

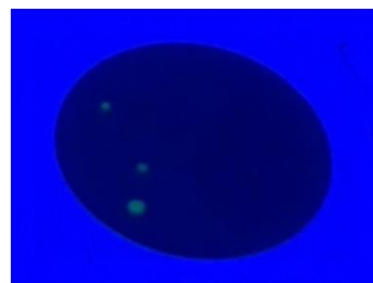
Para el complejo de coordinación *MRZ-Fe (III)* también se realizó una titulación espectrofotométrica previa al análisis de fluorescencia en el equipo. Se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de una solución de triptófano ( $1 \times 10^{-3}$  M) al complejo *MRZ-Fe (III)*, también en solución. En la *Figura 4.14* se observa la formación de dos puntos isobásticos, lo cual indica que existe interacción entre el aminoácido y el complejo, generando nuevas especies químicas.



**Figura 4.14** Titulación espectrofotométrica del complejo *MRZ-Fe (III)* ( $1 \times 10^{-4}$  M) con una solución de triptófano ( $1 \times 10^{-3}$  M), EtOH

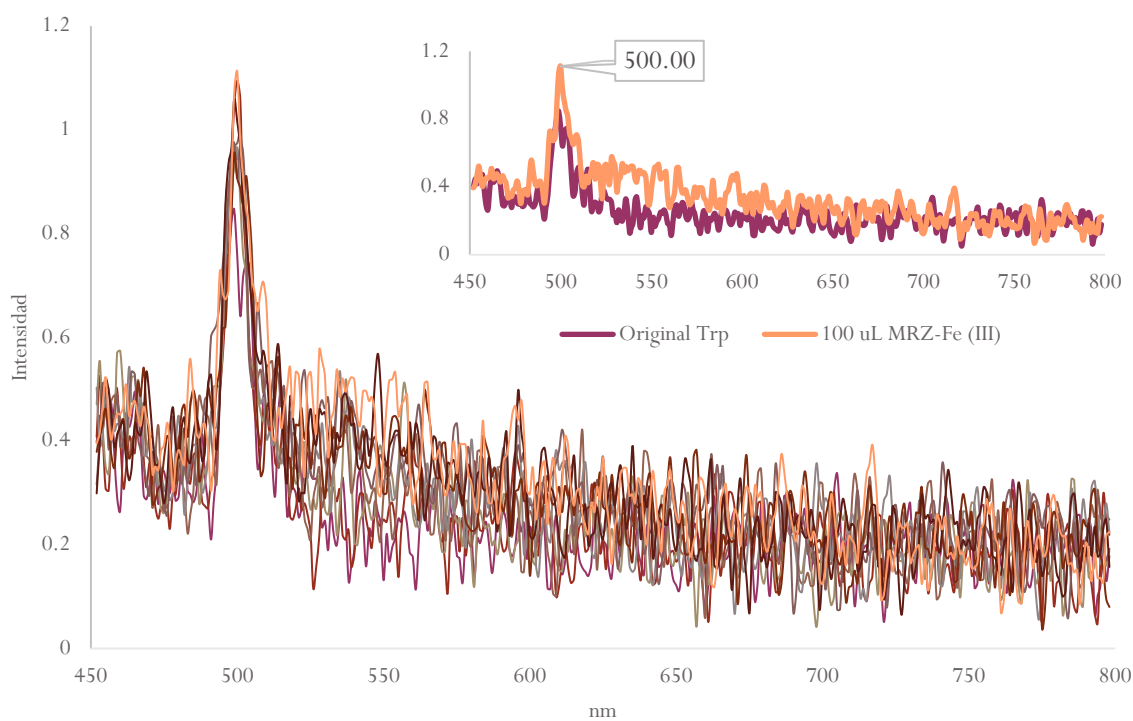
Como se mencionó en el apartado 4.1.2.4, el complejo de coordinación *MRZ-Fe (III)*, en solución, no presenta fluorescencia cuando es irradiado con luz ultravioleta. Sin embargo, al agregar pequeñas alícuotas de triptófano a las soluciones la fluorescencia es evidente (*Imagen B*).

El comportamiento es similar en fase sólida. No se observa fluorescencia cuando sólo la película de silicona es irradiada con luz ultravioleta ni cuando el complejo está soportado sobre ella. La fluorescencia se presenta cuando el triptófano interacciona con el complejo de coordinación (*Imagen D*).



**Imagen D** Película de silicona impregnada con el complejo *MRZ-Fe (III)*, irradiada con luz ultravioleta después de sumergirla en una solución de Trp.

Se realizó el experimento de forma más sistemática en un espectrofotómetro de fluorescencia. El espectro de emisión del triptófano, cuando está en contacto con el disolvente, presenta un máximo entre 340-350 nm, cuando interacciona con el complejo de coordinación, *MRZ-Fe (III)*, se genera una nueva especie química cuyo espectro de emisión presenta un máximo en 500 nm (*Figura 1.15*). La actividad de fluorescencia del aminoácido se conserva al reaccionar con el complejo metálico, sin embargo, no se observó un cambio significativo en la intensidad de la banda de emisión. Por ello, para estudios cuantitativos posteriores, el complejo de coordinación *MRZ-Cu (II)* resulta ser la mejor opción ya que conserva la fluorescencia del aminoácido e incrementa su intensidad.



**Figura 4.15** Espectro de emisión de fluorescencia del triptófano (solución  $1 \times 10^{-3}$  M) titular con una solución del complejo *MRZ-Fe (III)* ( $1 \times 10^{-4}$  M), EtOH

## 4.2 CONCLUSIONES

- Se hallaron las condiciones de reacción adecuadas para sintetizar el ligante 2-((E)-((E)-3-((E)-(2-hidroxifenilimino)metil)bencilidina)amino)fenol (**MRZ**).
- El ligante *MRZ* se caracterizó mediante técnicas espectroscópicas de UV-vis (359 nm,  $n \rightarrow \pi^*$ , N=C), infrarrojo FT-IR (1693  $\text{cm}^{-1}$ , C=N) y espectrometría de masas por FAB<sup>+</sup> (317  $\text{m z}^{-1}$ ).
- Se hallaron las condiciones de reacción adecuadas para realizar la metalación del ligante *MRZ* utilizando  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ .
- Los complejos de coordinación se purificaron y caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas de UV-Vis; infrarrojo FT-IR (*MRZ-Cu (II)*, 1701, C=N; *MRZ-Fe (III)*, 1693, C=N) y espectrometría de masas por FAB<sup>+</sup> (*MRZ-Cu (II)*, 441  $\text{m z}^{-1}$ ; *MRZ-Fe (III)*, 370  $\text{m z}^{-1}$ ).
- Se formaron películas del polímero sobre una superficie limpia y plana y en ellas se soportaron los complejos para realizar la inmovilización del aminoácido.
- Las titulaciones espectrofotométricas y el análisis de fluorescencia en solución y en fase sólida indican que existe una interacción entre el complejo y el triptófano conservando la actividad de fluorescencia de éste.
- El complejo de coordinación *MRZ-Cu (II)* tiene mejor respuesta en el análisis sistemático de fluorescencia que el complejo *MRZ-Fe (III)*, por lo que debe ser utilizado en estudios cuantitativos posteriores.
- La inmovilización de triptófano se realizó satisfactoriamente utilizando enlaces covalentes coordinados.

# REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Nelson, D. (2007). LEHNINGER: PRINCIPIOS DE BIOQUIMICA. Barcelona: OMEGA.
- [2] Voet, D., Voet, J. G. y Pratt, C. W. (2007). Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. Madrid, España. Editorial médica Panamericana.
- [3] Conn, E y Stumpf, P. (1977). Bioquímica fundamental. 3ª Edición. México. Editorial Limusa.
- [4] Feduchi, E., Blasco, I., Romero, C. y Yáñez, E. (2010). Bioquímica, conceptos esenciales. 1ª Edición. Madrid. Editorial Médica Panamericana.
- [5] McKee, T. y McKee, J. (2003). Bioquímica, la base molecular de la vida. 3ª Edición. España. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- [6] Plummer, D. (2002). Introducción a la Bioquímica práctica. Capítulo 5. UNIV de Barcelona.
- [7] Campbell, M. y Farrell, S. (2009). Bioquímica. 6ª Edición. México. Editorial Cengage Learning.
- [8] Ávila, C., Torres, C. y Chalon, M. La espectroscopia de fluorescencia en el análisis estructural de proteínas y de agregados amiloides. Química biológica II. Universidad Nacional de Tucumán (Argentina).
- [9] Skoog, D, Holler, J. & West, D. (1997). Fundamentos de Química Analítica. 4ª Edición. España. Editorial Reverté.
- [10] Atkins, P. y Jones, L. (2006). Principios de química: los caminos del descubrimiento. 3ª Edición. Buenos Aires. Ed. Médica Panamericana.
- [11] Atkins, P., Overton, T., Rourke, J., Weller, M. y Armstrong, F. (2006). Química inorgánica. 4ª Edición. China. Ed. McGraw-Hill.
- [12] McMurry, J. (2012). Organic Chemistry. 8ª Edición. México. Ed. Cengage Learning.
- [13] Layer, R. (1962). The Chemistry of imines.
- [14] Gutsche, D. y Pasto, D. (1979). Fundamentos de química orgánica. Barcelona, España. Ed. Reverté.

- [15] González, F. (1991). Nomenclatura de Química Orgánica. Ed. UNIVERSIDAD DE MURCIA.
- [16] Hernández, R. (1996). Estudio sobre la capacidad coordinante de Bases de Schiff derivadas de orto- y meta-fenilendiaminas. Tesis doctoral. Universidad de la Laguna, Tenerife, España.
- [17] Qin, W., Long, S., Panunzio, M. y Biondi, S. (2013). Schiff Bases: A short survey on an evergreen chemistry tool. *Molecules*, 18(10), 12264-12289.
- [18] Aggarwal, N., Kumar, R., Dureja, P. y Rawat, D. (2009, 24 de agosto). Schiff Bases as potencial fungicides and nitrification inhibitors. *AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*.
- [19] Wade, L. G. (2011). Química orgánica. Volumen 2. 7ª Edición. México. Ed. PEARSON.
- [20] Arroyo, M. (1998) Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.
- [21] Harris, D. (2006). Análisis químico cuantitativo. 3ª (Sexta edición original). España. Reverté.
- [22] Wade, L. G. (2011). Química orgánica. Volumen 1. 7ª Edición. México. Ed. PEARSON.
- [23] Ávila, C., Torres, C. y Chalon, M. La espectroscopia de fluorescencia en el análisis estructural de proteínas y de agregados amiloides. Química biológica II. Universidad Nacional de Tucumán (Argentina).
- [24] Stock, R. (2006). Espectrofluorimetría. Universidad Autónoma de México. Instituto de Biotecnología.

# Apéndice

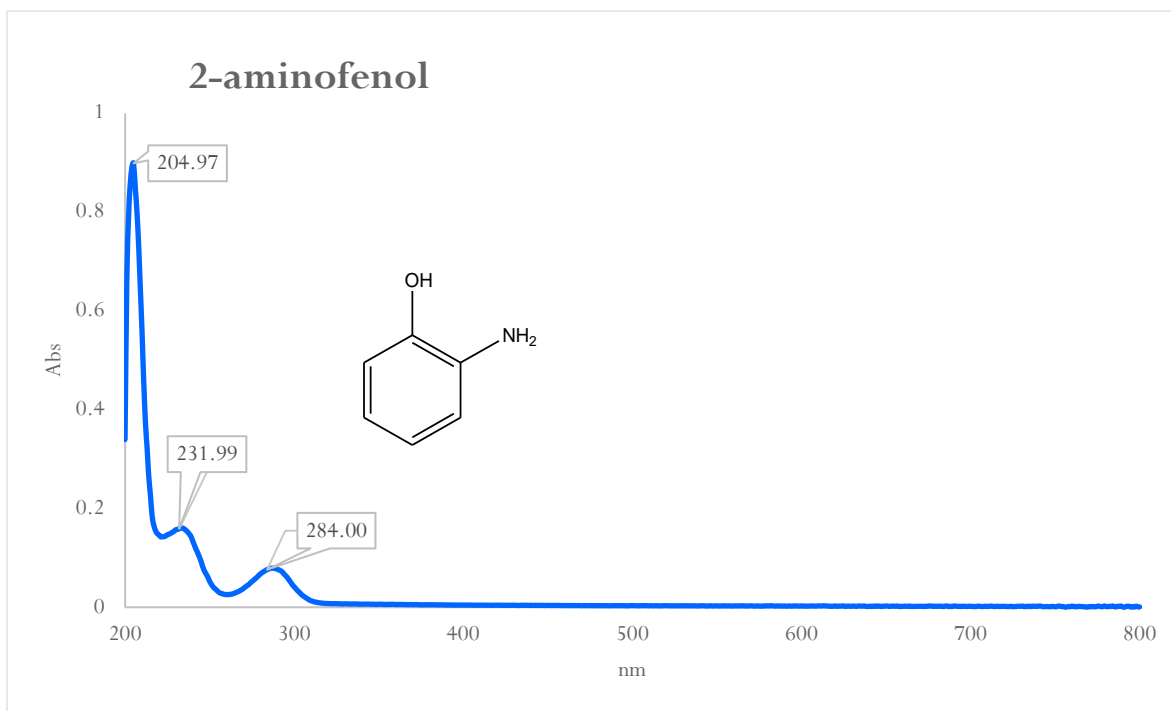


Figura 1. Espectro de UV-Vis de 2-aminofenol, EtOH.

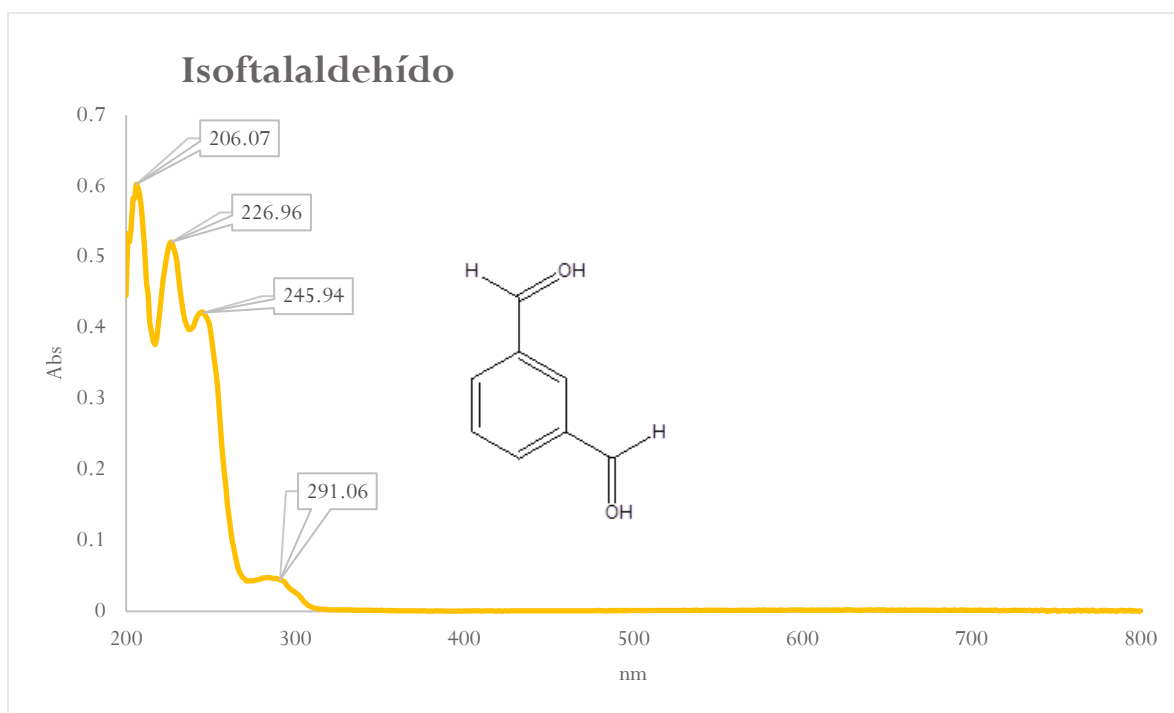


Figura 2. Espectro de UV-Vis de isoftalaldehído, EtOH.

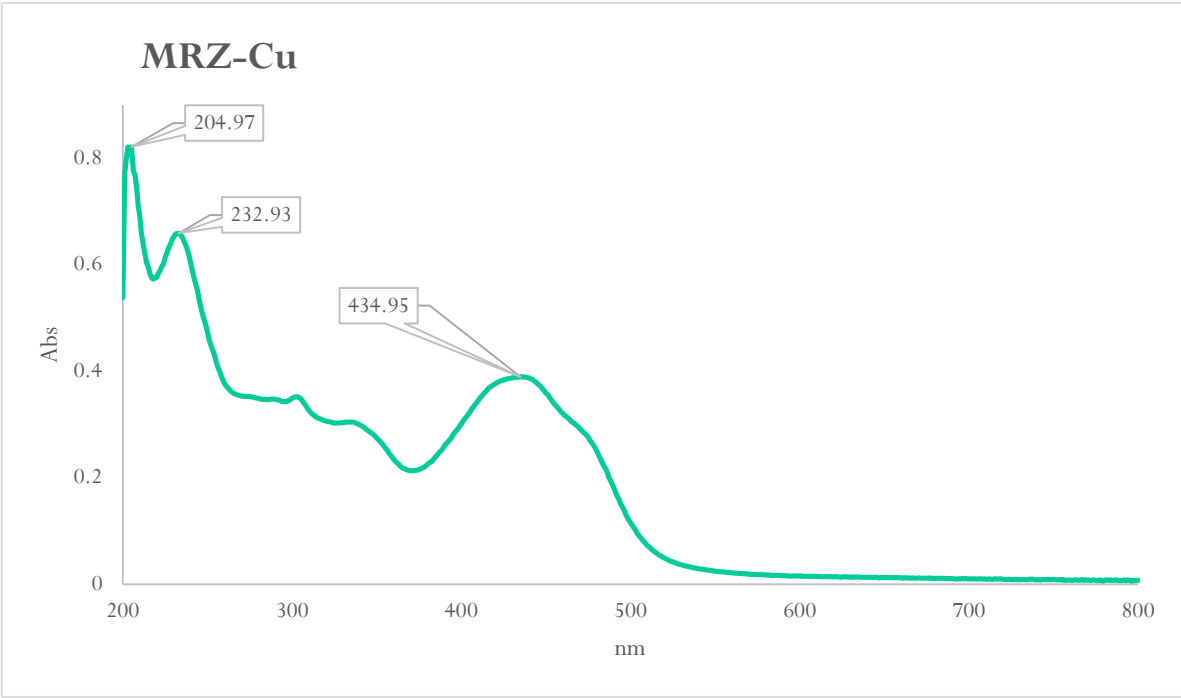


Figura 3. Espectro de UV-Vis de MRZ-Cu, EtOH.

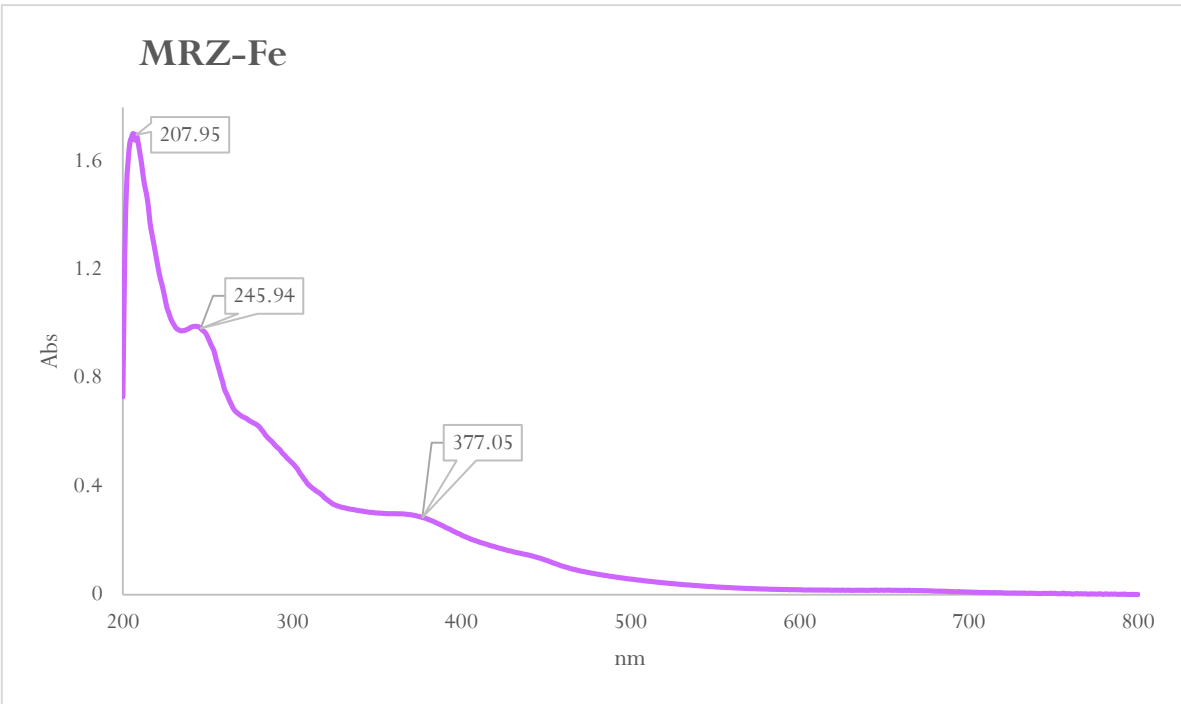


Figura 4. Espectro de UV-Vis de MRZ-Fe, EtOH

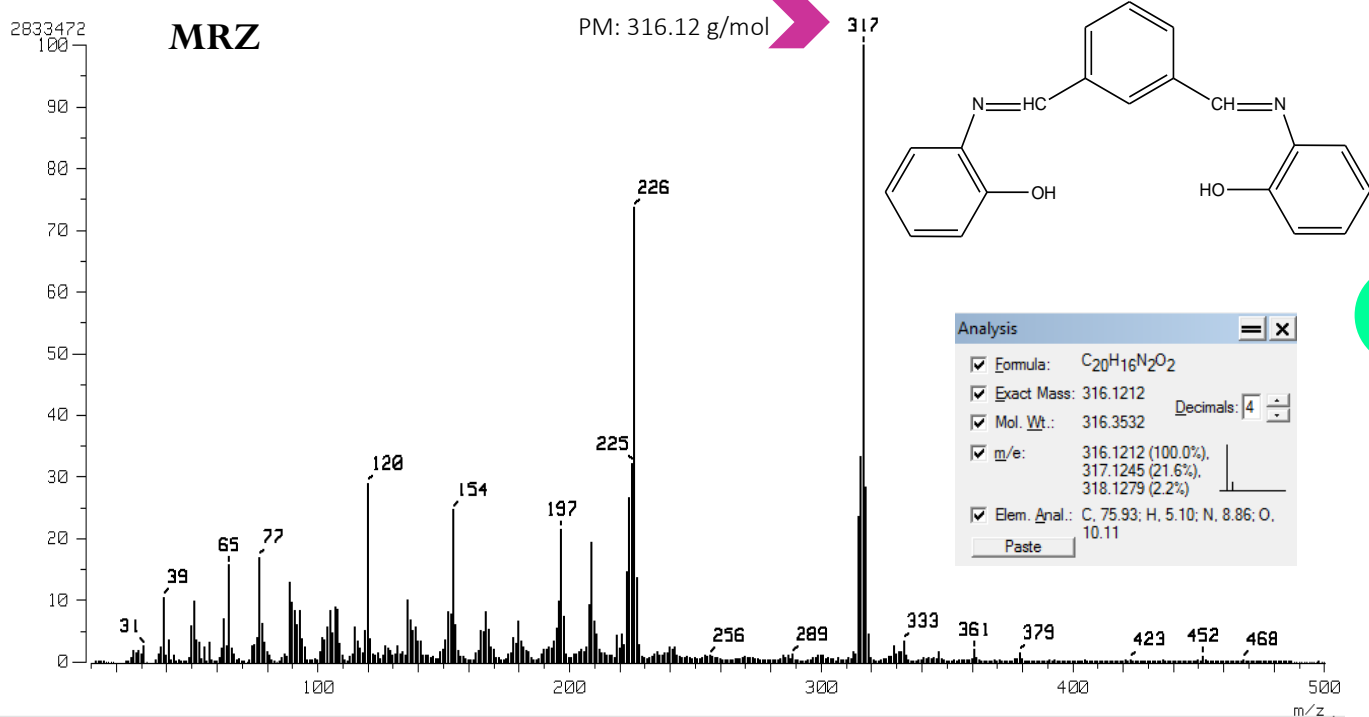


Figura 5. Espectro de masas de MRZ, FAB<sup>+</sup>.

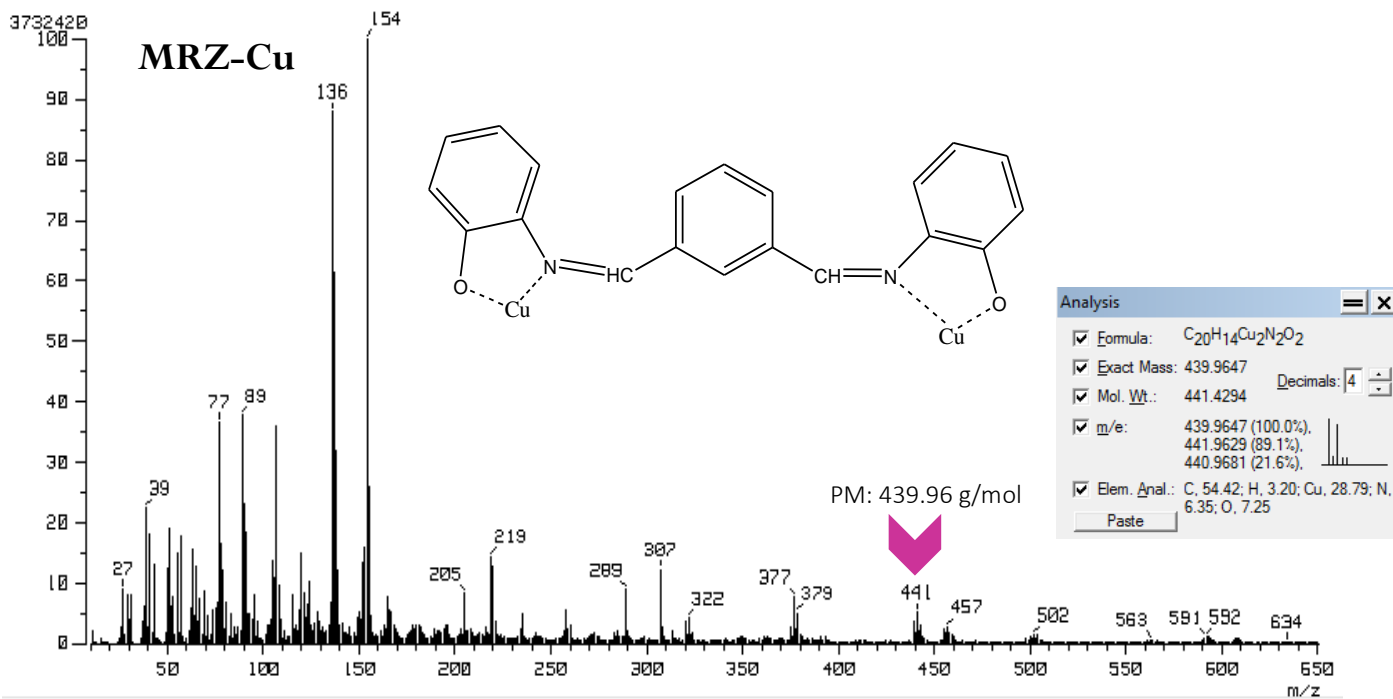
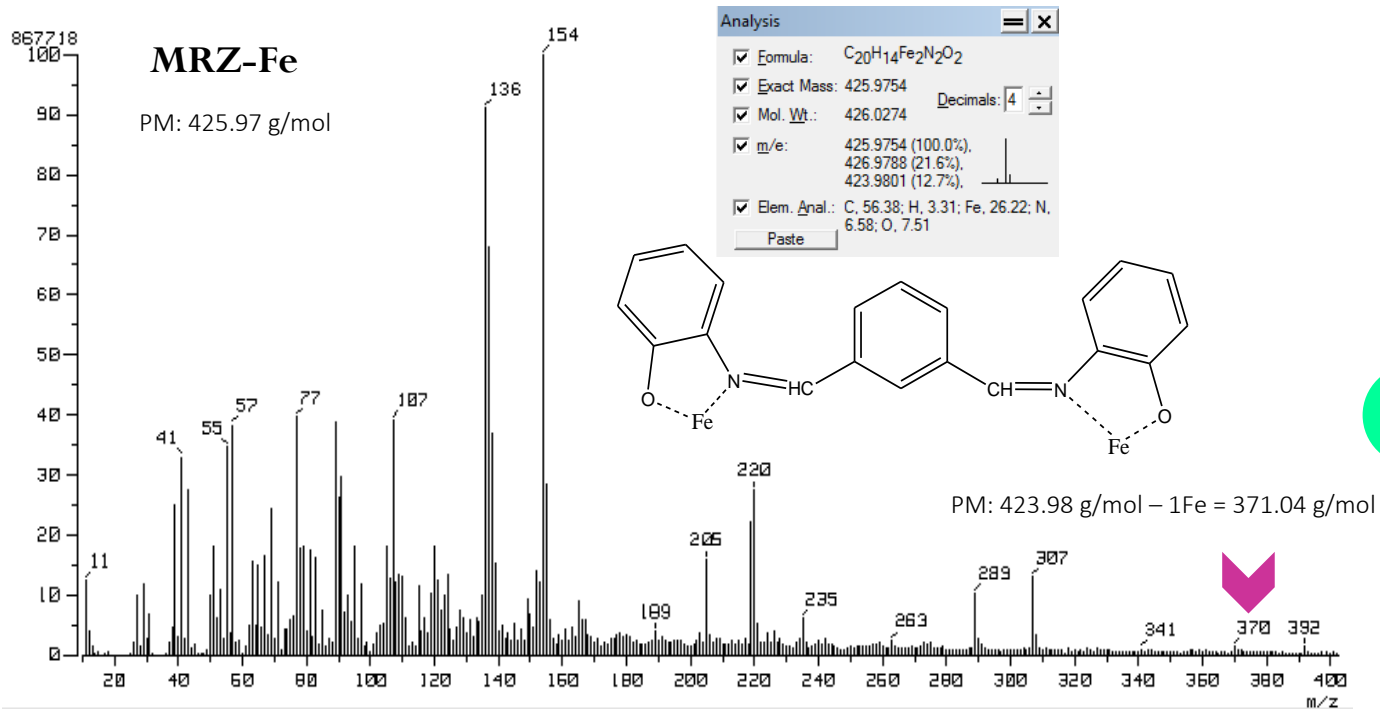


Figura 6. Espectro de masas de MRZ-Cu, FAB<sup>+</sup>.



59

Figura 7. Espectro de masas de MRZ-Fe, FAB<sup>+</sup>.

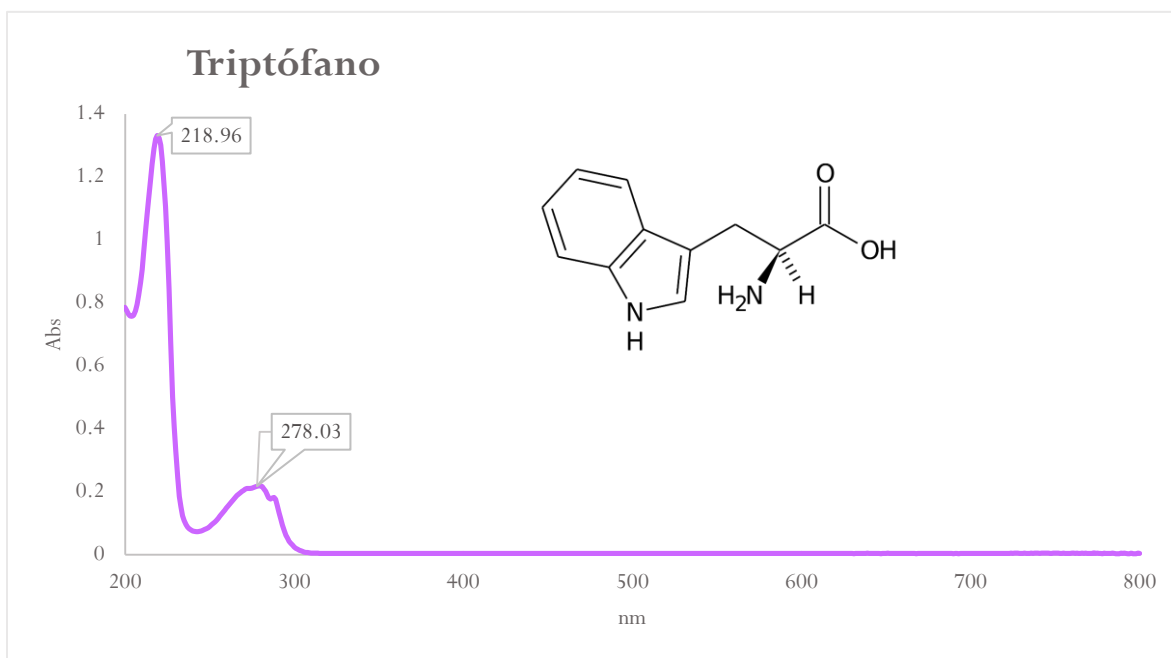


Figura 8. Espectro de UV-Vis de triptófano, EtOH.

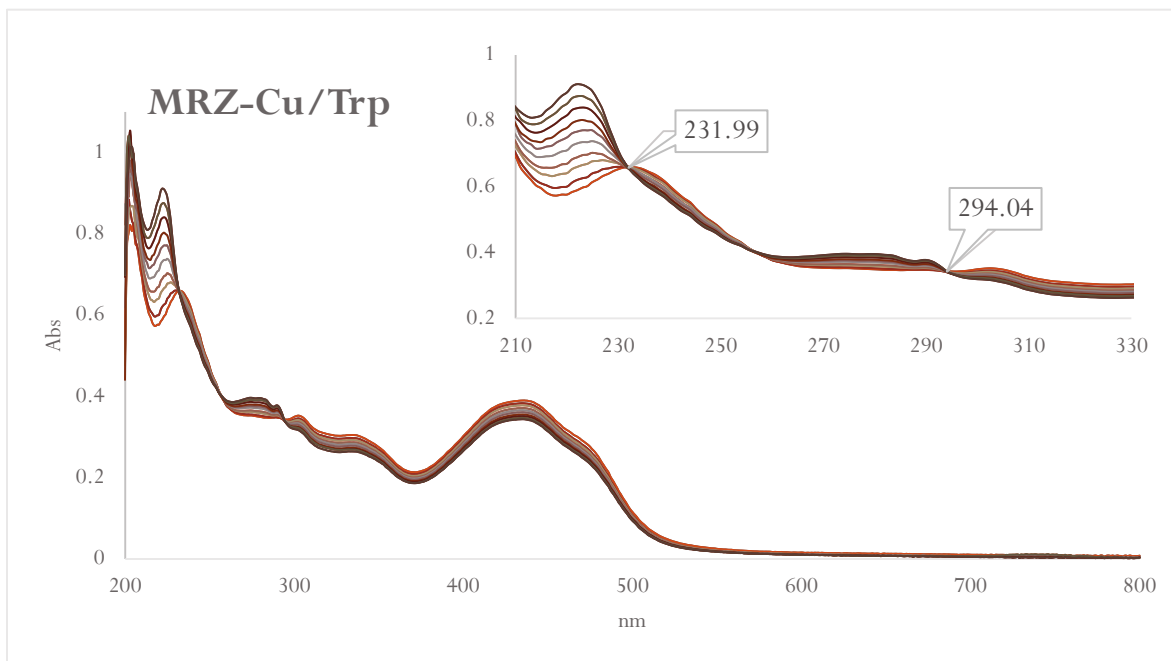


Figura 9. Titulación espectrofotométrica de MRZ-Cu al adicionar Trp, EtOH.

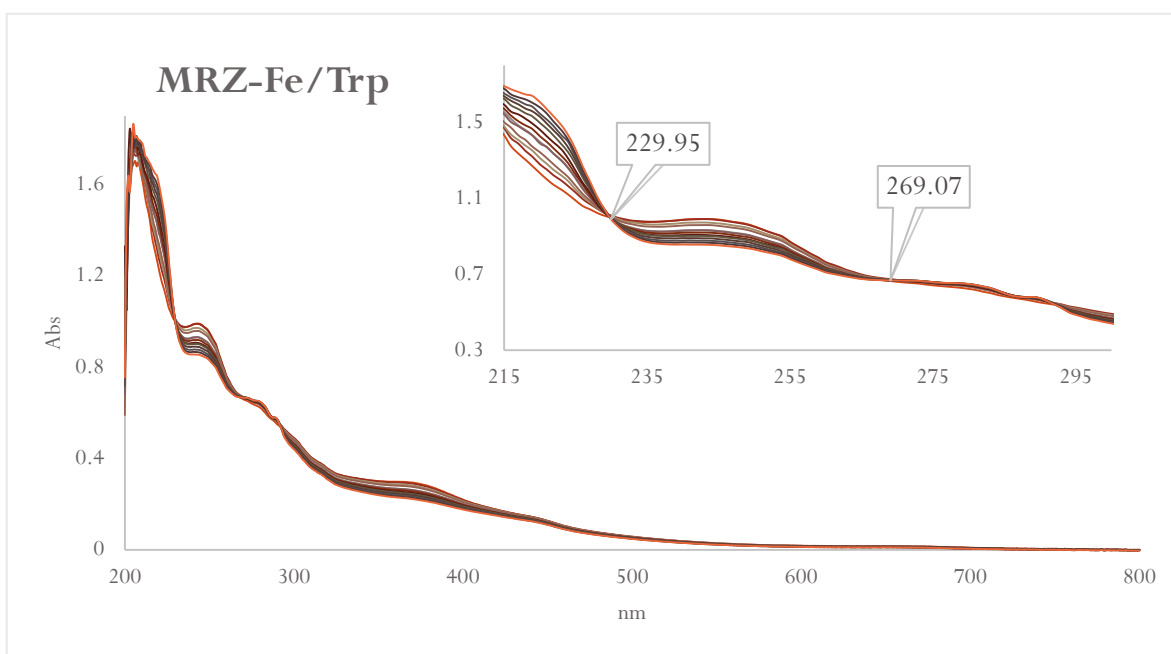


Figura 10. Titulación espectrofotométrica de MRZ-Fe al adicionar Trp, EtOH.