



BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

“SÍNTESIS DE HÍBRIDOS HIDROTALCITA-HEMOGLOBINA”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICA

Presenta:

PAULINA MENDIETA RAMOS

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. GEOLAR FETTER



PUEBLA, PUE.

MARZO 2015

**Facultad de Ciencias
Químicas BUAP**



C.P. JOSÉ JUAN MORALES RODRIGUEZ
DIRECCION DE ADMINISTRACION ESCOLAR
P R E S E N T E

En relacion al oficio de fecha 10 de Marzo de 2015, signado por el Coordinador del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias Químicas, me permito comunicar a Ud. el nombre de los Catedráticos que integran el Jurado de Examen Profesional de la Carrera de QUIMICO que sustentará:

MENDIETA RAMOS PAULINA

JURADO

M.E.C. ALEJANDRA CASTRO LINO
DR. JOSE ANGEL RIVERA ORTEGA
DRA. MARIA ANA PEREZ CRUZ

Examen que se realizará el día 25 de Marzo de 2015, a las 12:00 horas en Auditorio del Centro de Química.

Esperando una respuesta favorable al presente, le reitero mi atenta y distinguida consideracion

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

H. Puebla de Z. a 10 de Marzo de dos mil quince

M.C. JOSE DE GPE. QUIROZ OROPEZA

DIRECTOR



C.c.p. Archivo

*“Miramos continuamente el mundo y eso nubla nuestras percepciones.
Pero visto en perspectiva, como si fuera nuevo, puede aún asombrarnos.
Ven, seca tus ojos, porque eres vida, más misteriosa que un quark e
impredecible más allá de los sueños de Heisenberg, la arcilla en la que las
fuerzas que modelan las cosas dejan sus huellas.”*

Alan Moore

Watchmen

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento:

A mi director de tesis, el Dr. Geolar Fetter por la confianza en mi trabajo, por el tiempo empleado en la dirección de esta tesis, además de su paciencia y orientación.

A Verónica Segura que siempre ha tenido una mano abierta para ayudarme y una sonrisa para esta tesis, así como por todo su apoyo y comprensión en todo este tiempo que hemos pasado juntas.

Al comité revisor de esta tesis:

Dra. María Ana Pérez Cruz

Dr. José Ángel Rivera Ortega

M.C. Alejandra Castro Lino

Por su tiempo, disponibilidad y sugerencias para la mejora de este trabajo.

A Arely y Lucia amigas y compañeras que me han acompañado a lo largo de todo este tiempo en la universidad

Al departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias Químicas y al CUVyTT por todo su apoyo en la realización de ese trabajo.

A Janeth Uribe por ser la responsable de que ahora me encuentre aquí, concluyendo una nueva etapa en mi vida, por su amistad y cariño incondicional.

A MIS PADRES

Por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida, por el amor y el cariño que siempre me han dado, a mis hermanos y en definitiva a todos los que han hecho posible esta tesis de una u otra forma, por acompañarme en todo este tiempo.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado en la realización de esta tesis a través del proyecto CB-2010/154060.

ÍNDICE

RESUMEN	IX
INTRODUCCIÓN	X
JUSTIFICACIÓN	XI
OBJETIVO GENERAL	XII
OBJETIVOS PARTICULARES	XII

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES	9
1.1 La hemoglobina	9
1.1.1 Estructura de la hemoglobina	9
1.2 Las arcillas	12
1.2.1 Estructura de las arcillas	12
1.2.2 Arcillas aniónicas	13
1.2.3 Fórmula general y estructura	13
1.2.4 Propiedades de los cationes	17
1.2.5 Propiedades de los aniones	18
1.2.6 Estabilidad térmica de los compuestos tipo hidrotalcita	19
1.2.7 Métodos de síntesis	19
1.2.8 Adsorción y desorción	22
1.2.9 Aplicaciones	23

CAPÍTULO 2: DESARROLLO EXPERIMENTAL

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	20
2.1 Materiales	20
2.2 Síntesis de hidrotalcitas	21
2.2.1 Hidrotalcitas Mg²⁺/M³⁺ (M³⁺= Al o Fe) con diferente x	21
2.2.2 Síntesis por coprecipitación	22
2.2.3 Síntesis de hidrotalcita MgFe con formamida	22
2.3 Preparación de híbridos hidrotalcita-hemoglobina	22
2.3.1 Obtención de híbridos por el método de coprecipitación	23
2.3.2 Síntesis por coprecipitación con hemoglobina y formamida	23
2.3.3 Síntesis de híbrido hidrotalcita-hemoglobina por delaminación	23
2.3.4 Preparación de híbridos por adsorción	24
2.3.5 Desorción de hemoglobina	25
2.4 Diagramas de flujo	27
2.5 Técnicas de caracterización	33
2.5.1 Difracción de rayos X (DRX)	33
2.5.2 Espectroscopia de Infrarrojo (FT-IR)	33
2.5.3 Fisorción de nitrógeno	33
2.5.4 Espectroscopia ultravioleta visible (UV-vis)	33

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1. Difracción de rayos X	35

3.2 Espectroscopia de infrarrojo	36
3.3 Fisisorción de nitrógeno	39
3.4 Caracterización de los híbridos hidrotalcita-hemoglobina	41
3.4.1 Difracción de rayos X	41
3.4.2 Espectroscopía de infrarrojo	41
3.4.3 Fisisorción de nitrógeno	45
3.4.4 Adsorción-desorción de hemoglobina en hidrotalcitas	48
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	60

RESUMEN

En este trabajo se presenta el estudio de la inmovilización y la estabilidad de hemoglobina sobre compuestos tipo hidrotalcita de diferente composición (Mg/Fe o Mg/Al) variando la relación molar M^{2+}/M^{3+} ($x= 2, 3$ y 4). La inmovilización se llevó a cabo por diferentes métodos de síntesis: coprecipitación, delaminación y adsorción. Además, se estudió la desorción de hemoglobina de los materiales.

Las muestras se analizaron por diferentes técnicas de caracterización como: difracción de rayos X (DRX), para determinar pureza y cristalinidad; espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR), para la identificación de grupos funcionales; espectroscopía de ultravioleta visible (UV-vis), para identificar y determinar la cantidad de hemoglobina adsorbida sobre la hidrotalcita y Fisisorción de nitrógeno para caracterizar propiedades texturales.

Los resultados obtenidos indican que es posible inmovilizar la molécula de hemoglobina por diferentes métodos de síntesis. La síntesis simultánea favorece la formación rápida de núcleos en donde la hemoglobina es retenida. El estudio cinético de adsorción indicó que las muestras de composición MgAl inmovilizan más rápidamente la hemoglobina. Con el análisis de desorción se confirmó que la hemoglobina se mantiene estable en el material aun variando composición y relación metálica molar después de dos meses.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, la actividad superficial y la adsorción de biomacromoléculas tales como proteínas sobre superficies sólidas, han llamado mucho la atención. La adsorción de una proteína sobre una superficie sólida no biológica es un importante fenómeno debido a que desempeña un papel clave en varias aplicaciones biotecnológicas como biocatalizadores o biosensores, implantes artificiales, purificación de proteínas, liberación de fármacos, catálisis y soportes catalíticos. El soporte de proteínas sobre materiales inorgánicos involucra fuerzas de Van der Waals, afinidad hidrofóbica así como puentes de hidrógeno. Consecuentemente las condiciones superficiales pueden inducir a la desnaturalización de la proteína inmovilizada o cambios en su actividad biológica.

Las proteínas son esenciales en el funcionamiento de diversos sistemas. La importancia de las proteínas radica en que son indispensables para la vida. La palabra proteína, deriva del griego *proteios*, que significa “*ser el primero*”. La hemoglobina es una proteína globular con estructura cuaternaria conformada por el grupo hemo el cual confiere la actividad biológica a ésta. Entre las funciones que lleva a cabo se encuentra el transporte de O₂ del aparato respiratorio hacia los tejidos periféricos y del transporte de CO₂ de los tejidos periféricos hasta los pulmones para ser excretado, el cual se liga al átomo de hierro (Fe²⁺) del grupo hemo. Sin embargo, las aplicaciones de esta proteína se ven limitadas debido a que presenta poca estabilidad. La hemoglobina es sensible a la desnaturalización o inactivación si se producen cambios de pH, alteraciones en la concentración, agitación molecular o variaciones extremas de temperatura. Una propuesta para mantener estable a la hemoglobina es inmovilizarla sobre hidrotalcitas debido a su carácter básico y baja toxicidad.

Los compuestos tipo hidrotalcita son un tipo de materiales laminares constituidos por láminas cargadas positivamente y aniones intercambiables, que coexisten junto con moléculas de agua en el espacio interlaminar.

En este trabajo se estudia la inmovilización de hemoglobina sobre compuestos tipo hidrotalcita Mg-Fe y Mg-Al por diferentes procedimientos.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que la hemoglobina es una proteína que puede ligar distintas moléculas en su anillo porfirínico y es altamente inestable, se tiene la necesidad de investigar la inmovilización y estabilidad en materiales tipo hidrotalcita de diferentes composiciones.

OBJETIVO GENERAL

- ✚ Estudiar la inmovilización y la estabilidad de hemoglobina en hidrotalcitas de diferente composición y diferente relación molar.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✚ Sintetizar hidrotalcitas con diferentes composiciones Mg^{2+}/M^{3+} ($M^{3+}= Al$ o Fe) y diferente relación metálica molar Mg^{2+}/M^{3+} $x = 2, 3$ y 4 usando el método de irradiación con microondas.
- ✚ Inmovilizar hemoglobina en las hidrotalcitas por 3 métodos: coprecipitación, delaminación y adsorción.
- ✚ Caracterizar las muestras iniciales y los híbridos hidrotalcita-hemoglobina por diferentes técnicas como: difracción de rayos X (DRX), espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR), espectroscopía de ultravioleta visible (UV-vis) y Fisisorción de nitrógeno.
- ✚ Estudiar la adsorción-desorción de hemoglobina en hidrotalcitas así como su estabilidad

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES

1.1 La hemoglobina

La hemoglobina es una proteína globular que está presente en altas concentraciones en los glóbulos rojos. Se encarga del transporte de O_2 del aparato respiratorio hacia los tejidos periféricos y del transporte de CO_2 y protones (H^+) de los tejidos periféricos hasta los pulmones para ser excretados.

1.1.1 Estructura de la hemoglobina

La hemoglobina es una metaloproteína de estructura cuaternaria y consta de cuatro subunidades: dos subunidades α (141 aminoácidos) y dos subunidades β (146 aminoácidos), Figura 1.1.

La hemoglobina contiene la porfirina de hierro (grupo hemo o protoporfirina IX) como subunidad prostética. El grupo hemo es una molécula plana como se muestra en la Figura 1.2.

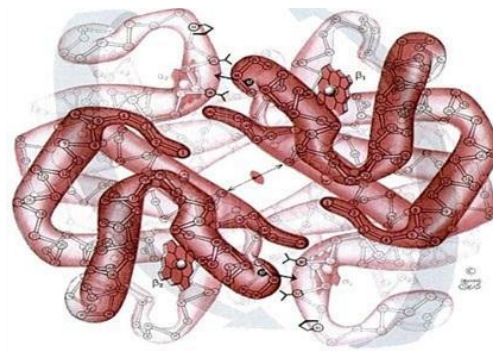


Figura 1.1. Proteína de hemoglobina.

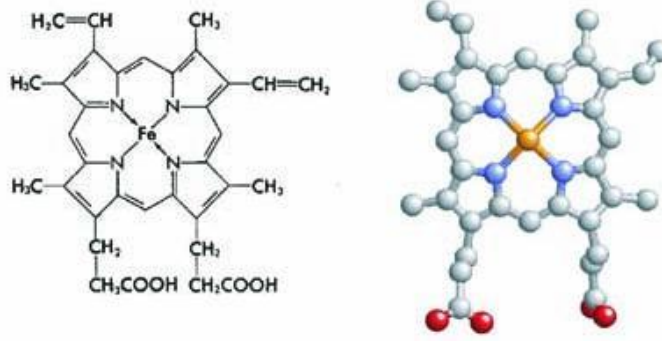


Figura 1.2. Grupo prostético o hemo.

El hierro central es un ion Fe^{2+} , que puede formar 5 o 6 enlaces de coordinación dependiendo de la unión del oxígeno a la Hb (oxiHb, desoxiHb). Cuatro de estos enlaces se producen con los nitrógenos pirrólicos de la porfirina en un plano horizontal. El quinto enlace de coordinación se realiza con el nitrógeno del imidazol de una histidina *proximal*. Finalmente, el sexto enlace del átomo de hierro es con el O_2 , que además está unido a un segundo imidazol de una histidina *distal* (Figura 1.3).

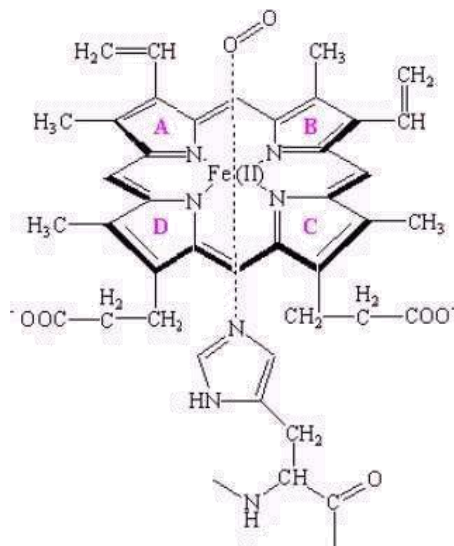


Figura 1.3. Grupo hemo unido a la histidina proximal.

En el espectro de UV-vis la hemoglobina presenta una banda característica de 407 a 410 nm propia de las hemoproteínas (Wang y col., 2008, Pañuela, 2005) y otras cuatro más en el espectro visible correspondientes a los ácidos nucleicos residuales, aminoácidos aromáticos y al oxígeno ligado al grupo hemo, como se observa en la Figura 1.4 (Pañuela, 2005).

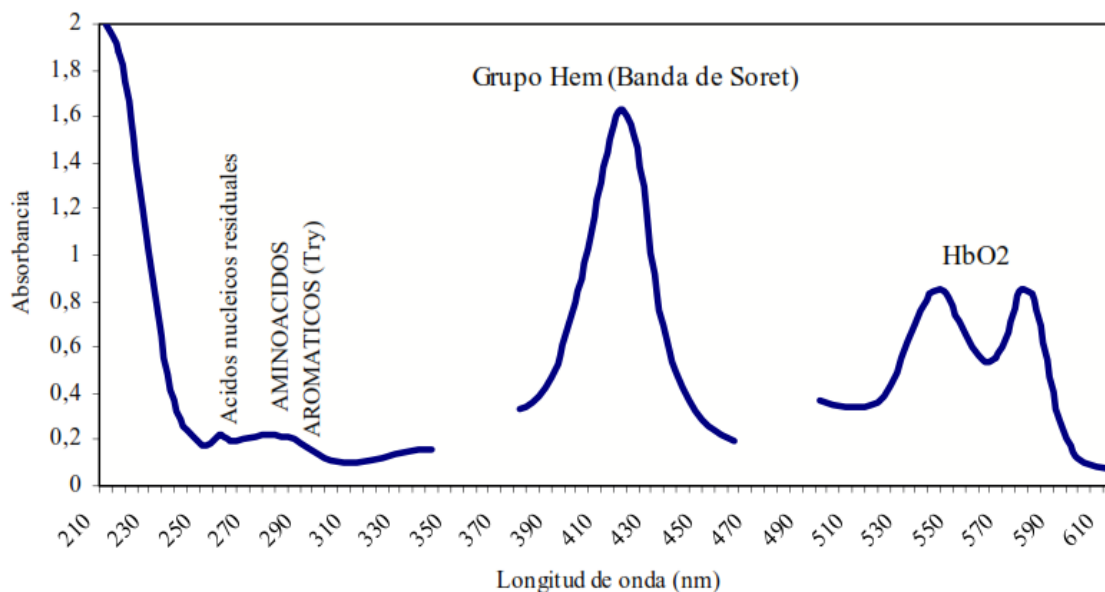


Figura 1.4. Espectro de UV-vis de la hemoglobina.

En la Tabla 1.1 se resumen las propiedades físico-químicas de la hemoglobina, en particular los de la hemoglobina bovina (BHb) que fue utilizada en este trabajo.

La hemoglobina sufre desnaturalización o pérdida de su actividad biológica si se producen cambios de pH, alteraciones en la concentración, agitación molecular o variaciones de temperatura.

Tabla 1.1. Características físico-químicas de la hemoglobina.

Hemoglobina bovina	
Masa molecular (Da)	68000
Radio equivalente (nm)	3.1
Diámetro elipsoidal (nm)	7.5*5.5*5.5
Punto isoeléctrico	7.1
Masa de amino ácidos hidrófobos (g/100 g de proteína)	54.16
Masa de aminoácidos hidrófilicos (g/100 g de proteína)	43.13

1.2 Las arcillas

1.2.1 Estructura de las arcillas

Las arcillas se definen como minerales inorgánicos con tamaños de partícula igual o menor a 2 μm (Martínez y col., 2012). Las arcillas pertenecen al grupo de los filosilicatos, los cuales, tienen estructuras en forma de hojuelas formadas por láminas apiladas una encima de la otra. Dichas láminas están constituidas por unidades de silicio y aluminio de coordinación tetraédrica y octaédrica respectivamente; sin embargo, por sustituciones isomórficas dichas unidades pueden cambiar de composición (Rivera y col., 2007).

De acuerdo con su estructura y su composición las láminas tienen carga positiva o negativa. Por lo tanto las arcillas se subdividen en dos grupos principalmente, *catiónicas* y *aniónicas* (Rivera, 2007). Las *arcillas catiónicas* son muy comunes en la naturaleza y están formadas por láminas de aluminosilicatos con carga negativa, generada por la sustitución isomórfica de iones metálicos de menor valencia, la cual se compensa con la presencia de cationes en el espacio interlaminar; mientras que las *arcillas aniónicas* son poco frecuentes en la naturaleza y poseen exceso de carga positiva, generada en la red cristalina por la sustitución de iones metálicos de mayor valencia estas hidrotalcitas están compensadas por aniones en la región laminar (Vaccari, 1998).

La estructura de una hidrotalcita es similar a la brucita, $Mg(OH)_2$; cada ion Mg^{2+} está rodeado por seis iones OH^- y los diferentes octaedros comparten aristas para formar láminas infinitas Figura 1.5. Las láminas están apiladas unas encima de otras, unidas por moléculas de agua a través de puentes de hidrógeno.

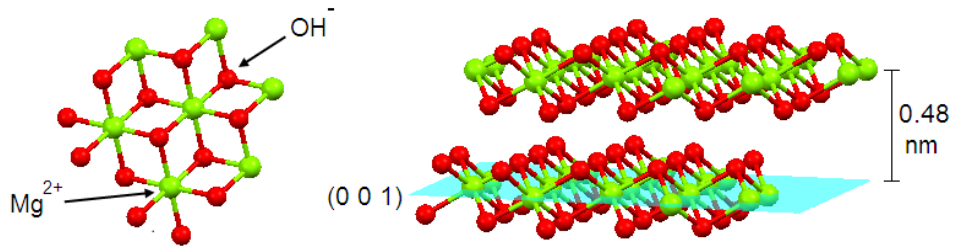


Figura 1.5. Lámina de brucita.

Si algunos iones Mg^{2+} son reemplazados isomórficamente por cationes de mayor carga, pero radio similar, las láminas tipo brucita quedarán cargadas positivamente. La neutralidad del compuesto se obtiene con la distribución de aniones entre las láminas hidroxiladas, junto con moléculas de agua, siendo la densidad de carga positiva de las láminas proporcional a la relación $x = M^{3+} / (M^{2+} + M^{3+})$. El anión interlaminar puede intercambiarse por otro en medio acuoso u orgánico. En la Figura 1.6 se muestra la representación estructural de una hidrotalcita.

Las características estructurales de las hidrotalcitas están determinadas por la naturaleza de los cationes en las láminas tipo brucita, la posición de los aniones y las moléculas de agua en la región interlaminar, y por el tipo de empaquetamiento que presentan las láminas.

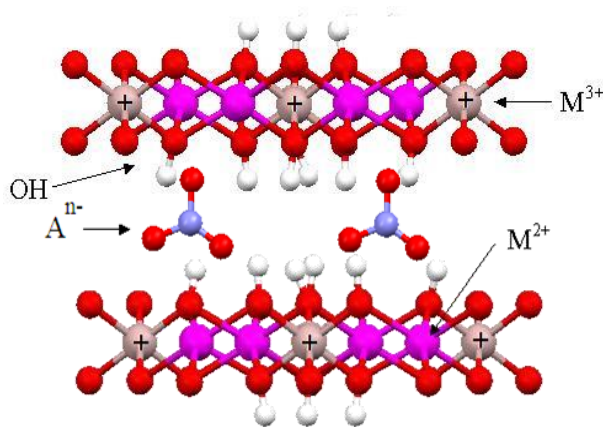


Figura 1.6. Representación estructural de una hidrotalcita.

Las capas tipo brucita de las Ht's pueden ordenarse unas sobre otras con dos simetrías diferentes, pudiendo ser de simetría romboédrica o hexagonal, dependiendo básicamente de la composición de la capa tipo brucita y del método de preparación (Cavani y col., 1991).

Estos tipos de simetrías pueden distinguirse mediante difracción de rayos X. Si se asignan como A, B y C a los ejes cartesianos que forman los grupos OH^- en la capa tipo brucita, se tiene para la simetría romboédrica la siguiente secuencia de planos: BC-CA-AB-BC. En este caso la celda unitaria formada está compuesta por 3 capas tipo brucita con sus respectivos espaciamentos interlaminares. Para la simetría hexagonal la secuencia de planos es: BC-CB-BC teniendo como consecuencia que en este caso el parámetro c de la celda unitaria formada se integre por 2 capas tipo brucita con sus respectivos espaciamentos interlaminares.

En las Figuras 1.7 y 1.8 se indica la secuencia de planos correspondientes a la simetría romboédrica y hexagonal. Se observa en el caso de la simetría romboédrica que el valor del parámetro c de la celda unitaria formada corresponde a 3 veces la distancia interlaminar (d) de las capas tipo brucita. En el caso de la simetría hexagonal el valor del parámetro c de la celda unitaria formada, corresponden a 2 veces la distancia interlaminar (d) de las capas tipo brucita (Rives, 2002). Se sabe además que en este tipo de celdas unitarias, los parámetros a y b son prácticamente constantes debido a que están relacionados con la composición de la

capa tipo brucita y c varía según la naturaleza de los aniones intercambiados. Cabe mencionar que la simetría romboédrica es la más común.

En la Tabla 1.2 se puede apreciar el valor de los parámetros de red a y c , así como el tipo de simetría de diferentes hidrotalcitas naturales, en algunas especies sintetizadas a altas temperaturas la simetría de red es hexagonal (Trifiro y Vacari, 1996).

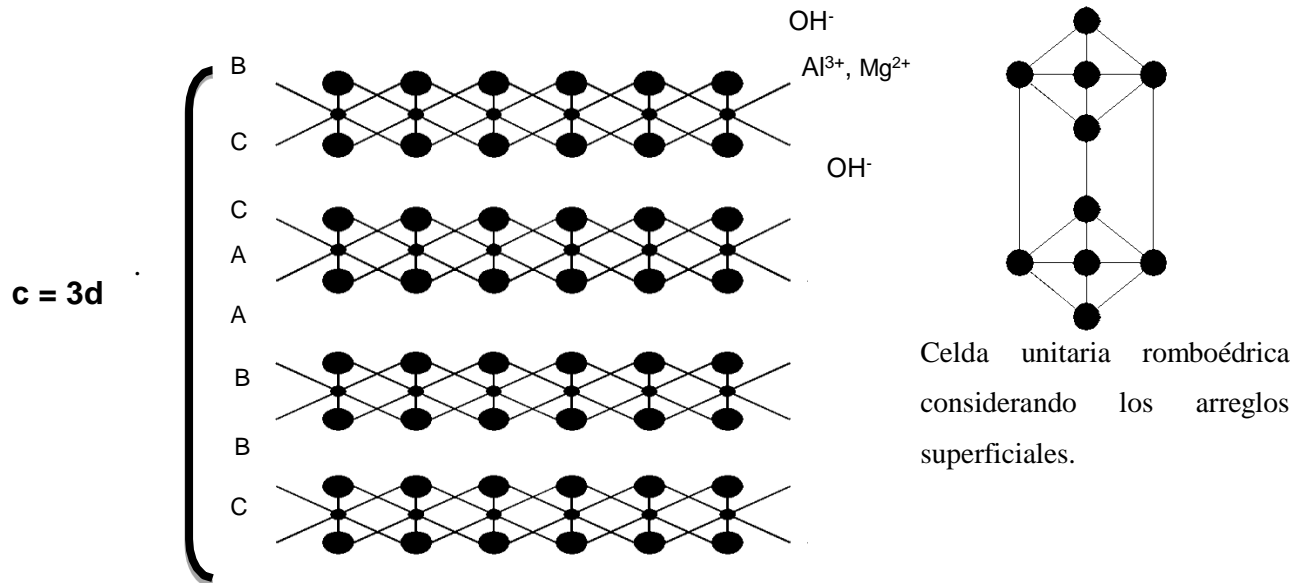


Figura 1.7. Representación de la hidrotalcita con simetría romboédrica.

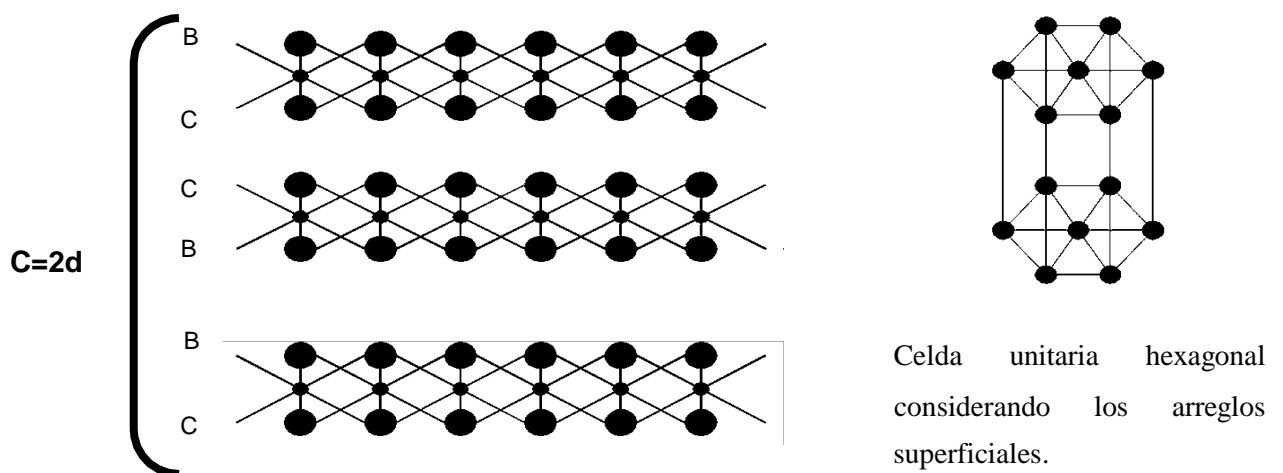


Figura 1.8. Representación de la hidrotalcita con simetría hexagonal.

Tabla 1.2. Parámetros de red de compuestos tipo hidrotalcita.

<i>Nombre</i>	Fórmula química	Parámetro de celda unitaria <i>a</i> (Å)	Parámetro de celda unitaria <i>c</i> (Å)	Simetría
Hidrotalcita	$\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.054	22.81	Romboédrica
Manacita	$\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.100	15.60	Hexagonal
Piroaurita	$\text{Mg}_6\text{Fe}_2(\text{OH})_{16}\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.109	23.41	Romboédrica
Siogrenita	$\text{Mg}_6\text{Fe}_2(\text{OH})_{16}\text{CO}_3 \cdot 4.5\text{H}_2\text{O}$	3.113	15.61	Hexagonal
Tacovita	$\text{Ni}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.325	22.59	Romboédrica
Meixnerita	$\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.046	22.92	Romboédrica

1.2.4 Propiedades de los cationes

La estructura de las hidrotalcitas permite modificar un gran número de variables, tales como la naturaleza y relación molar entre cationes, tipo de aniones en la interlaminar, cantidad de agua interlaminar, morfología y tamaño de cristales.

Los metales divalentes y trivalentes que aparecen en la hoja octaédrica de la hidrotalcita son principalmente los del tercer y cuarto periodo del Sistema Periódico, como se muestra en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3 Radios iónicos de algunos cationes (Å).

M^{2+}	Mg	Cu	Ni	Co	Zn	Fe
	0.65	0.69	0.72	0.74	0.74	0.76
M^{3+}	Al	Ni	Co	Fe	Mn	Cr
	0.54	0.62	0.63	0.64	0.66	0.69

1.2.5 Propiedades de los aniones

En cuanto al tipo de aniones, en principio no hay límite respecto a la naturaleza de los mismos, el único requerimiento es que no formen complejos con los cationes presentes. Sin embargo, puede haber problemas en la preparación de compuestos con aniones diferentes al carbonato, debido a la dificultad de eliminar completamente el CO_2 , presente en las soluciones acuosas y en la atmósfera.

Durante la formación de la estructura laminar o bien por intercambio aniónico posterior, se puede situar entre las láminas una gran variedad de especies aniónicas. Estos aniones pueden ser:

- ✚ Aniones inorgánicos (Rives y col., 1999): F^- , Cl^- , Br^- , I^- , $(ClO_4)^-$, $(NO_3)^-$, $(OH)^-$, $(SO_4)^{2-}$, $(CrO_4)^{2-}$, $[Fe(CN)_6]^{3-}$, $[Fe(CN)_6]^{4-}$, $[PdCl_4]^{2-}$.
- ✚ Oxoaniones no metálicos: $(BO_3)^{3-}$, $(CO_3)^{2-}$, $(NO_3)^-$, etc.
- ✚ Polímeros aniónicos (Challier y col., 1994, Oriachi y col., 1996): poli(vinilsulfonato), polianilina, poli(etilen glicol), poli(acrilato).
- ✚ Aniones orgánicos (Carlino, 1997, Prevot y col., 2001): carboxilatos, fosfonatos, alquil sulfatos, gliceratos, tintes orgánicos, oxalatos, malonato.
- ✚ Aniones bioquímicos (Choy y col., 2000, Aisawa y col., 2006): aminoácidos, ADN, ATP, proteínas.
- ✚ Ligantes macrocíclicos y sus complejos metálicos (Xiong y col., 2002): Derivados de porfirina y ftalocianinas.

Se han estudiado las propiedades de retención aniónica de los compuestos tipo hidrotalcitas y se ha comprobado que existe una fuerte dependencia entre la distancia interlaminar, el tamaño y la carga de los aniones intercalados. La capacidad de intercambio, por lo tanto depende, de las interacciones electrostáticas entre la carga positiva de la lámina y la del anión intercambiado.

1.2.6 Estabilidad térmica de los compuestos tipo hidrotalcita

La temperatura de calcinación tiene un efecto muy importante sobre las hidrotalcitas provocando diversos cambios en sus propiedades físico-químicas (Canavi y col., 1991). Los estados de transformación de las hidrotalcitas al someterse a un tratamiento térmico son los siguientes (Mascolo y Marino, 1980):

- a. A temperaturas menores de 150 °C se expulsan las moléculas de agua interlaminar sin alterar la estructura laminar;
- b. Entre 275 y 450 °C, tiene lugar la deshidroxilación de las láminas y la descomposición del carbonato, que trae consigo el colapso del arreglo laminar;
- c. Entre 450 y 600 °C se forma una solución sólida de Mg(Al)O y
- d. A temperaturas superiores a 600 °C se produce MgO libre y la espinela $MgAl_2O_4$.

Una de las propiedades más interesantes que presentan los materiales con estructura de hidrotalcita es que después de someterse a calcinación pueden recuperar su estructura original al ponerse en contacto con disoluciones que contienen el anión inicial u otro diferente así como en fase gaseosa y condiciones ambientales (Canavi y col., 1991). A este proceso se le conoce como “efecto memoria”.

1.2.7 Métodos de síntesis

Las hidrotalcitas se pueden preparar empleando diferentes métodos de síntesis, como pueden ser:

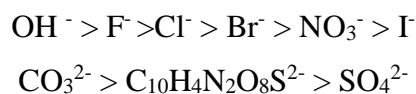
a) Coprecipitación o precipitación a pH constante

Está basado en la adición lenta de una solución de sales de cationes divalentes y trivalentes a un reactor que contiene agua o una disolución del anión que se desee incorporar. Una segunda disolución (disolución alcalina) se añade al reactor para mantener el pH a un determinado valor que permita la precipitación simultánea de los hidróxidos a partir de las dos sales metálicas.

Esta ruta sintética es a menudo el método de elección para la preparación de aniones orgánicos que son difíciles de obtener por otra vía (Cavani y col., 1991).

b) Intercambio aniónico

La estructura laminar de los compuestos tipo hidrotalcita permite el apilamiento de las láminas positivas reteniendo especies en su interior, siendo muy fácil la difusión de aniones. Miyata ha propuesto la siguiente secuencia de selectividad de iones monovalentes y divalentes (Miyata, 1983).



Las selectividades de los iones divalentes resultan mayores que las de los monovalentes. De acuerdo a esto, las hidrotalcitas que contienen nitrato y cloruro son los mejores precursores para las reacciones de intercambio.

Las reacciones de intercambio se llevan a cabo por agitación de una suspensión de hidrotalcita en presencia de un exceso de sal del anión que se desea introducir. Un factor importante es el pH de intercambio, ya que además de favorecer el intercambio, no debe de afectar el material laminar de partida ni su naturaleza del anión que va a ser intercalado.

c) Reconstrucción estructural o efecto memoria

La obtención de estos materiales utilizando este método está basada en el denominado efecto memoria de los materiales tipo hidrotalcita, que les permite, tras haber sido sometidos a calcinación, regenerar la estructura, cuando se les pone en un medio adecuad (Erickson y

col., 2005). Así, cuando el producto de calcinación a 530 °C de la hidrotalcita se pone en disolución básica, se regenera complemente la estructura laminar (Yamaoka y col., 1989), incluso cuando el material se mantiene en contacto con la atmósfera por espacio de tiempo prolongado obteniendo compuestos tipo hidrotalcita (Chibwe y col., 1989). Este método se emplea cuando se desea intercalar moléculas grandes.

El efecto memoria se reduce, con el aumento de la temperatura de calcinación ya que provoca la difusión en el estado sólido de cationes divalentes en posiciones tetraédricas, dando como resultado la formación progresiva de espinela.

d) Sol-gel

Este procedimiento consiste en la formación de redes o cadenas de átomos que se forman por la dispersión de alcóxidos metálicos de Al^{3+} y Mg^{2+} en un líquido (sol), para formar una fase en la cual se obtienen un líquido disperso en un sólido (gel) que se somete a un tratamiento térmico por varias horas, obteniendo compuestos cristalinos (López y col., 1996).

e) Irradiación con microondas

Con este procedimiento se obtienen hidrotalcitas de buena cristalinidad y tamaño. Tiene la ventaja de disminuir los tiempos de reacción entre 5 y 10 minutos (Fetter y col., 2001; Tichit y col., 2002; Rivera y col., 2007) para conseguir la cristalización, mientras que por otros métodos se requiere tiempos de reacción de aproximadamente 20 horas o más (Cavani y col., 1991, Zhao y col., 2002).

f) Delaminación

Debido a la carga positiva de la capa, la exfoliación de Ht's produce suspensiones coloidales de nanoláminas cargadas positivamente. La delaminación de Ht's se puede realizar usando diferentes técnicas de intercalación con disolventes. La ruta más conocida es la exfoliación con formamida utilizando ultrasonido o agitación mecánica. También se ha informado de exfoliación con otros disolventes tales como butanol, acrilatos, y tolueno (Wener y col., 2013).

Cualquier material candidato para la exfoliación debe tener la capacidad de intercambiar sus especies de capa intermedia por otros en solución, el aumento en el espacio basal debilita la atracción electrostática entre las capas haciéndolas susceptibles a la cizalladura originando un intercambio de aniones, dando origen a la exfoliación (Manohara y col., 2010). La delaminación en hojas o en paquetes individuales ha facilitado el uso de sólidos laminares como precursores en la producción de nanocompuestos.

1.2.8 Adsorción y desorción

La adsorción es un proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de un material. El resultado es la formación de una película líquida o gaseosa en la superficie del cuerpo sólido o líquido.

La desorción es el fenómeno por el que una molécula adsorbida en la superficie de un sólido, se desprende de la superficie y vuelve al seno del fluido. En algunos casos la adsorción es un fenómeno perfectamente reversible y las moléculas sufren una desorción en condiciones exactamente iguales a la adsorción previa.

La adsorción de proteínas en materiales laminares, tiene importantes aplicaciones en los ecosistemas de suelos, fármacos, bioquímica, etc. Los mecanismos de interacción sugieren un intercambio iónico, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas, puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals (Hua y col., 2013).

1.2.9 Aplicaciones

Las arcillas aniónicas, como tales o, especialmente, después de su descomposición térmica, presentan muchas aplicaciones industriales.

Los compuestos tipo hidrotalcita encuentran aplicaciones como intercambiadores de aniones y adsorbentes (Miyata, 1983, Reichle, 1986, Das y col., 2004), ya que presentan una mayor capacidad de intercambio que las resinas tradicionales además de una mayor resistencia al calentamiento.

El llamado “efecto memoria” hace que estos compuestos sean especialmente interesantes debido a su reciclabilidad. Así, la hidrotalcita intercalada con la especie contaminante se calcina a 500 o 600 °C, liberándose la especie contaminante. Posteriormente, el tratamiento del óxido formado con una suspensión de agua permite la recuperación de la estructura laminar tipo hidrotalcita, y con ello sus propiedades como adsorbente (Ulibarri y col., 1995).

Las hidrotalcitas como adsorbentes se han empleado en la eliminación de arseniato, cromato, selenito o vanadato en aguas residuales (Zhang y col., 2003, Carriazo y col., 2007), así como contaminantes orgánicos, como los fenoles, etc., (Hermosin y col., 1993, Klumpp y col., 2003).

Las hidrotalcitas se emplean en catálisis heterogénea, ya sea como catalizadores, precursores o como soporte de catalizadores. Teniendo importancia en procesos como reacciones de polimerización de olefinas (Cavani y col., 1991).

También son una alternativa interesante en reacciones de hidrogenación, mediante la utilización de metales de transición en forma de óxidos mixtos. Entre los procesos catalizados se encuentran la hidrogenación del acetileno (Monzón y col., 1999), de nitrilos (Medina y col., 1997), nitrocompuestos (Auer y col., 1999), y de grupos carbonilo (Castignoli y col., 1995).

Los compuestos tipo hidrotalcita calcinados también se han utilizado como soporte de metales nobles, tales como paladio o platino, para la conversión de *n*-hexano en hidrocarburos aromáticos (Gandao y col., 1996, Palomares y col., 2003).

Este tipo de compuestos también encuentran numerosas aplicaciones en medicina: se han utilizado como antiácidos, contra la anemia, como soportes de fármacos, etc.

Los compuestos tipo hidrotalcita también presentan otras aplicaciones en diversos sectores de la actividad humana. Una de las aplicaciones de mayor repercusión industrial es su uso como componente en los materiales de PVC, lo que hace que se mantenga la fuerza y blancura del PVC durante más tiempo (Wang, X., Zhang, Q., 2004, Kaluskova y col., 2004).

Otra aplicación muy interesante es su uso como retardante de la combustión y aislante de cables con cierta resistencia al calentamiento (Camino y col., 2001).

Los distintos cationes o aniones presentes en su estructura proporcionan la capacidad de absorber radiación infrarroja o ultravioleta, característica que ha sido aprovechada para la fabricación de películas protectoras usadas en agricultura (Zhao y col., 2002), en la preparación de protectores solares (He y col., 2004), bolsas para alimentos, etc., (Watanabe y col., 1997).

Debido a su capacidad de liberar de forma controlada los aniones interlaminares mediante procesos de intercambio, se han utilizado en fertilizantes para la liberación controlada de nitratos (Komarneni y col., 2003), en la obtención de tintes utilizados en procesos de teñido lento (Hussein y col., 2004).

CAPÍTULO 2

DESARROLLO EXPERIMENTAL

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Materiales

En la Tabla 2.1 se presentan las características de los reactivos empleados en la síntesis de los materiales.

Tabla 2.1 Propiedades de los reactivos utilizados en la síntesis de muestras.

Nombre de reactivo	Fórmula	Peso molecular g/mol	Marca	% Pureza
Nitrato de aluminio nonahidratado	$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	375.14	Sigma -Aldrich	98
Nitrato de magnesio hexahidratado	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	256.41	Sigma -Aldrich	99
Nitrato de hierro nonahidratato	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	404.00	Sigma-Aldrich	98
Hidróxido de sodio	NaOH	40.00	Merck	99
Hemoglobina de bovino	-----	-----	Aldrich	-----
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	136.09	Monterrey	99.5
Fosfato de potasio Dibásico	K_2HPO_4	174.18	Monterrey	99
Formamida	CH_3NO	45.04	Sigma-Aldrich	99.5
Agua descarbonatada y desionizada	----	-----	-----	-----

2.2 Síntesis de hidrotalcitas

En la Tabla 2.2 se especifican las condiciones de síntesis de las hidrotalcitas.

Tabla 2.2. Condiciones de síntesis de hidrotalcitas por irradiación con microondas.

Clave	Composición	Relación molar	pH síntesis	Condiciones de síntesis			T (°C) de secado
				T (°C)	t (min)	Potencia (W)	
MgFe	Mg/Fe	3:1	10	80	10	200	60
S-MgFe-F							
MgFe 4		4:1					
MgFe 3		3:1					
MgFe 2		2:1					
MgAl 4	Mg/Al	4:1	10	80	10	200	70
MgAl 3		3:1					
MgAl 2		2:1					

2.2.1 Hidrotalcitas Mg²⁺/M³⁺ (M³⁺= Al o Fe) con diferente x

La síntesis de las hidrotalcitas iniciales de diferente composición Mg²⁺/M^{III} (M^{III} = Al o Fe) y diferente relación metálica molar (x = 2, 3 y 4), fueron preparadas por el método de coprecipitación. Las disoluciones de nitratos de un par de metales a una concentración 2.5 M (Mg/Al o Mg/Fe) se precipitaron gota a gota en 50 mL de agua desionizada bajo agitación vigorosa, a pH constante de 10 controlado por una solución de NaOH 2 M. Las muestras obtenidas se envejecieron por irradiación con microondas (MIC-I, Sistemas y Equipos de Vidrio S.A. de C.V) por 10 minutos a 80 °C, operando a 2.5 GHz y a una potencia de 200 W. Los sólidos fueron recuperados después de varios lavados (250 mL de agua por gramo de muestra) y secados. Las muestras MgFe de diferente relación molar se secaron a 60 °C por 24 horas, mientras las muestras MgAl se secaron a 70 °C, las muestras MgFe 4, MgFe 3, MgFe 2, MgAl 4, MgAl 3 y MgAl 2.

2.2.2 Síntesis por coprecipitación

Se sintetizó 5 g de hidrotalcita MgFe 3:1, bajo atmósfera de nitrógeno, las sales de Mg/Fe de concentración 2.5 M se coprecipitaron sobre 20 mL de agua descarbonatada bajo agitación vigorosa, a pH constante de 10 controlado por una solución de NaOH 2M. La muestra obtenida se envejeció por irradiación con microondas con las mismas condiciones previamente descritas. Los sólidos fueron lavados con agua descarbonatada y centrifugados (1500 rpm por 10 min), recuperados y secados a 60 °C por 24 horas, muestra MgFe.

2.2.3 Síntesis de hidrotalcita MgFe con formamida

Se realizó la síntesis simultánea de 5 g de hidrotalcita MgFe 3:1 con formamida. Las disoluciones de nitratos Mg/Fe de concentración 2.5 M y 6 mL de formamida se precipitaron gota a gota en 20 mL de agua descarbonatada bajo agitación vigorosa, a pH constante de 10 controlado por una solución de NaOH 2 M. Las muestras obtenidas se envejecieron por irradiación con microondas por 10 minutos a 80 °C y a una potencia de 200 W, los sólidos fueron recuperados por varios lavados con agua descarbonatada y centrifugación (1500 rpm por 10 min) y secados a 60 °C por 24 horas, muestra S-MgFe-F.

NOTA: La descarbonatación del agua se llevó a cabo por ebullición de agua desionizada para expulsar el CO₂ disuelto y posterior enfriamiento con burbujeo de gas N₂ (Manohara y col. 2012).

2.3 Preparación de híbridos hidrotalcita-hemoglobina

Para la obtención de híbridos se emplearon tres diferentes procedimientos: por coprecipitación, por delaminación y por adsorción. Para el método de coprecipitación y delaminación se emplearon las muestras de MgFe y para la adsorción de hemoglobina se utilizaron muestras de MgFe y MgAl.

2.3.1 Obtención de híbridos por el método de coprecipitación

Se realizó la síntesis simultánea de 5 g de hidrotalcita MgFe 3:1 con hemoglobina bovina (BHb) bajo atmósfera de nitrógeno. Se pesaron 7.29 g de hemoglobina y se disolvieron en 224 mL de agua descarbonatada a una concentración 0.05 M. Sobre esta se precipitaron las sales de MgFe bajo agitación vigorosa, a pH constante de 10 controlado por una solución de NaOH 2M. La muestra obtenida se envejeció por irradiación con microondas por 10 minutos a 40 °C y a una potencia de 200 W. Los sólidos fueron recuperados después de varios lavados con agua descarbonatada, centrifugados (1500 rpm por 10 min) y secados a 60 °C por 24 horas, muestra S-MgFe-BHb.

2.3.2 Síntesis por coprecipitación con hemoglobina y formamida

Se realizó la síntesis de 2 g de una hidrotalcita MgFe 3:1 con formamida y hemoglobina. Se pesaron 1.60 g de hemoglobina y se disolvieron en 49.41 mL de agua descarbonatada obteniendo una concentración de 0.05 M, sobre esta se precipitaron las sales de Mg/Fe de concentración 2.5 M y 2.5 mL de formamida bajo agitación vigorosa, a pH constante de 10 controlado por una solución de NaOH 2M. Las muestras obtenidas se envejecieron por irradiación con microondas por 10 minutos a 40 °C y a una potencia de 200 W. Los sólidos fueron recuperados después de varios lavados con agua descarbonatada centrifugados (1500 rpm por 10 min) y secados a 60 °C por 24 horas, muestra S-MgFe-F-BHb.

2.3.3 Síntesis de híbrido hidrotalcita-hemoglobina por delaminación

Se pesó 1 g de la muestra de MgFe y se esparció sobre 300 mL de formamida teniendo un pH de 10.03, se dejó en agitación por 24 horas en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, hasta formar una solución coloidal sobre esta se precipitó una solución de hemoglobina 0.05 M (1.007 g BHb en 31 mL de agua descarbonatada) gota a gota con agitación teniendo un pH de 9.61, posteriormente se quitó la agitación y se dejó por 48 horas en reposo bajo atmósfera de nitrógeno los sólidos se recuperaron por centrifugación a 1500 rpm por 30 minutos posteriormente se le realizaron varios lavados con agua descarbonatada centrifugados (1500 rpm por 10 min) y secado a 60 °C por 24 horas, muestra D-MgFe-BHb.

2.3.4 Preparación de híbridos por adsorción

La adsorción de hemoglobina sobre hidrotalcitas se realizó por el método batch a temperatura ambiente, 1 g de hidrotalcita (Mg^{2+}/Fe^{3+} o Al^{3+} de $x=2, 3$ y 4 .) se activó en una estufa a $150\text{ }^{\circ}C$ por 24 horas, pasado ese tiempo se retiró de la estufa y se pesó nuevamente para determinar el porcentaje de pérdida de agua (10 % aprox. del peso de la muestras). La muestra obtenida se puso en contacto con 15 mL de una solución buffer de fosfato (0.05 M, pH 7.1) conteniendo hemoglobina a una concentración de 0.1449 mg/mL. La mezcla se mantuvo en agitación por 100 min, tiempo en el cual se alcanzó el equilibrio. La concentración inicial y de equilibrio de la hemoglobina se midió en un espectrofotómetro de UV-vis (Perkin Elmer Lambda 35) a 405.6 nm (Banda de Soret). La cantidad de hemoglobina adsorbida (q_e) sobre las partículas de hidrotalcita fue calculada por la ecuación:

$$m = \frac{C_i - C_e}{C_e} V \quad (2)$$

Donde q_e y C_e son las concentraciones de la hemoglobina en la solución inicial y sobrenadante, respectivamente (mg/mL); V el volumen de la suspensión (mL); y m la cantidad del adsorbente (mg). Las muestras se recuperaron por sedimentación, se retiró el sobrenadante y secaron a $40\text{ }^{\circ}C$ por 24 horas.

En la Tabla 2.3 se resumen las condiciones de síntesis de todas las muestras de hidrotalcita-hemoglobina sintetizadas.

Tabla 2.3 Condiciones de síntesis híbridos hidrotalcita-hemoglobina.

Muestra	Composición	Relación molar	Síntesis	Condiciones de síntesis			
				pH	T (°C)	t (min)	Potencia (W)
S-MgFe-BHb	Mg/Fe	3:1	coprecipitación	10	40	10	200
S-MgFe-F-BHb							
D-MgFe-BHb							
ads-MgFe 4/BHb		4:1	Adsorción				
ads-MgFe 3/BHb		3:1					
ads-MgFe 2/BHb		2:1					
ads-MgAl 4/BHb		Mg/Al					
ads-MgAl 3/BHb	3:1						
ads-MgAl 2/BHb	2:1						

2.3.5 Desorción de hemoglobina

Para la desorción de hemoglobina bovina se pesaron 0.025 g de cada muestra de hidrotalcita-hemoglobina, se pusieron en contacto con 5 mL de solución buffer de fosfato en agitación. El sobrenadante fue analizado por espectroscopia UV-vis a 405.6 nm para determinar la cantidad de hemoglobina.

La desorción (%) se calculó empleando la siguiente ecuación (Sreenivasan y col., 2013):

$$\text{Desorción } (\%) = \frac{M_d}{M_a} \times 100 \quad (3)$$

Donde M_d (mg/mg) cantidad de hemoglobina desorbida y M_a (mg/mg) cantidad de hemoglobina adsorbida sobre la hidrotalcita.

2.4 Diagramas de flujo

En las Figuras 2.1 a la 2.6 se representan los diagramas de flujo de síntesis de los materiales obtenidos.

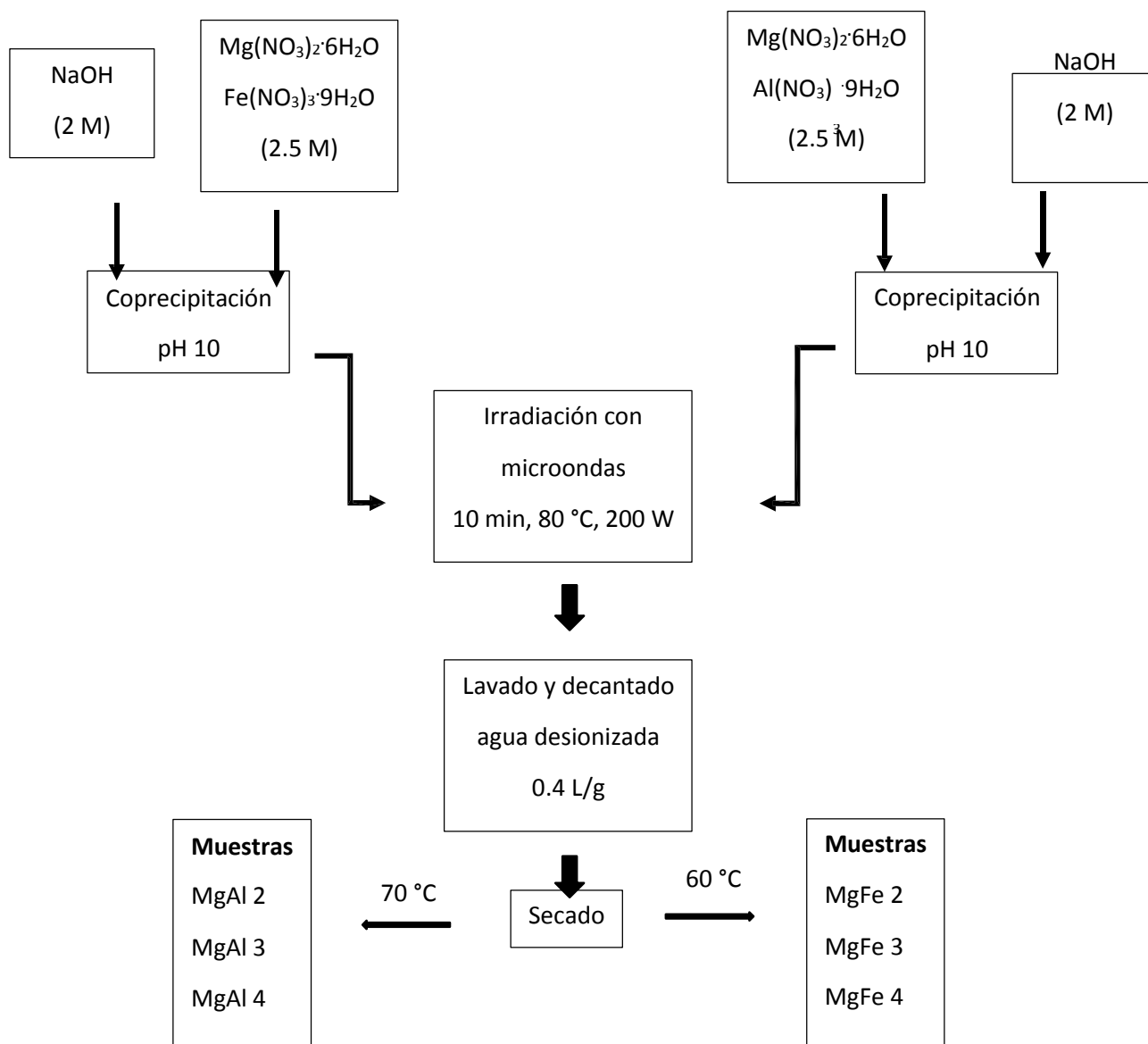


Figura 2.1. Diagrama de flujo del proceso de síntesis de las muestras base.

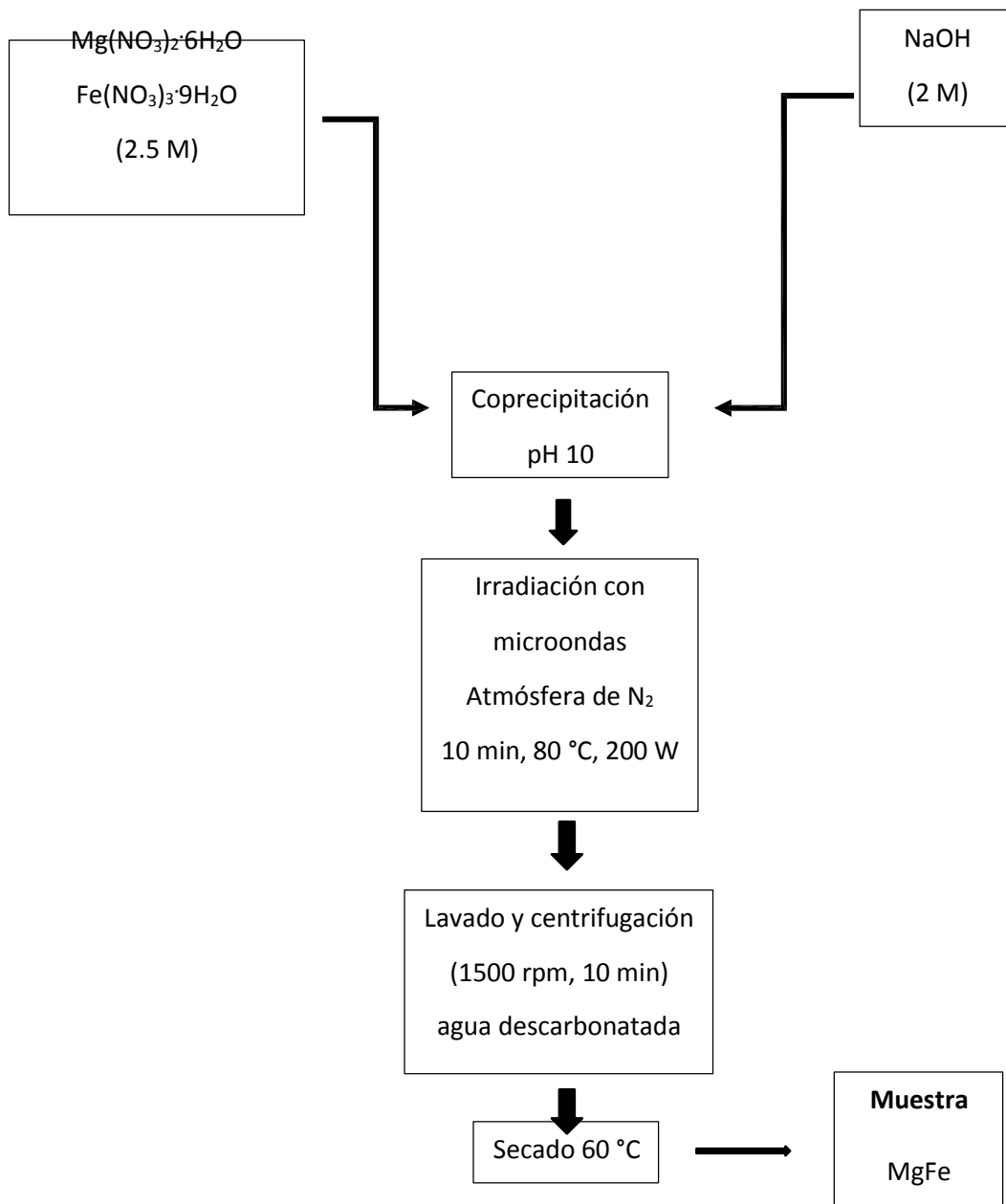


Figura 2.2. Diagrama de flujo del proceso de síntesis de hidrotalcita por coprecipitación.

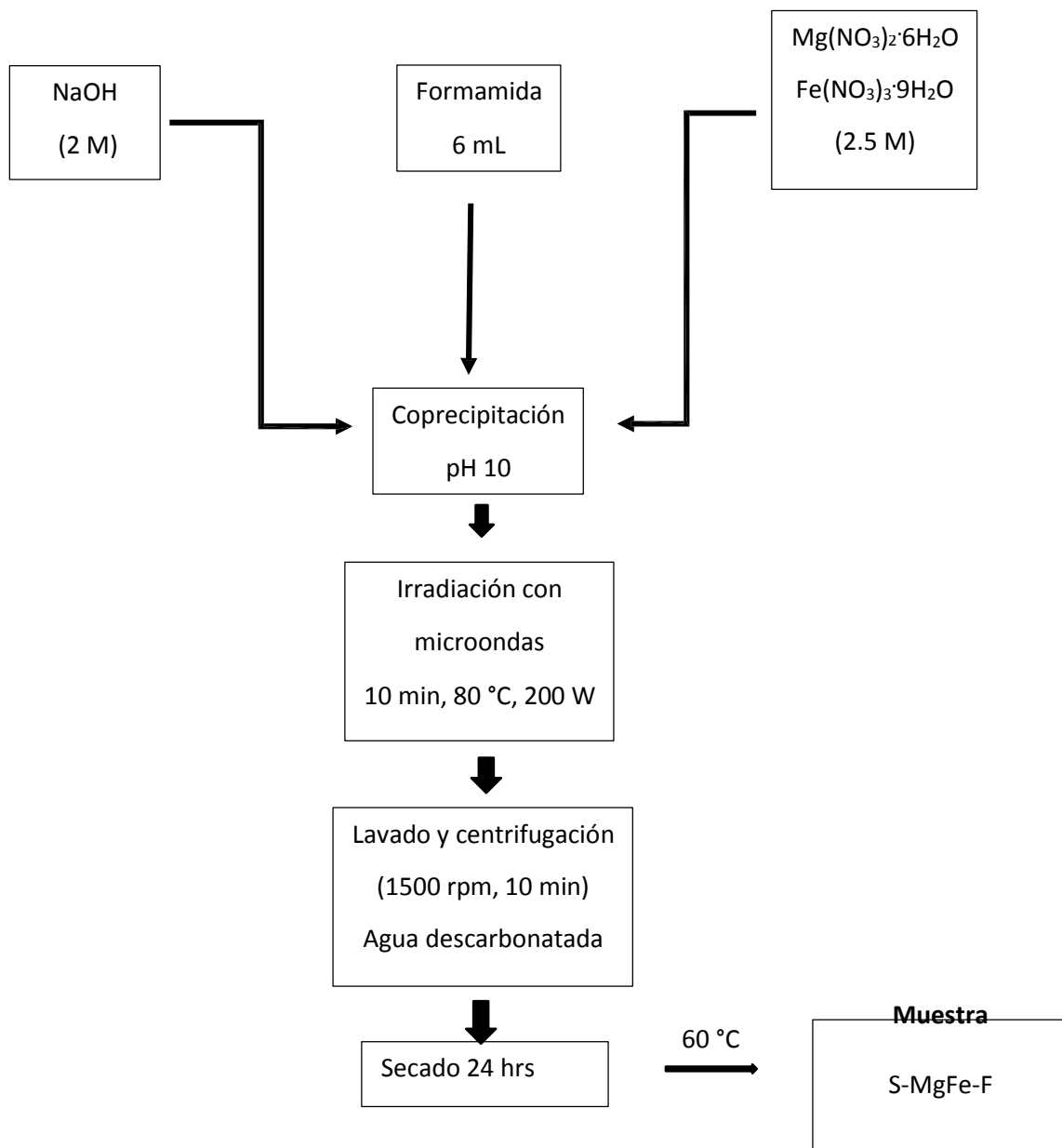


Figura 2.3. Diagrama de flujo del proceso de síntesis de la muestra S-MgFe-F.

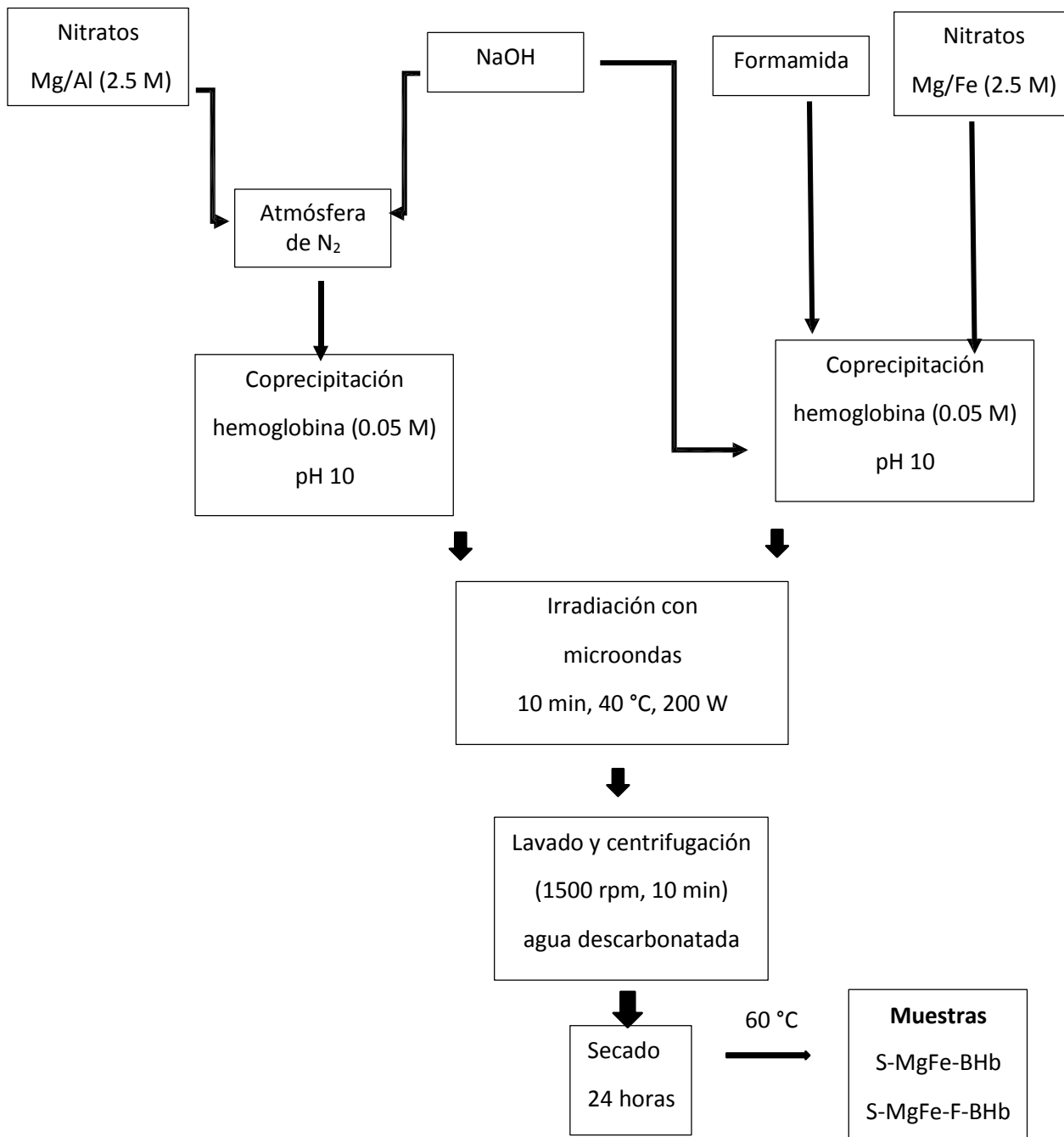


Figura 2.4. Diagrama de flujo del proceso de síntesis de híbridos hidrotalcita-hemoglobina por coprecipitación.

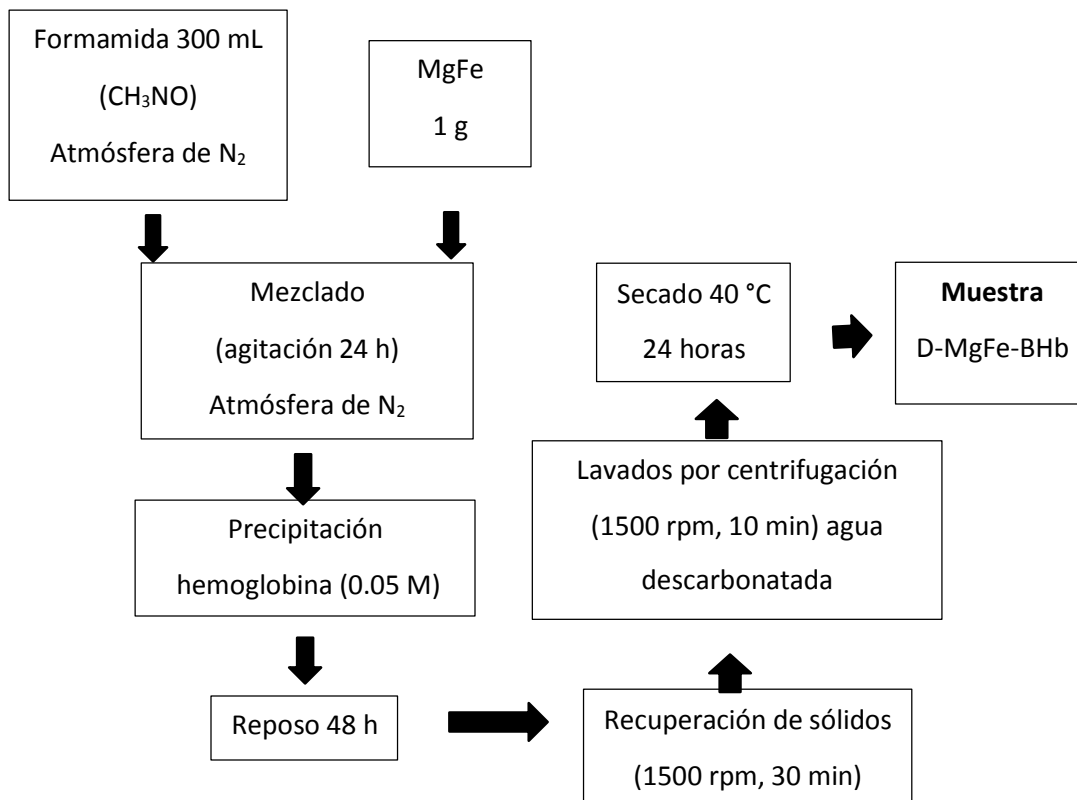


Figura 2.5. Diagrama de flujo del proceso de síntesis de híbrido hidrotalcita-hemoglobina por delaminación.

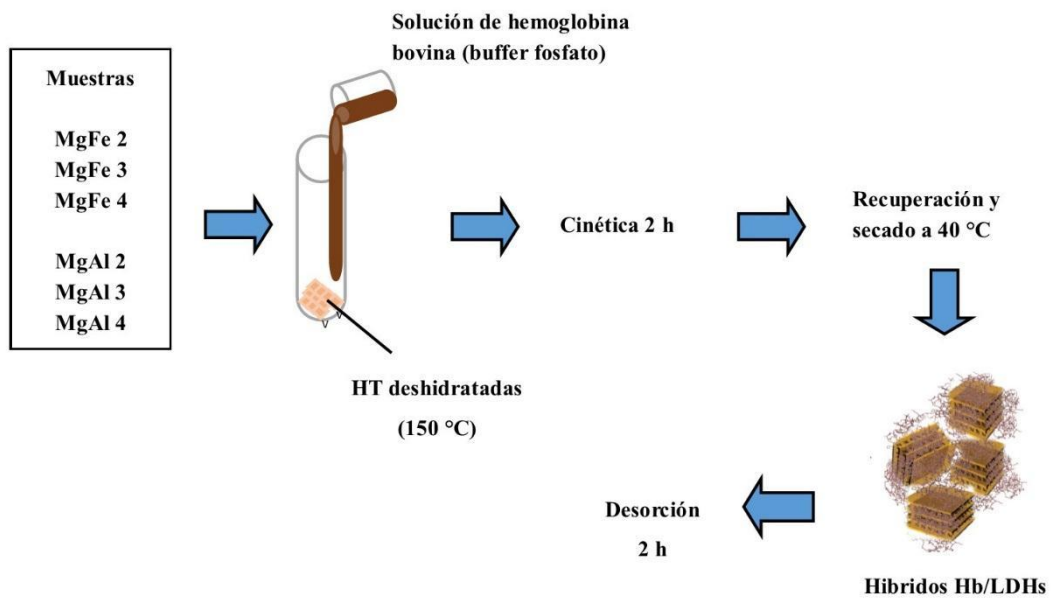


Figura 2.6. Diagrama de flujo del proceso de síntesis de híbridos hidrotalcita-hemoglobina por adsorción y desorción.

2.5 Técnicas de caracterización

Las muestras sintetizadas en este trabajo se caracterizaron mediante diversas técnicas analíticas: difracción de rayos X (DRX), espectroscopia de infrarrojo (FTIR), fisorción de nitrógeno y espectroscopia ultravioleta visible (UV-vis).

2.5.1 Difracción de rayos X: en el análisis de las muestras se utilizó un difractómetro Bruker D8 DISCOVER, con un detector linx eye, acoplado a un tubo de rayos X con ánodo de cobre ($\lambda = 1.54056$ nm) empleando un monocromador de haz difractado para seleccionar la radiación $K\alpha$.

2.5.2 Espectroscopia de Infrarrojo (FT-IR): para este análisis se empleó un espectrofotómetro Nicolet modelo Magna FT-Infrarrojo 750. Las muestras se prepararon con KBr puro (99.999%, Merck) y se analizaron en forma de pastilla. El rango de trabajo para la obtención de los espectros fue de 4000 a 400 cm^{-1} con una media de 32 scans.

2.5.3 Fisorción de nitrógeno: la medición de las áreas específicas se realizó mediante el método BET en un equipo Micromeritics ASAP 2020, las muestras fueron tratadas previamente a 150 °C durante 12 h en alto vacío.

2.5.4 Espectroscopia ultravioleta visible (UV-vis): la técnica se utilizó para la identificación y cuantificación de la molécula de hemoglobina bovina (BHb), empleando un espectrofotómetro Pekín Elmer Lambda 35. La velocidad de escaneo fue de 480 nm/min con un ancho de rendija de 1 nm, empleando celdas de cuarzo de 1 cm de ancho.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se emplearon distintas técnicas de caracterización para los materiales sintetizados, las cuales nos proporcionan información de la composición y estructura de las hidrotalcitas, así como la interacción entre las hidrotalcitas y la molécula de hemoglobina (híbridos).

3.1. Difracción de rayos X

Se presentan en la Figura 3.1 los difractogramas de rayos X de las muestras iniciales de diferente composición Mg^{2+}/M^{3+} ($M^{3+} = Al$ o Fe) y de diferente relación molar M^{2+}/M^{3+} $x = 2, 3$ y 4 , sintetizadas por coprecipitación y tratadas con microondas.

Se observa que todas las muestras presentan los planos característicos de una hidrotalcita cuyos picos aparecen en los ángulos $11, 22, 33^\circ$ en 2θ con índices de Miller en $003, 006$ y 009 respectivamente (JCPDS -022-0700). Los picos de difracción cuyos índices de Miller son 110 y 113 se presentan en los ángulos 60 y 61° en 2θ que corresponden al orden de los cationes presentes en las láminas de hidrotalcita. Sin embargo los picos cuyos índices de Miller son 003 y 006 se deben al acomodo de las láminas. En la mayoría de las muestras la distancia interlaminar d_{003} se encuentra en el rango de 7.9 \AA a 8.0 \AA . Esto indica que los nitratos se encuentran en mayor proporción como aniones de compensación en la región interlaminar (Canavi y col., 1991; Rives y Ulibarri, 1999) a excepción de la muestra S-MgFe-F que tiene una distancia interlaminar en d_{003} de 7.7 \AA , indicando una mayor presencia de carbonatos como anión de compensación. En las muestras de Mg/Al se observa que si la relación metálica molar es igual a 4 , el pico 003 es estrecho y bien definido, conforme cambia la relación metálica molar se observa en las muestras MgAl 3 y MgAl 2 que el pico 003 es menos estrecho debido a una baja cristalinidad en las muestras.

Las muestras Mg/Fe presentan características muy similares a las Mg/Al, en cuanto al comportamiento con respecto a la relación metálica molar, estos difractogramas se observan menos definidos debido a que el hierro presenta fluorescencia con el ánodo de cobre empleado en el análisis de las mismas.

Para las muestras MgFe se observan picos definidos en los ángulos 11, 22 y 33° en 2θ , a diferencia de la muestra S-MgFe-F que presenta picos casi en la misma proporción, debido a que aparentemente las láminas de la hidrotalcita están bien formadas pero están ligeramente desencajadas unas respecto a otras; a este efecto se le conoce como turbostraticidad (Rivera y col., 2006), esto puede atribuirse a la presencia de la formamida en la estructura.

3.2 Espectroscopia de infrarrojo

Para la identificación de los grupos funcionales presentes en las muestras sintetizadas se empleó la espectroscopia de infrarrojo. En la Figura 3.2 se observa que las hidrotalcitas sintetizadas presentan bandas de absorción alrededor de 3600 cm^{-1} y 3400 cm^{-1} que se atribuyen a movimientos de los grupos O-H de las láminas (estructurales), las bandas que aparecen en la región de 1700 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} corresponden a la deformación angular de los grupos H-O-H de las moléculas de agua interlaminares (Iglesias y col., 2005). La presencia de bandas en 1384 cm^{-1} corresponden a la vibración del ión nitrato interlaminares y las bandas en 569 cm^{-1} a 793 cm^{-1} corresponden a la vibración del ión nitrato. Sin embargo estas bandas podrían traslaparse con las vibraciones de los carbonatos libres estudiados por Miyata, 1975, los cuales poseen los siguientes modos de vibración: $\nu_1 = 1050\text{ cm}^{-1}$, $\nu_2 = 850\text{ cm}^{-1}$ a 880 cm^{-1} , $\nu_3 = 1350\text{ cm}^{-1}$ a 1380 cm^{-1} , $\nu_4 = 670\text{ cm}^{-1}$ a 690 cm^{-1} . Las bandas que aparecen de 449 cm^{-1} a 874 cm^{-1} se pueden asociar a vibraciones de deformación de los enlaces entre el catión y el oxígeno (O-Mg, O-Al y O-Fe) o con las superposiciones de vibraciones de deformación de los enlaces Mg-OH y Al-OH (Cavani y col., 1991). En la muestra MgAl 2 se observa un desdoblamiento de la banda entre 1384 cm^{-1} y 1359 cm^{-1} debido a la presencia de nitratos y carbonatos en la estructura laminar.

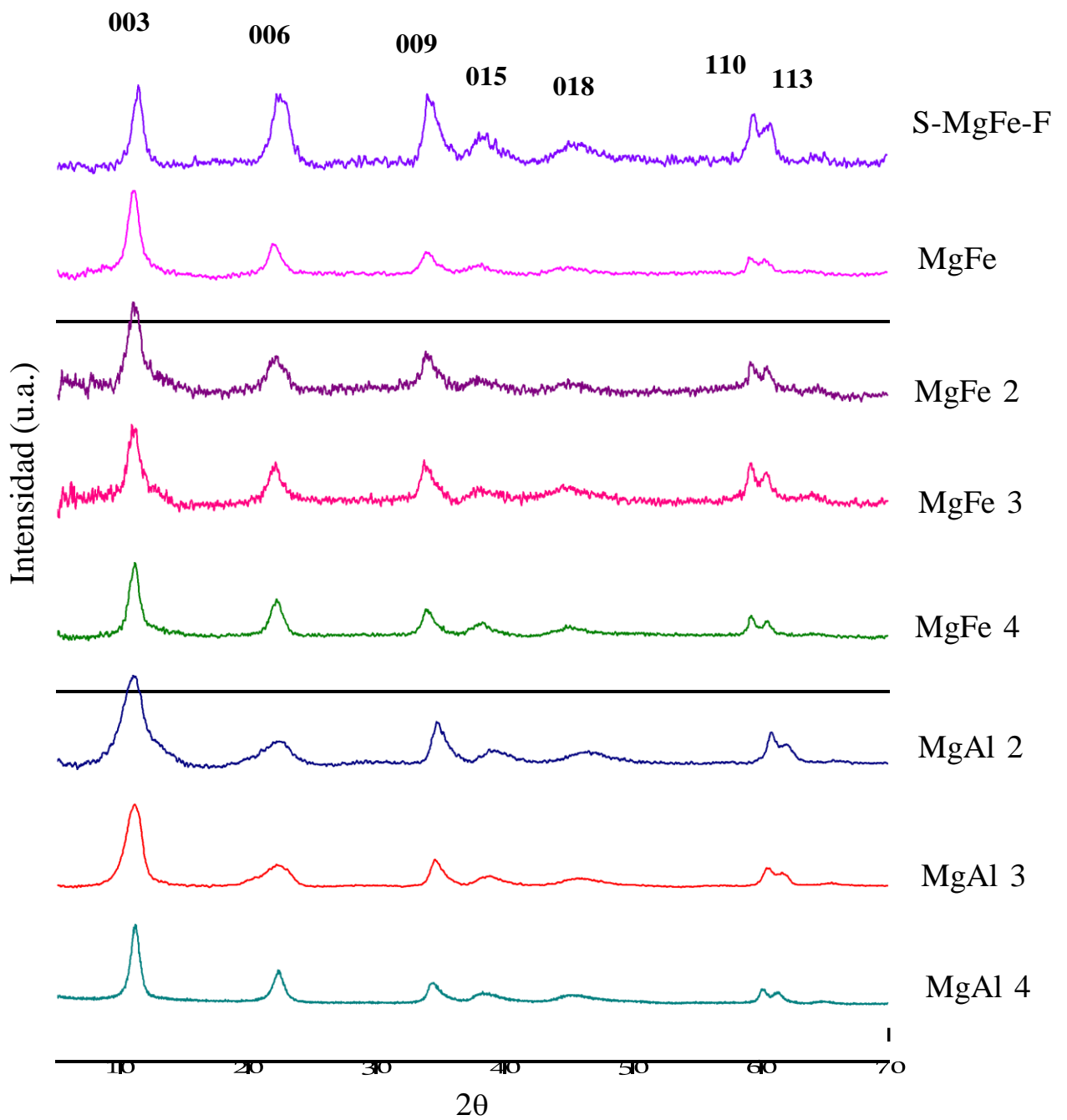


Figura 3.1. Patrones de difracción de rayos X de las muestras iniciales MgAl 4, MgAl 3, MgAl 2, MgFe 4, MgFe 3, MgFe 2, MgFe y S-MgFe-F.

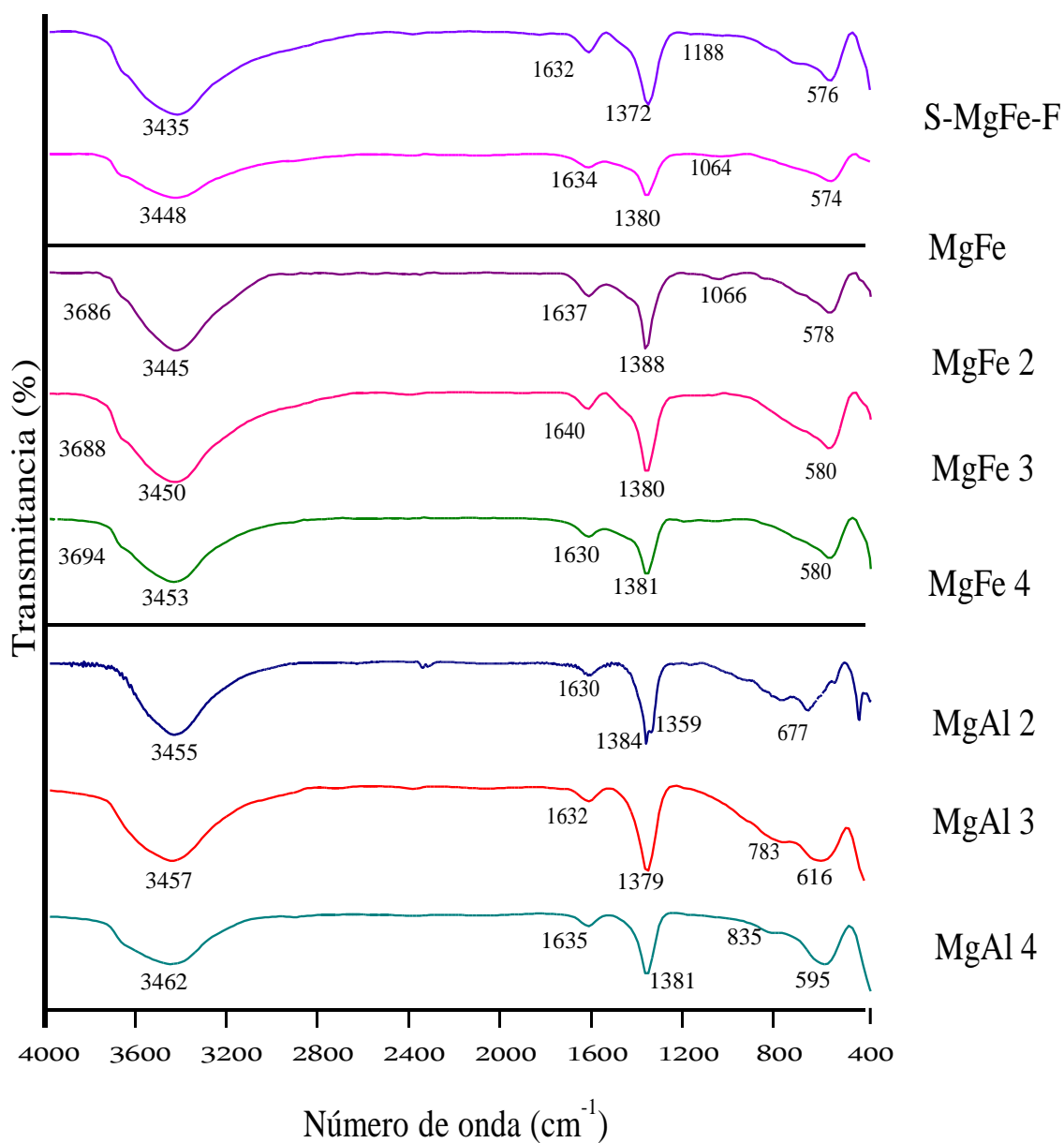


Figura 3.2. Espectros de infrarrojo de las muestras MgAl 4, MgAl 3, MgAl 2, MgFe 4, MgFe 3, MgFe 2, MgFe y S-MgFe-F.

3.3 Fisisorción de nitrógeno

En la Figura 3.3 se pueden observar las isothermas de adsorción y desorción de las muestras iniciales. Todas las isothermas son del tipo IV según la clasificación de la IUPAC características de sólidos mesoporosos y lazos de histéresis H3 característicos de materiales laminares, con morfología tipo rendija.

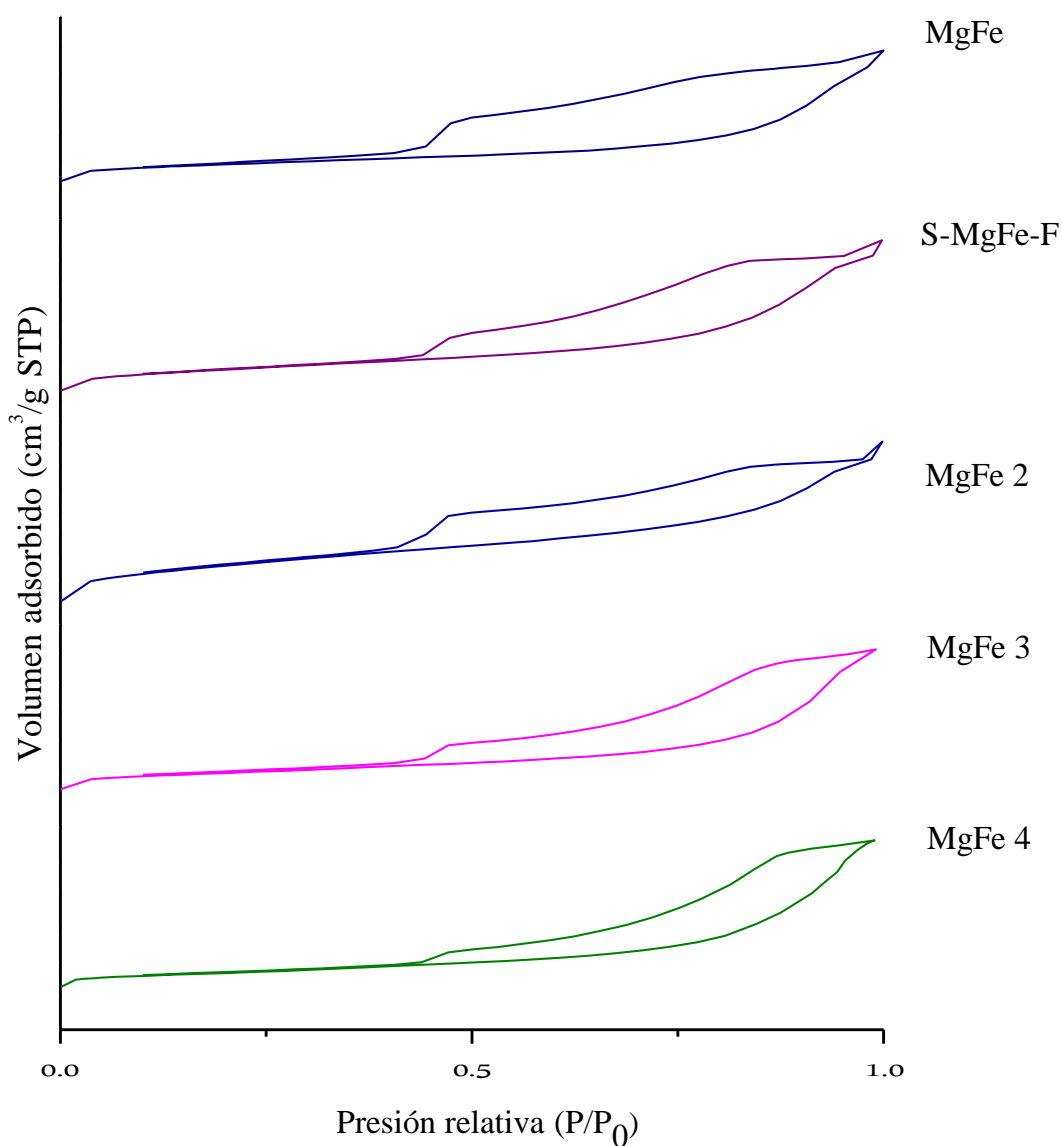


Figura 3.3. Isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno de las muestras iniciales.

En la Figura 3.4 se observa la distribución del tamaño de poro de las muestras iniciales. Para S-MgFe-F, MgFe 3 y MgFe se encuentran picos en 20 Å y otros picos de 50 Å a 200 Å y 400 Å respectivamente, lo que indica la presencia de mesoporos de igual modo las muestras MgFe 4 y MgFe 2 también presentan mesoporos. En la Tabla 3.1 se presentan las superficies específicas (BET) y el tamaño de poro.

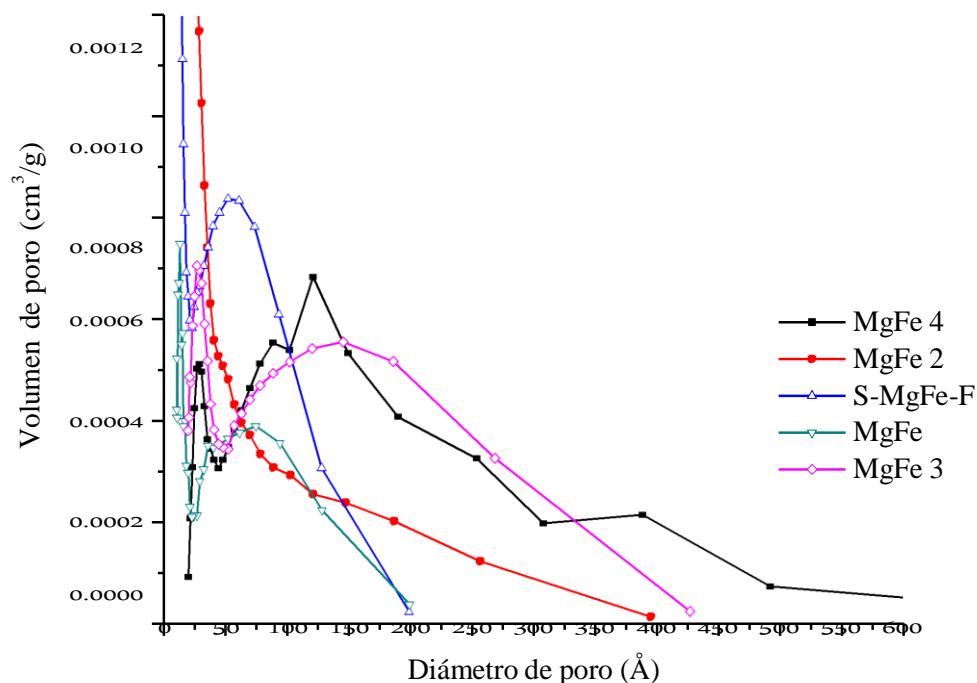


Figura 3.4. Distribución de tamaño de poro de las muestras iniciales.

Tabla 3.1. Superficies específicas de las muestras iniciales.

Muestra	S_{BET} (m ² /g Ht)	D_{prom} (Å)
MgFe 4	60	120
MgFe 3	76	71
MgFe 2	92	145
MgFe	31	73
S-MgFe-F	57	54

3.4 Caracterización de los híbridos hidrotalcita-hemoglobina

3.4.1 Difracción de rayos X

En la Figura 3.5 se presentan los patrones de difracción de rayos X de los híbridos (hidrotalcita-hemoglobina) preparados por delaminación y coprecitación simultánea.

En los difractogramas de rayos X se observa que todas las muestras siguen presentando los picos característicos de una hidrotalcita. La muestra S-MgFe-BHb presenta un ensanchamiento de picos en comparación con la muestra inicial, como resultado de un acomodo irregular de las láminas y una $d_{003} = 7.8 \text{ \AA}$, lo que indica que está intercalada con nitratos y carbonatos, sin embargo esta irregularidad se debe a la inserción de la hemoglobina en la región interlamina o en los bordes de las láminas. Para la muestra S-MgFe-F-BHb a diferencia de la muestra inicial, presenta un mejor acomodo de las láminas y un pequeño corrimiento en el espacio interlamina en $d_{003} = 7.8 \text{ \AA}$. Esta distancia sugiere que está intercalada con nitratos y carbonatos y, por tanto, la hemoglobina no se encuentra en la región interlamina pero si en la superficie. La muestra D-MgFe-BHb presenta muy buen acomodo de las láminas y por lo tanto mejor cristalinidad en la estructura en comparación con las dos muestras anteriores no presentó corrimiento en el pico d_{003} en comparación con la muestra inicial, por lo cual la hemoglobina puede encontrarse en superficie.

3.4.2 Espectroscopía de infrarrojo

El espectro de infrarrojo de la hemoglobina, Figura 3.6, presenta bandas en 3430 cm^{-1} y 1100 cm^{-1} que se atribuyen a vibraciones del OH y COO-H de los carboxilatos del grupo hemo, las bandas presentes en 2900 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} y entre 1300 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} corresponden a vibraciones de grupos CH₂-CH₂, las vibraciones de 1436 cm^{-1} a 1400 cm^{-1} se atribuye al enlace CH₃-C=C. Las bandas que aparecen en 1650 cm^{-1} y 1535 cm^{-1} corresponden a las vibraciones C=N-C, C=N y C=C del grupo hemo (Skoog y col., 2001). Aproximadamente a 3400 cm^{-1} se observa una banda ancha y bien definida representativa de

los enlaces N-H y O-H de los aminoácidos de la globina en la hemoglobina, la vibración en 632 cm^{-1} se atribuye al hierro (Pavia y col., 2001).

Como se observa en los espectros de infrarrojo de la Figura 3.6, todas las muestras presentan bandas en 2900 cm^{-1} aproximadamente que se atribuyen a la vibración de $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ y a 1500 cm^{-1} correspondientes a la vibración de C=N-C , C=N y C=C del grupo hemo.

La muestra S-MgFe-BHb presenta absorción en 1082 cm^{-1} que se puede asociar con las vibraciones de los grupos OH^- de los carboxilatos del grupo hemo y en 1440 cm^{-1} que se atribuye al enlace $\text{CH}_3\text{-C=C}$. La muestra D-MgFe-BHb también presenta la absorción en 1081 cm^{-1} del OH de los carboxilatos del grupo hemo, lo cual sugiere la presencia de hemoglobina en las hidrotalcitas; sin embargo para todos los casos las demás bandas se traslapan con las correspondientes a la hidrotalcita.

En la muestra S-MgFe-BHb se observa que a 1380 cm^{-1} la intensidad de la banda es menor en comparación con las demás muestras, esto se debe a que hay una menor presencia de carbonatos debido al procedimiento de síntesis.

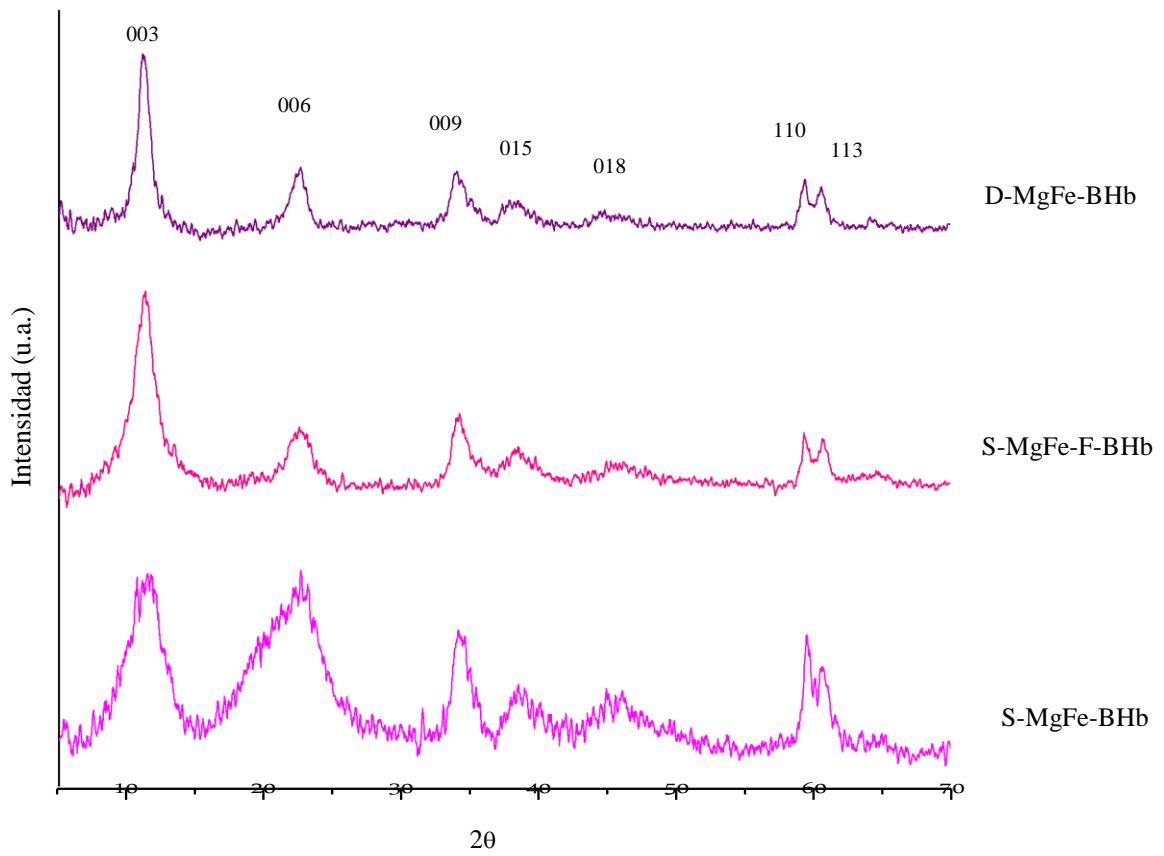


Figura 3.5. Difracción de rayos X de las muestras S-MgFe-BHb, S-MgFe-F-BHb y D-MgFe-BHb.

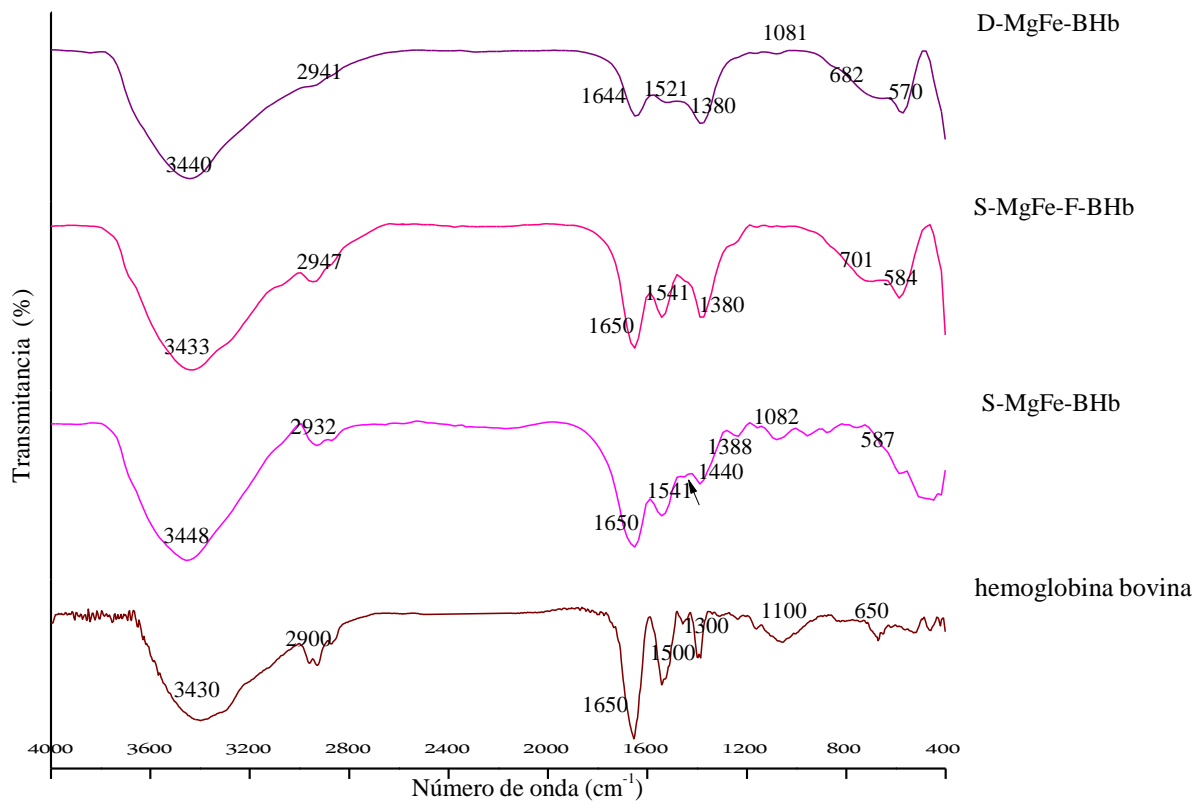


Figura 3.6. Espectros de infrarrojo de los híbrido hidrotalcita-hemoglobina y de la hemoglobina bovina.

3.4.3 Fisisorción de nitrógeno

En la Figura 3.7 se presentan las isotermas de adsorción y desorción de las hidrotalcitas con hemoglobina. La muestra D-MgFe-BHb manifiesta una isoterma del tipo IV según la clasificación de la IUPAC característica de sólidos mesoporosos, y presenta lazo de histéresis H3 propio de materiales compuestos por partículas laminares con morfología tipo rendija en consecuencia la hemoglobina solo es retenida en la superficie del material lo cual se corrobora con el patrón de difracción de rayos X que muestra una estructura con un buen ordenamiento de las láminas y con una distribución de tamaño de poro propia de este tipo de histéresis. En cambio la muestra S-MgFe-BHb exhibe una isoterma de tipo V donde las interacciones entre adsorbato adsorbente son débiles debido a la presencia de microporos, a bajas presiones presenta un lazo de histéresis H1 debido a la presencia de poros muy angostos o a la presencia de aglomerados de partículas esféricas de tamaño y distribuciones aproximadamente uniformes. La presencia del lazo de histeresis a bajas presiones se debe a la hinchazón de las partículas que acompañan la adsorción lo cual provoca la distorsión de la estructura y ya que esta no es perfectamente elástica algunas moléculas quedan atrapadas y son liberadas muy lentamente o no del todo durante la desorción provocando que el lazo de histéresis no cierre, por tanto la hemoglobina se encuentra intercalada en las láminas de la hidrotalcita formando aglomerados y a su vez bloqueando las bocas de las láminas.

En la Figura 3.8 se observa la distribución del tamaño de poro de los híbridos hidrotalcita-hemoglobina formados por delaminación y coprecipitación. La muestra S-MgFe-BHb no presenta porosidad, por otro lado para D-MgFe-BHb presenta un máximo en 20 Å, otro en 33 Å y uno bien definido en 200 Å propia de mesoporos.

Para las muestra S-MgFe-BHb y S-MgFe-F-BHb resultarán áreas pequeñas, cerca de 1 m²/g siendo mucho menor que el área específica de la muestra inicial debido a la intercalación de la hemoglobina en la hidrotalcita. Sin embargo, para la muestra D-MgFe-BHb el área específica es el doble de la muestra MgFe lo que indicando que la hemoglobina se encuentra en superficie.

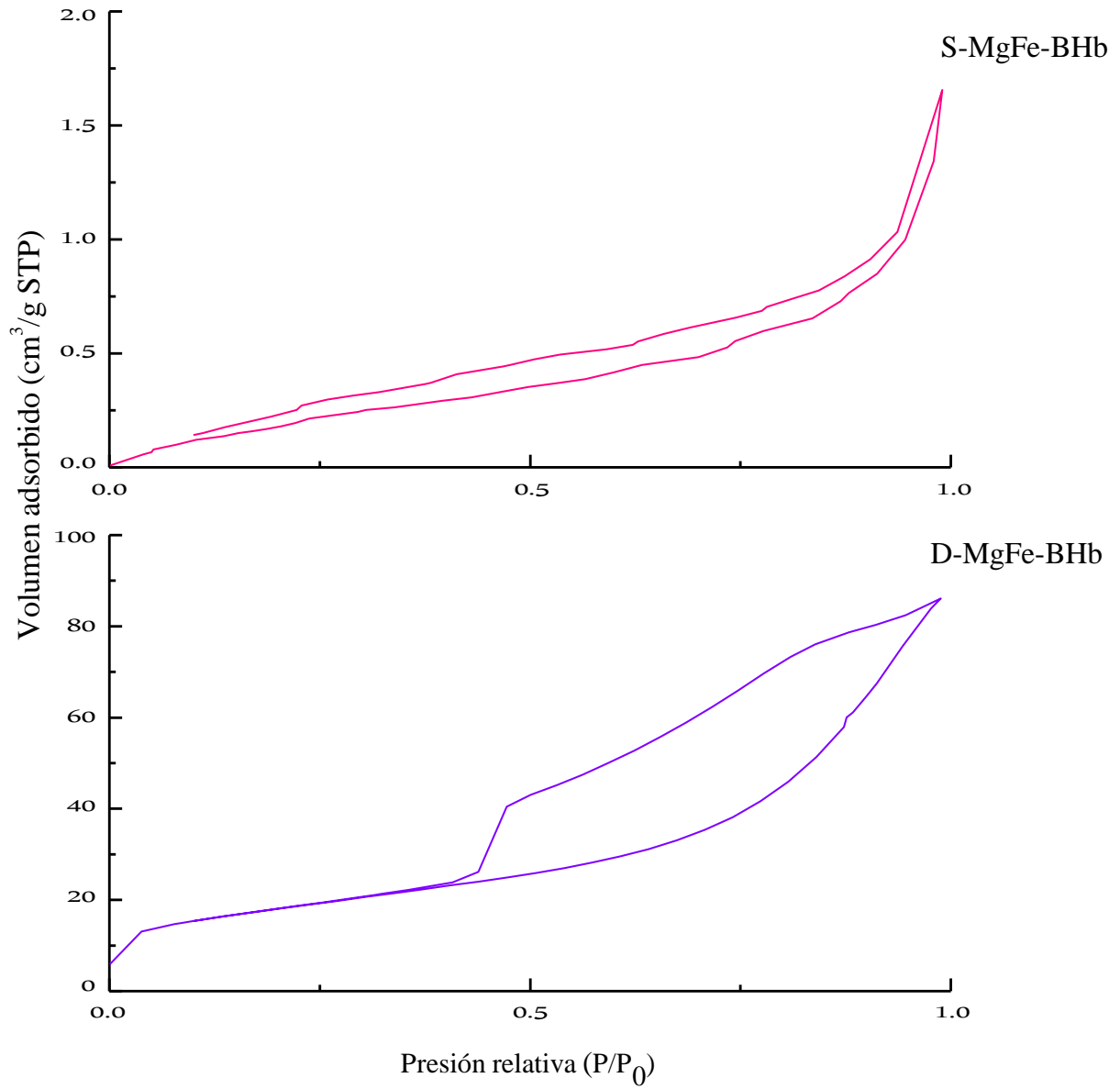


Figura 3.7. Isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno de las muestras D-MgFe-BHb y S-MgFe-BHb.

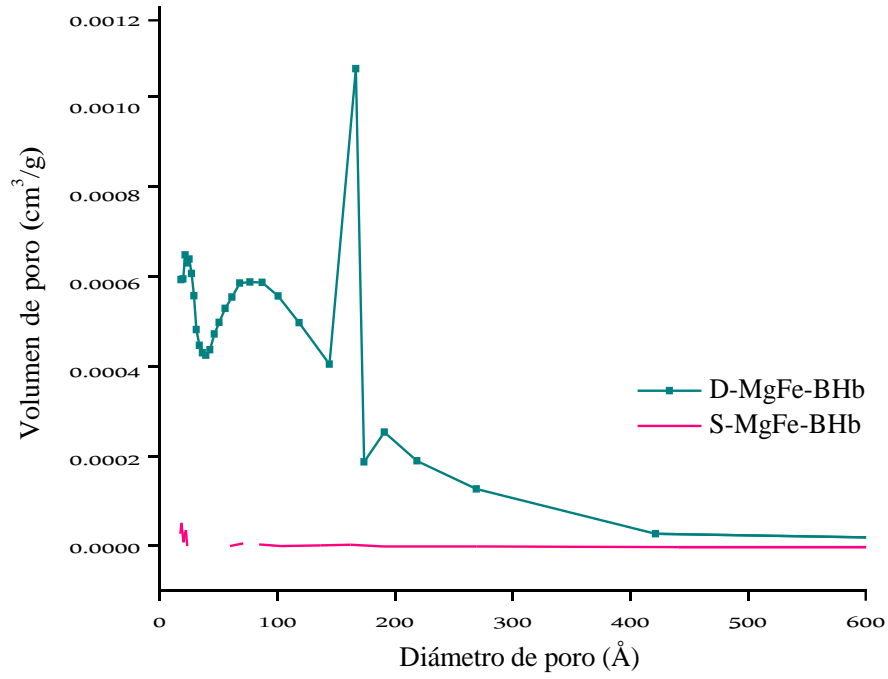


Figura 3.8. Distribución de tamaño de poro de las muestras: S-MgFe-BHb y D-MgFe-BHb.

3.4.4 Adsorción-desorción de hemoglobina en hidrotalcitas

Para realizar la adsorción de hemoglobina en hidrotalcitas de composición Mg^{2+}/M^{3+} ($M^{3+} = Mg$ o Fe) con diferente relación metalica molar se realizo una curva de calibración con estándar conocidos, empleando un espectrofotómetro de UV-vis a una $\lambda_{max} = 405.6$ nm como se observa en la Figura 3.9, teniendo un valor de $R^2 = 0.996$. Todas la mediciones se realizaron por triplicado con una desviación estándar de 0.098 y un intervalo de confianza del 95 %.

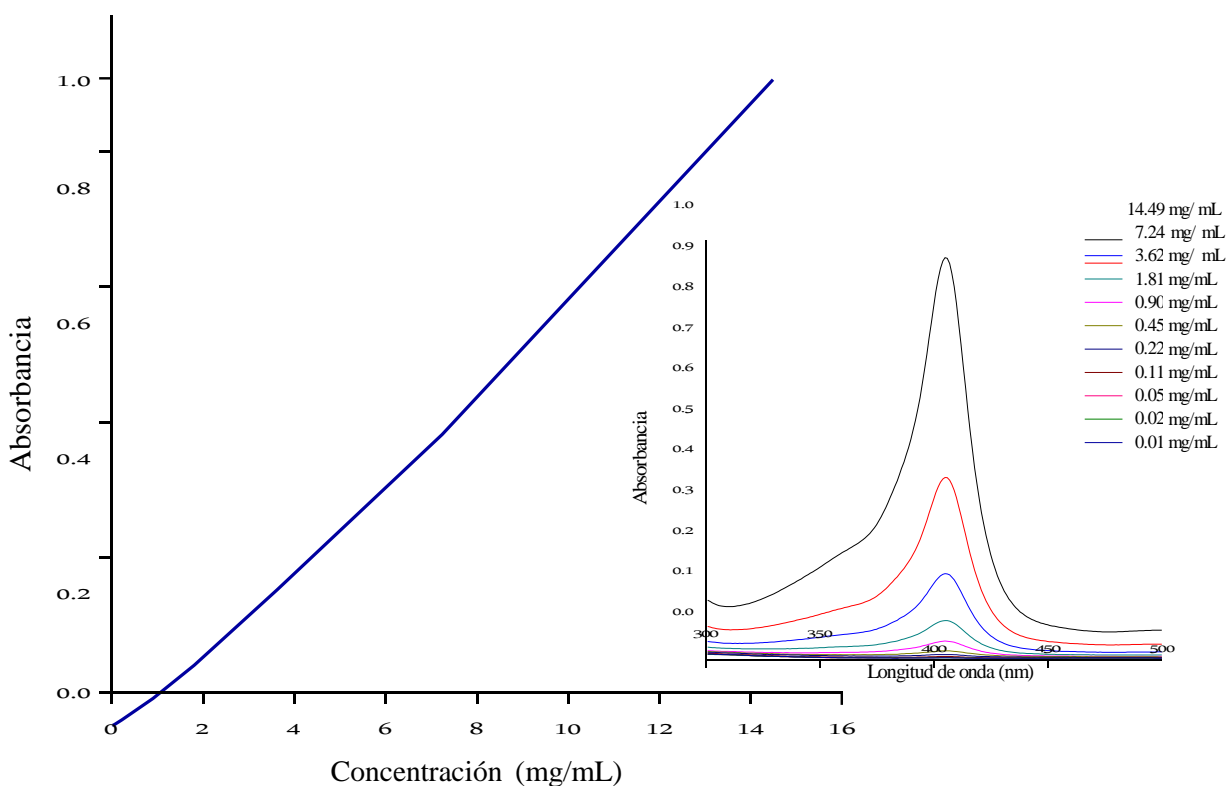


Figura 3.9. Curva de calibración de hemoglobina bovina con buffer de fostato pH 7.

Las curvas de adsorción de hemoglobina sobre las diferentes hidrotalcitas se presenta en la Figura 3.10. Se puede apreciar que la adsorción de BHb en todas las muestras de hidrotalcita de diferente composición (Fe^{3+} o Al^{3+}) y diferente relación metálica molar, retienen en su superficie alrededor de 1.40 mg BHb /mg Ht. Además los tiempos en los que se alcanza el equilibrio varía, como se observan en la Tabla 3.2. La muestra ads-MgFe 4/BHb alcanza el equilibrio a los 30 minutos en comparación con las muestras ads-MgFe 3/BHb y ads-MgFe 2/BHb que alcanzan el equilibrio a los 60 y 80 minutos respectivamente, este comportamiento se debe a la diferencia en la densidad de carga de las láminas, ya que al aumentar la relación metálica molar disminuye la densidad de carga generada por el exceso de carga positiva en las láminas. Así, la cantidad de iones interlaminares es menor lo que genera un mayor espacio libre por lo tanto tiende a saturarse más rápido que las otras muestras (Rivera y col., 2006). Las muestras ads-MgAl 4/BHb, ads-MgAl 3 /BHb y ads-MgAl 2/BHb presentan un comportamiento similar que las muestras anteriores, aun así se observa que se las muestras que contienen aluminio se saturan más rápido que las que contienen hierro (Fe^{3+}) en su composición.

Tabla 3.2 Cantidad de hemoglobina retenida (q_e) y tiempo de equilibrio.

Muestra	q_e (mg BHb/mg Ht)	tiempo (min)
ads-MgFe 4/BHb	1.45	30
ads-MgFe 3/BHb	1.45	60
ads-MgFe 2/BHb	1.44	80
ads-MgAl 4/BHb	1.47	20
ads-MgAl 3/BHb	1.47	30
ads-MgAl 2/BHb	1.43	40

En la Figura 3.11 se observa que el espectro de UV-vis de la hemoglobina cambió especialmente en el intervalo de 270-325 nm, lo que indica que existe una interacción entre superficie de la hidrotalcita y la hemoglobina (Wang y col., 2008), debido a que los aminoácidos de la globina están interaccionando con los grupos hidroxilos de la lámina de hidrotalcita así como con la carga superficial de la misma (Hua y col., 2013).

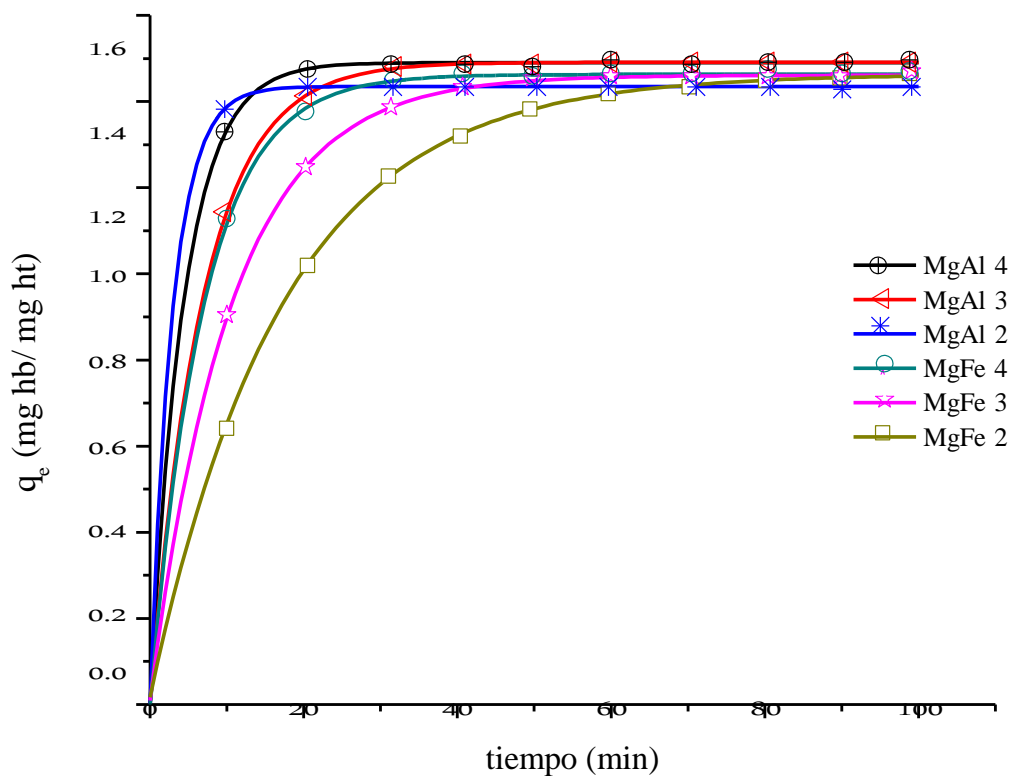


Figura 3.10. Adsorción de hemoglobina sobre hidrotalcitas: MgFe 4, MgFe 3, MgFe 2, MgAl 4, MgAl 3 y MgAl 2.

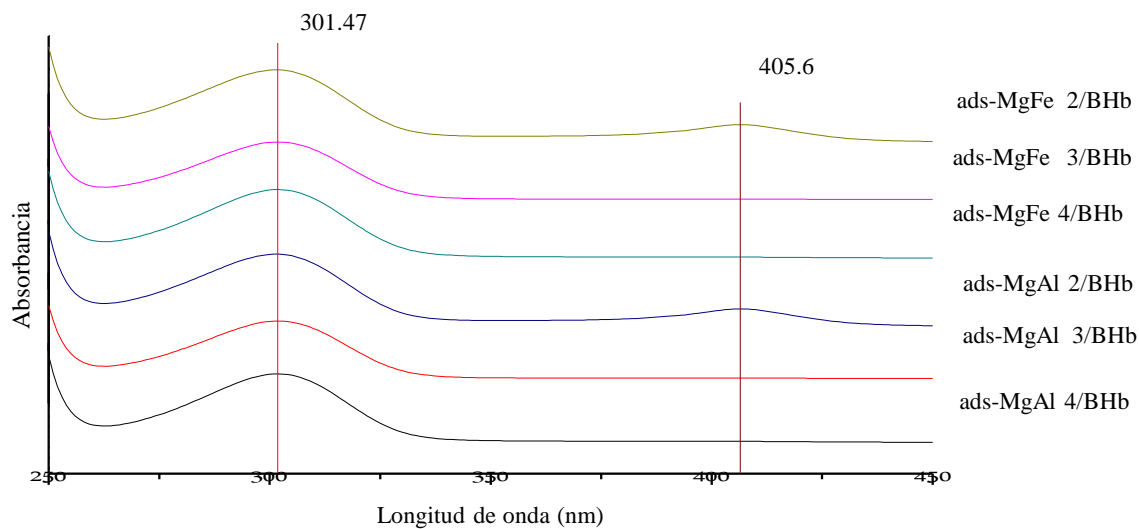


Figura 3.11. Interacción de la hemoglobina con la hidrotalcita.

En todas las muestras obtenidas por adsorción se realizó el proceso de desorción de hemoglobina, los datos se presentan en la Tabla 3.3, donde las muestras de hidrotalcita con relación metálica molar 4:1 y de diferente composición (Al^{3+} o Fe^{3+}) desorben menor cantidad de hemoglobina, en comparación con las otras muestras que desorben alrededor del 9-8 % de la concentración retenida, por tanto la muestra ads-MgAl 4/BHb libera una menor cantidad de hemoglobina.

Tabla 3.3 Desorción de hemoglobina.

Muestra	Desorción (%)
ads-MgFe 4/BHb	7.5
ads-MgFe 3/BHb	8.3
ads-MgFe 2/BHb	8.3
ads-MgAl 4/BHb	6.8
ads-MgAl 3/BHb	7.7
ads-MgAl 2/BHb	9.5

En la Figura 3.12 se puede observar que el espectro de UV-vis de la hemoglobina no presentó modificaciones a la λ de 405.6 nm característica del grupo hemo (Wang y col., 2008) al ser desorbida de las muestras de hidrotalcita, por lo tanto la hemoglobina es estable en el material.

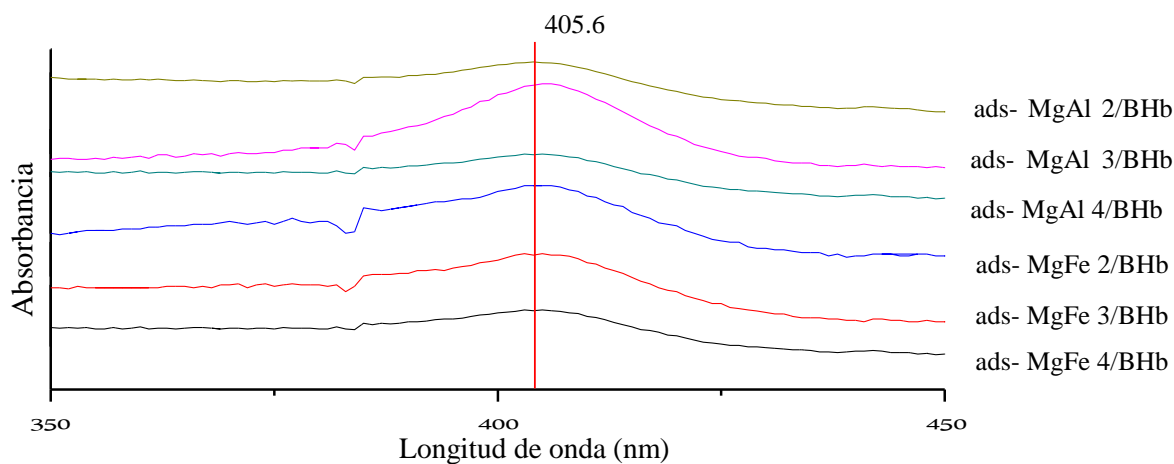


Figura 3.12. Estabilidad de la hemoglobina en los híbridos hidrotalcita-hemoglobina.

3.4.4.1 Espectroscopía infrarrojo

En los espectros de las muestras con hemoglobina que se presentan en la Figura 3.13, se observa que son muy similares a las muestras iniciales, debido a que las bandas de los híbridos (hidrotalcita-hemoglobina) se traslapan con las de la hidrotalcita sin hemoglobina. Sin embargo se aprecia que cerca de 2900 cm^{-1} se presenta una señal débil en todos los híbridos que se puede asociar a la vibración de $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ del grupo hemo.

En todas las muestras se observa una vibración entre 1044 cm^{-1} y 1070 cm^{-1} que se atribuye a la presencia del ion fosfato (PO_4^{3-}) (Hua y col., 2013) proveniente del buffer empleado en la adsorción, por tanto estas bandas también se asignan a las vibraciones de los carbonatos presentes en las hidrotalcitas.

En la muestra ads-MgFe 4/BHb se observa una banda de absorción en 1643 cm^{-1} que se asocia a las vibraciones de: C=N-C, C=N y C=C del grupo hemo (Skoog y col. 2001).

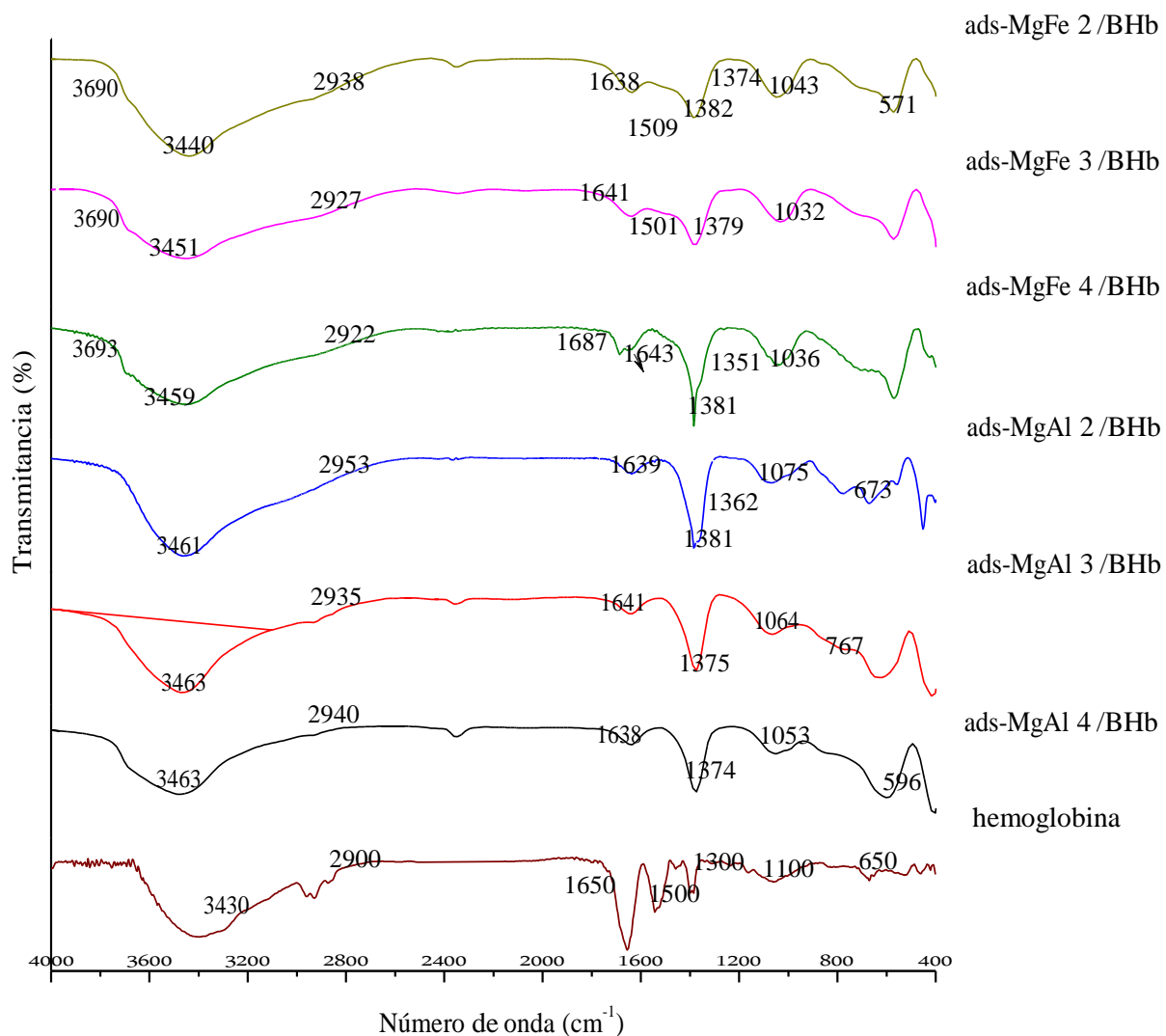


Figura 3.13. Espectro de infrarrojo de la hemoglobina y de la híbridos hidrotalcita-hemoglobina por adsorción.

3.4.4.2 Difracción de rayos X

Los difractogramas de las muestras ads-MgFe 4/BHb, ads-MgFe 3/BHb, ads-MgFe 2/BHb, ads-MgAl 4/BHb, ads-MgAl 3/BHb y ads-MgAl 2/BHb, se presentan en la Figura 3.14.

La distancia interlaminar de los híbridos sintetizados por adsorción es $d_{003} = 7.9 \text{ \AA}$ a excepción de la muestra ads-MgAl 2/BHb que tiene una $d_{003} = 8.2 \text{ \AA}$. Cuando la distancia interlaminar es de $d_{003} = 7.9 \text{ \AA}$, el espacio interlaminar es de 3.1 \AA considerando un espesor de la lámina de 4.8 \AA . Este valor corresponde a hidrotalcitas que tienen carbonatos en la región interlaminar cuyo tamaño aproximado es de 3.0 \AA . Cuando la distancia interlaminar es de $d_{003} = 8.2 \text{ \AA}$, el espacio interlaminar es igual a 3.45 \AA , por lo tanto el espacio interlaminar se encuentran nitratos y carbonatos. Considerando el diámetro elipsoidal de la hemoglobina que es de $75 \text{ \AA} \times 55 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$ y el espacio interlaminar que se cálculo se puede inferir que la hemoglobina se queda en superficie debido al tamaño de esta. Los híbridos resultantes presentan una coloración marrón muy tenue. En los difractogramas también se observa la formación de otra fase identificada como $\text{KMgPO}_4 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ (JCPDS 35-0812), esta fase se presenta debido a que hay una interacción entre el ión potasio (K^+) y el grupo fosfato del buffer con el magnesio (Mg^{2+}) presente en las láminas, esta fase se observa en las muestras ads-MgFe 4/BHb, ads-MgFe 3/BHb, ads-MgFe 2/BHb y en menor cantidad en la muestra ads-MgAl 4/BHb, no habiendo presencia en las muestras ads-MgAl 3/BHb y ads-MgAl 2/BHb.

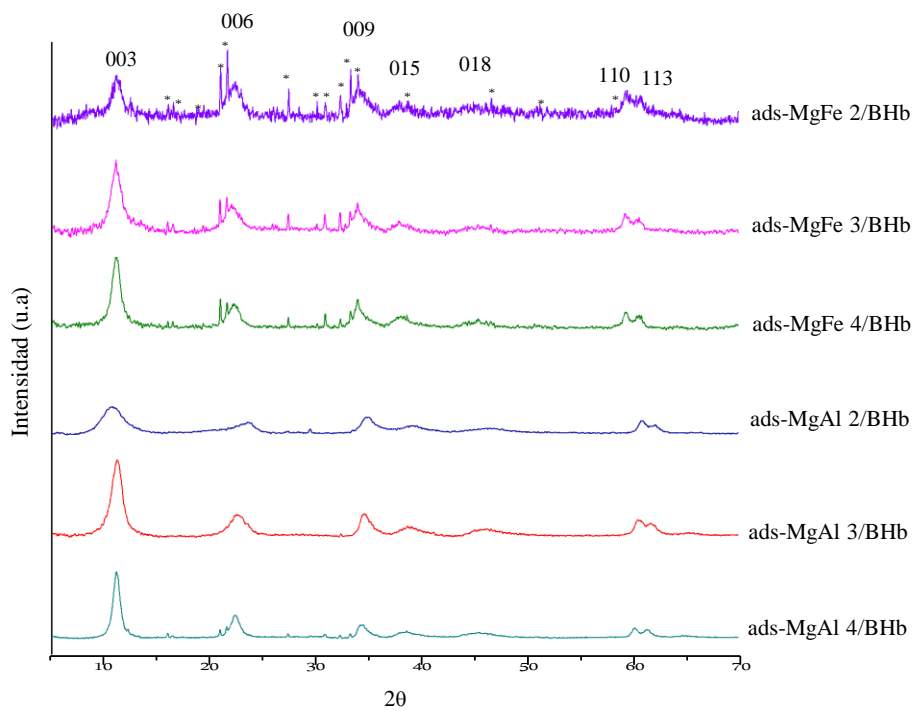


Figura 3.14. Difractogramas de los híbridos hidrotalcita-hemoglobina sintetizados por adsorción.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- ✚ Se logró inmovilizar y estabilizar la molécula de hemoglobina en hidrotalcitas por diferentes métodos de síntesis: adsorción, coprecipitación y delaminación.
- ✚ Por difracción de rayos X se determinó que la hemoglobina es retenida en la superficie de los sólidos al emplear el proceso de delaminación, mientras que los híbridos obtenidos por coprecipitación con formamida y coprecipitación sin formamida la hemoglobina fue intercalada en las láminas de la hidrotalcita.
- ✚ Por espectroscopía infrarroja se observa la presencia de los grupos funcionales de la hemoglobina, junto con las de los materiales empleados para la síntesis de los híbridos, con lo cual se confirmó la presencia de la molécula de hemoglobina.
- ✚ Los resultados de fisisorción de nitrógeno de los materiales híbridos comprueban la inserción de hemoglobina en la estructura laminar, dado que el comportamiento de adsorción-desorción es diferente para las muestras con y sin hemoglobina.
- ✚ Los resultados obtenidos por UV-vis indican que la molécula de hemoglobina se inmoviliza rápido y tiene una fuerte interacción con el material.
- ✚ Todos los materiales resultaron desorber poca hemoglobina (máximo 10%) indicando una fuerte interacción entre la hemoglobina y la hidrotalcita.
- ✚ Las hidrotalcitas con relación metálica molar 4:1 resultaron ser más estables ya que desorben una menor cantidad de hemoglobina.
- ✚ Con el estudio de desorción se confirmó que la hemoglobina es estable en los compuestos tipo hidrotalcita sin importar la composición así como la relación metálica molar.

- ✚ Por difracción de rayos X se confirmó que las hidrotalcitas de composición MgAl resultaron ser mejores soportes en la adsorción de hemoglobina en buffer de fosfato de sodio ya que presentan poca o nula interacción con los iones fosfato del buffer.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aisawa, S., Sasaki, S., Takahashi, S., Hirahara, H., Nakayama, H., Narita, E., *J. Phys. Chem. Solids.* 67 (2006) 920.
- Auer, S., Grunwaldt, J-D., Köppel, R. A., Baiker, A., *J. Molec. Catal. A* 139 (1999) 305.
- Camino, G., Maffezzoli, A., Braglia, M., De Lazzaro, M., Zammarano, M., *Polym. Degrad. Stab.* 74 (2001) 457.
- Carlino, S., *Solid State Ionics.* 98 (1997) 73.
- Carriazo, D., Del Arco, M., Martín, C., Rives, V., *Appl. Clay Sci.* 37 (2007) 231.
- Castignoli, G.L., Guercio, A., Vaccari, A., Lancia, R., *J. Porous Mater.* 2 (1995) 79.
- Cavani, F., Trifiró, F., Vaccari, A., *Catal. Today.* 11 (1991) 173.
- Challier, T., Slade, R.T.C., *J. Mater. Chem.* 4 (1994) 367.
- Chibwe, K., Jones, W., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* 14 (1989) 926.
- Choy, J.H., Kwak, S.Y., Jeong, Y.J., Park, J.S., *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 4042.
- Das, N.N., Konar, J., Mohanta, M.K., Srivastava, S.C., *J. Coll. Interface Sci.* 270 (2004) 1.
- Erickson, K.L., Bostrom, T.E., Frost, R.L.; *Matter Lett.* 59 (2005) 226.
- Fetter, G., Bosch, P., Lara, V., Botello, A., *J Porous Mater.* 8 (2001) 227.
- Hua, Y., Li, N., Shen, D., Hui, C., Xiang, C., Yun, C., *Appli Clay Scien.* 80-81 (2013) 443.
- Hussein, M.Z., Yahaya, A.H., Ping, L.M., *Dyes Pigments.* 63 (2004) 135.
- Gandao, Z., Coq, B., De Ménorval, L. C., Tichit, D., *Appl. Catal. A.* 147 (1996) 395.
- He, Q., Yin, S., Sato, T., *J. Phys. Chem. Solids.* 65 (2004) 395.
- Hermosin, M.C., Pavlovic, I., Ulibarri, M.A., Cornejo, J., *J. Environ. Sci. Health A.* 28 (1993) 1875.
- Iglesias, A. H., Ferreira, O. P., Gouveia, D. X., Souza, A. G., Paiva, J., Mendes, J., Alves, O. L., *J of Chem.* 178 (2005) 142.

Kaluszkova, R., Novota, M., Vymazal, Z., *Polym. Degrad. Stab.* 85 (2004) 903.

Klumpp, E., Conteras-Ortega, C., Klahre, P., Tino, F.J., Yapar, S., Portillo, C., Stegen, S., Queirolo, F., Schwuger, M.J., *Coll. Surf. A.* 230 (2003) 111.

Komarneni, S., Newalkar, B.L., Li, D., Tarun, G., Lopano, C.L., Heaney, P.J., Post, J.E., *J. Porous Mater.* 10 (2003) 243.

López, T., Bosch, P., Ramos, E., Gómez, E., Novaro, O., Acosta, D., *Langmuir* 7 (1996) 77.

Martínguez, D., Carvajal, G., Hidóxidos dobles laminares: arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología., *Avances en Química.* 87 (2012) 7.

Manohara, G. V., Kunz, D.A., Kamath, P.V., Milius, W., Breu, J.; *Langmuir.* 26 (2010) 19.

Manohara, G.V., Vishnu, P., Milius, W., *J of solid State Chem.* 196 (2012) 356.

Mascolo, G., Marino O., *Miner.Mag.* 43 (1980) 619.

Medina, F., Dutrarte, R., Tichit, B., Coq, B., Salagre P., Suerias, J.E., *J. Molec. Catal. A.* 119 (1997) 201.

Miller, J. C., Miller, J. N., Estadística para Química Analítica. Estados Unidos, Segunda Edición, Ed. Addison-Wesley Iberoamericana (1993).

Miyata, S., *Clays Clay Miner.* 31 (1983) 305.

Miyata, S., *Clays.Clays Miner.* 23 (1975) 369.

Monzón, A., Romeo, E., Royo, C., Trujillano, R., Labajos, F.M., Rives, V., *Appl. Catal. A.* 185 (1999) 53

Oriachi, C.O., Farr, I.V., Lerner, M.M., *J. Mater. Chem.* 6 (1996) 103.

Chem. Solids. 67 (2006) 920.

Palomares, A.E., Prato, J.G., Marquez, F., Corma, A., *Appl. Catal. B.* 41 (2003) 3.

Paredes, S.P., Fetter, G., Bosch, P., Bulbulian, S., *J Mater. Sci.* 41(2006) 3377.

Pavia L.D., Lampman G. M. Kriz G. S. Introduction to spectroscopy. United States of America, Thomson learning. (2001).

- Pañuela, O., *Colombia Médica*. 36 (2005).
- Prevot, V., Forano, C., Besse, J.P., *Appl. Clay Sci.* 18 (2001) 3.
- Reichle, W. T., *Solid State Ionics*. 22 (1986) 135.
- Rives, V., Ulibarri M. A., *Coord. Chem. Rev.* 181 (1999) 61.
- Rivera, J.A., Fetter, G., Jiménez, Y., Xochipa M.M., Bosch P., *Appl. Catal. A: General*. 316 (2007) 207.
- Rivera, J.A., Fetter, G., Bosch, P., *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol.5 No.3 (2006) 263.
- Skoog Douglas A., James Holler F., Nieman T.A., Principios de Análisis Instrumental, Madrid, Quinta Edición, Ed. McGraw-Hill (2001).
- Tichit, D., Rolland, A., Prinetto, F., Fetter, G., Martínez, M., Valenzuela, M., Bosch, P., *J. Mater. Chem.* 12 (2002) 3832.
- Trifiro, F. y Vaccari, A., Hydrotalcite Like Anionic Clays (Layered Double Hydroxides), *Comprehensive Supramolecular Chemistry*. 7 (1996) 251.
- Sreenivasan, T., Raveenra, S., Rauf, A., *Ind. Eng. chem Res.* 52 (2013) 11016.
- Ulibarri, M.A., Pavlovic, I., Hermosin, M. C., Cornejo, J., *Appl. Clay Sci.* 10 (1995) 131.
- Vaccari, A.; *Catal. Today*. 41 (1998) 53.
- Watanabe, T., Aoki, S., Ohta, S., Shirono, K., Tanaka, A., *PCT Int. Appl.* **WO 9730115 A1**, (1997) 18pp.
- Wang, X., Zhang, Q., *Polym. Int.* 53 (2004) 698.
- Wang, Y., Zhang, H., Wang, R., *Coll. Surf. B. Biointerfaces*. 05 (2008) 190.
- Werner, S., Wing-hei, V., Hug, S., Duppel, V., Clausen-Schaumann, H., Lotsch, V; *Langmuir*. 29 (2013) 9199.
- Xiong, Z.G., Xu, Y.M., *Chem. Mater.* 19 (2007) 1452.
- Zhang, X., Hayward, D.O., Mingos, M.P., *Catal. Lett.* 88 (2003) 33

Zhao, Y., Li, F., Zhang, R., Evans, D.G., Duan, X., *Chem. Mater.* 14 (2002) 4286.