

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Inmovilización del ligante fluorescente derivado de ttha y 1-aminometilpireno, (ttha1mpy) H_4 , en la resina Merrifield y evaluación de sus propiedades como sensor de los cationes metálicos Pb^{2+} , Cd^{2+} y Hg^{2+} .

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de

QUÍMICO BIOLÓGO CLÍNICO

Presenta:

Karol Yesenia Hernández Giottonini

Hermosillo, Sonora

Junio 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de Karol Yesenia Hernández Giottonini hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado Inmovilización del ligante fluorescente derivado de ttha y 1-aminometilpireno, (ttha1mpy) H_4 , en la resina Merrifield y evaluación de sus propiedades como sensor de los cationes metálicos Pb^{2+} , Cd^{2+} y Hg^{2+} y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico.

Dra. Lorena Machi Lara
Directora de tesis

Dr. Fernando Rocha Alonzo
Secretario

M.C. Oralia Orduño Fragoza
Vocal

M.C. José Manuel Aguilar García
Suplente

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A mis papás Cecilia y Antonio por su apoyo durante mis 24 años de vida, su manera de educarme, por alentarme a superarme y salir adelante y sobre todo por su gran cariño.

A mis hermanos por apoyarme y quererme mucho.

A mi directora de tesis Dra. Lorena Machi Lara por su tiempo, su paciencia y sus conocimientos compartidos conmigo durante la realización de este proyecto.

A mis amigos de QBC y de polímeros, especialmente a Edgar y Montoya por su amistad, a las changas que quiero mucho (Cucush y Flaqa) por aguantarme por tantos años y echarme porras y a Lalo por su disponibilidad, su ayuda y por ser un buen jefecito...gracias Lalo.

A mis sinodales Dr. Fernando Rocha, M.C. Oralia Orduño y M.C. José Aguilar por sus contribuciones en la realización de este trabajo.

A CONACYT por el apoyo brindado para realizar este trabajo (proyecto con No. Referencia 79272).

CONTENIDO

FORMA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS	3
CONTENIDO.....	4
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABLAS	8
OBJETIVOS.....	9
Objetivo general	9
Objetivos particulares	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN	11
ANTECEDENTES.....	14
Toxicidad de metales pesados	14
Sensores moleculares fluorescentes	14
Síntesis orgánica en fase solida (SOFS)	17
Inmovilización de receptores químicos a una fase solida	18
Soporte sólido.....	18
Espaciador.....	19
Grupo enlazante	19
Resina Tentagel.....	19
Resina Merrifield.....	20
Resina Wang	21
Grupos acoplantes y aditivos	22
Quimiosensores fluorescentes soportados en resinas poliméricas	22
Formación de complejos metálicos.....	23
MATERIALES Y METODOS.....	24
Reactivos	24
Metodología	24
Modificación de la resina Merrifield con distintos grupos espaciadores diamina	24
Prueba de Kaiser para detección de aminas.....	25
Inmovilización del ligante 1mpy en las resinas Merrifield funcionalizadas con los diferentes espaciadores diamina.....	25
Evaluación de la capacidad del ligante 1mpy inmovilizado en las resinas de actuar como sensor fluorescente de los metales Cd, Pb y Hg.....	25
Valoración de las soluciones metálicas.....	25
Estudios de fluorescencia	26
Pruebas de reusabilidad de los materiales.....	26
Equipo empleado.....	26

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES.....	42
RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Quimiosensor fluorescente acíclico biscromofórico, derivado de ttha, funcionalizado con pireno.....	13
2	Representación esquemática de un sensor químico. El sensor tiene un sitio de unión (receptor), un fluoróforo (detección), y un mecanismo para la comunicación entre los dos (espaciador).....	15
3.	Estructuras de los hidrocarburos policíclicos aromáticos naftaleno, antraceno y pireno.....	15
4.	Sensor biscromofórico. La formación de complejos con un catión, anión u otro analito puede facilitar la formación o desaparición de excímeros intramoleculares.....	16
5.	Quimiosensores tipo biscromofóricos L1 reportado por Shiraishi et al. y L2 y L3 reportados por Sancenon et al.....	17
6.	Representación general de los tres componentes fundamentales de la SOFS.....	18
7.	Estructura de la resina Tentagel.....	20
8.	Estructura de la resina Merrifield.....	20
9.	Estructura de la resina Wang con OH como grupo enlazante.....	21
10.	Sistema de flujo para la evaluación de la capacidad del ligante 1mpy inmovilizado en la resina Merrifield de actuar como sensor fluorescente de los metales Cd, Pb y Hg	26
11.	Modificación de la resina Merrifield con las diaminas.....	27
12.	Espectros de infrarrojo de las resinas M, M-E, M-B, M-H y M-O. Para el análisis, las muestras fueron preparadas con KBr.....	28
13.	Espectros IR de la resina Merrifield sin modificar (M) y de la resina modificada con las diferentes diaminas (M-E, M-B, M-H y M-O). Banda a 873 cm ⁻¹ indicativa del enlace C-Cl presente en la resina sin modificar.....	29
14.	Espectros de fluorescencia de la resina Merrifield sin modificar (M) y de la resina modificada con las diferentes diaminas (M-E, M-B, M-H y M-O).....	30
15.	Inmovilización del ligante 1mpy en la resina Merrifield modificada con los distintos grupos diamina.....	31

16.	Espectros de infrarrojo de las resinas M, M-E-1mpy, M-B-1mpy, M-H-1mpy y M-O-1mpy. Para el análisis, las muestras fueron preparadas con KBr.....	32
17.	Espectros de infrarrojo de las resinas M, M-E-1mpy, M-B-1mpy, M-H-1mpy y M-O-1mpy. Donde se observa la ampliación de las bandas pertenecientes al grupo amino secundario. Para el análisis, las muestras fueron preparadas con KBr.....	33
18.	Espectros de fluorescencia de: Merrifield (M), M-diaminoetano (M-E) y M-E-1mpy.....	34
19.	Espectros de fluorescencia de: Merrifield (M), M-diaminobutano (M-B) y M-B-1mpy.....	34
20.	Espectros de fluorescencia de: Merrifield (M), M-diaminohexano (M-H) y M-H-1mpy.....	35
21.	Espectros de fluorescencia de: Merrifield (M), M-diaminooctano (M-O) y M-O-1mpy.....	35
22.	Espectros de excitación y emisión de los productos finales y de la resina M sin modificar.....	36
23.	Perfil de intensidad de fluorescencia en sólido de M-H-1mpy en presencia de Pb^{2+}	37
24.	Espectros de emisión de la resina M-H-1mpy libre (negro), después de 45 min de contacto con la solución de Pb^{2+} (rojo) y regenerada por tratamiento con agua (azul).....	38
25.	Perfil de intensidad de fluorescencia en sólido de M-H-1mpy en presencia de Hg^{2+}	39
26.	Espectros de emisión de la resina M-H-1mpy libre (negro), después de 40 min de contacto con la solución de Hg^{2+} (rosa), tratamiento con agua (azul) y tratamiento con HCl (verde).....	39
27.	Perfil de intensidad de fluorescencia en sólido de M-H-1mpy en presencia de Cd^{2+}	40
28.	Espectros de emisión de la resina M-H-1mpy libre (negro), después de 80 min de contacto con la solución de Cd^{2+} (rosa), tratamiento con agua (azul) y tratamiento con HCl (verde).....	41

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Tabla 1. Datos espectroscópicos de la resina Merrifield (M) sin modificar y modificada con los diferentes espaciadores (M-diamina). λ_{ex} , λ_{em} e I_R de los nuevos materiales respecto a la emisión de la resina Merrifield (I_M), $I_R=I/I_M$.	30
2.	Tabla 2. Datos espectroscópicos de la resina Merrifield (M) sin modificar y en sus formas finales funcionalizada con el ligante 1mpy (M-diamina-1mpy). λ_{ex} , λ_{em} e I_R de los nuevos materiales respecto a la emisión de la resina Merrifield (I_M), $I_R=I/I_M$.	33

OBJETIVOS

Objetivo General

Inmovilizar al ligante fluorescente tipo bis-pirenil derivado del ácido trietilentetraaminohexaacético, (ttha1mpy)H₄, en la resina polimérica Merrifield modificada con distintos espaciadores diamina y evaluar las propiedades de los nuevos materiales como sensores de los metales Cd²⁺, Pb²⁺ y Hg²⁺.

Objetivos particulares

1. Modificar la resina Merrifield (**M**) con cuatro grupos espaciadores diamina: diaminoetano (**E**), diaminobutano (**B**), diaminohexano (**H**) y diaminooctano (**O**).
2. Inmovilizar al ligante (ttha1mpy)H₄ en las resinas Merrifield modificadas con los distintos espaciadores.
3. Caracterizar a los materiales obtenidos en cada etapa de síntesis por las técnicas de infrarrojo y fluorescencia.
4. Seleccionar al material con mejores propiedades fluorescentes y evaluar sus propiedades como sensor fluorescente de los metales divalentes Cd²⁺, Pb²⁺ y Hg²⁺.

RESUMEN

Se inmovilizó al ligante fluorescente tipo bis-pirenil derivado del ácido trietilentetraaminohexaacético (ttha1mpy) H_4 , en la resina polimérica Merrifield modificada con distintos espaciadores diamina y se obtuvieron cuatro nuevos materiales: M-E-1mpy; M-B-1mpy; M-H-1mpy y M-O-1mpy, los cuales presentaron bandas de emisión anchas, localizadas en el intervalo de 425 a 550 nm. El material M-H-1mpy presentó la mayor intensidad de fluorescencia y un espectro similar al del ligante 1mpy en solución, por lo que se eligió este material para estudiar su respuesta hacia los iones Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} .

Al evaluar las propiedades como sensor fluorescente de los metales divalentes Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} se observó una disminución de la intensidad de fluorescencia del material M-H-1mpy. Se encontró que el material M-H-1mpy libera al ion Pb^{2+} restableciendo completamente la intensidad de la fluorescencia, lo que permite reutilizarlo para mediciones con otros metales.

INTRODUCCION

La civilización humana y el consiguiente aumento de la actividad industrial han redistribuido poco a poco muchos metales tóxicos de la corteza terrestre en el medio ambiente por lo que se ha dado un aumento de la posibilidad de exposición a estos metales (Chowdhury y Chandra, 1987). Los seres humanos estamos expuestos a estos metales a partir de numerosas fuentes, incluyendo al aire, el agua, el suelo y los alimentos (Ercal y col., 2001).

Los metales cadmio, plomo y mercurio son particularmente importantes debido a su alto uso industrial. Estos metales no tienen ninguna función biológica y son tóxicos incluso a dosis bajas.

El cadmio es tóxico a niveles extremadamente bajos. En los seres humanos, la exposición a largo plazo puede causar disfunción renal. La exposición a niveles altos puede conducir a enfermedad pulmonar obstructiva; también se asocia con defectos óseos, aumento de la presión arterial y disfunciones miocárdicas. La exposición severa puede causar edema pulmonar e incluso la muerte (Duruibe y col., 2007). El cadmio fue clasificado como carcinógeno humano en 1993 y se asocia con cáncer de pulmón, próstata, hígado, riñón y estómago (Waalkes, 2000).

El plomo es el metal con propiedades tóxicas que más se ha propagado en el ambiente en las últimas décadas. Un efecto grave particular de la toxicidad del plomo es su efecto teratogénico. El plomo tiene efectos tóxicos en muchos órganos, sistemas y procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo de la línea roja hemática, los riñones, el sistema cardiovascular, el aparato reproductor y, probablemente el aspecto de mayor gravedad, el desarrollo del sistema nervioso central (Sanín y col., 1998).

Entre los metales tóxicos, el mercurio se ha señalado como uno de los contaminantes más peligrosos. Esto es debido a su propiedad única, en forma metilada, de bioacumulación. La exposición a niveles bajos puede afectar las habilidades motoras, lenguaje, la audición y la visión. A altas concentraciones el metal puede causar retraso mental, parálisis cerebral e incluso la muerte (Gordon y Balasubramanian, 1999).

La detección y el control de estos analitos es, por lo tanto, una tarea esencial. Una manera rápida de detectar analitos es el uso de sensores químicos, en particular aquellos que presentan fluorescencia, debido al bajo límite de detección y a la fácil accesibilidad de esta técnica (Lodeiro y Pina, 2009).

El concepto de sensor químico fue definido por Czarnik, como una molécula que contiene un sitio de unión al analito (receptor), una unidad de detección (fluoróforo) y una unidad molecular que interconecta al receptor con el fluoróforo y que modula la comunicación entre ambos (espaciador) (Lodeiro y Pina, 2009).

En aquellos casos en los que la unidad de detección posee dos cromóforos idénticos unidos a través de una cadena de interconexión, los sensores se denominan biscromofóricos. Cuando la cadena de interconexión está diseñada apropiadamente, estos compuestos pueden formar dímeros intramoleculares en el estado excitado, denominados excímeros, por asociación de las dos unidades cromóforas (Machi y col., 2007). La emisión de excímero se observa a longitudes de onda mayores que la de las unidades monoméricas que lo forman y presenta mayor sensibilidad a cambios en el ambiente químico (Machi y col., 2009). Entre los diferentes grupos fluorescentes utilizados como unidad cromófora, el pireno destaca por sus propiedades fotofísicas sobresalientes como son: excelente luminiscencia, con rendimientos cuánticos altos, $\Phi_{\text{etanol}} = 0.65$, tiempos de vida largos, $t_{s \text{ etanol}} = 410 \text{ ns}$, y facilidad de formación de excímeros.

En la literatura se encuentran reportados una variedad de quimiosensores fluorescentes biscromofóricos basados en pireno que responden a la coordinación de analitos metálicos con variación en la intensidad de excímero. Todos estos compuestos han sido probados únicamente en solución.

Una mejor aproximación al desarrollo de dispositivos sensores con utilidad práctica es inmovilizar a este tipo de compuestos en matrices poliméricas. A los polímeros utilizados como material de soporte para síntesis se les llama resinas poliméricas y al tipo de procedimiento se le conoce como síntesis orgánica en fase sólida (**SOFS**).

La inmovilización de un sensor químico en un soporte sólido ofrece varias ventajas:

Mayor estabilidad del sistema

Permite realizar lecturas continuas, con un menor consumo de reactivo

Permite adecuar al sensor al medio en el que se van a realizar las mediciones (Casanovas y col., 2005).

En el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora, el grupo de Química Supramolecular ha reportado una serie de quimiosensores fluorescentes acíclicos biscromofóricos, solubles en agua, derivados de edta, dtpa o ttha, funcionalizados con pireno (Machi y col., 2009; Pérez y col., 2011; Ávila, 2010). Este grupo de compuestos presenta bandas de emisión características tanto de monómero como de excímero, las cuales son sensibles a cambios de pH y a la presencia de cationes metálicos.

En particular, el ligante (ttha1mpy) H_4 (Figura 1), presenta una intensa emisión de fluorescencia que se caracteriza por un grupo de bandas típicas de pireno monomérico, localizadas entre 375 y 395 nm, así como una banda ancha, centrada en 488 nm aproximadamente, característica de dímeros de pireno que se forman en el estado excitado (excímeros). Por sus propiedades físicas y estructurales, el ligante (ttha1mpy) H_4 , abreviado como 1mpy a partir de este punto, tiene un gran potencial como material sensor fluorescente para iones metálicos. Como parte de los resultados de un trabajo previo de este grupo de investigación (Ávila, 2010) se reportó la respuesta fluorescente del compuesto 1mpy al coordinarse a diferentes cationes metálicos, entre ellos los metales pesados Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} . La coordinación del ligante 1mpy con Cd^{2+} en agua (pH=7.9) provocó una respuesta radiométrica de la fluorescencia de la molécula, específicamente disminución en la intensidad de emisión del excímero y aumento en la intensidad de emisión de monómero. Esta propiedad es de relevancia ya que, además de ser de gran valor analítico, son pocos los sensores fluorescentes reportados en la literatura que responden de esta forma a la coordinación con cadmio en medio acuoso (Machi y col., 2007). Contrario a lo anterior, la unión a Pb^{2+} o Hg^{2+} provocó una disminución en la intensidad de emisión del ligante 1mpy en todo el intervalo de longitudes de onda, lo cual permitiría sensor al Cd^{2+} aún en presencia de dichos metales por el aumento en la intensidad de emisión de monómero (Ávila, 2010).

Con base en lo anterior, en este trabajo de tesis se plantea inmovilizar al ligante 1mpy en la resina polimérica Merrifield para evaluar sus propiedades como sensor de los metales divalentes Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} .

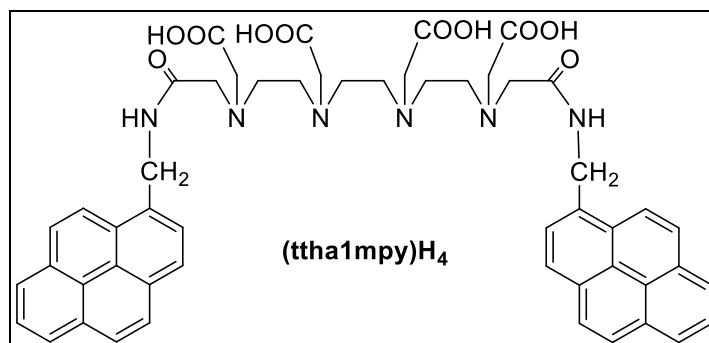


Figura 1. Quimiosensor fluorescente acíclico biscromofórico, derivado de ttha, funcionalizado con pireno.

ANTECEDENTES

Toxicidad de metales pesados

El término "metal pesado" se refiere a cualquier elemento metálico que tiene una densidad relativamente alta y es tóxico o venenoso incluso a una concentración baja (Chowdhury y Chandra, 1987). Los metales pesados se clasifican en dos grupos:

Oligoelementos o micronutrientes. Necesarios en pequeñas cantidades para los organismos, pero tóxicos una vez pasado cierto umbral. Incluyen As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn.

Sin función biológica conocida. Son altamente tóxicos, e incluyen Ba, Cd, Hg, Pb, Sb, Bi (Casanovas y col., 2005).

Los metales pesados considerados tóxicos cumplen los siguientes criterios:

Son tóxicos al ser humano.

Causan perturbaciones a los ciclos biogeoquímicos (Morton, 2006).

Entre los mecanismos moleculares que determinan la toxicidad de los metales pesados se encuentran:

- 1) El desplazamiento de iones metálicos esenciales de biomoléculas y bloqueo de sus grupos funcionales.
- 2) Modificación de la conformación activa de biomoléculas, especialmente enzimas y polinucleótidos.
- 3) Ruptura de la integridad de biomoléculas.
- 4) Modificación de otros agentes biológicamente activos. (Cañizares, 2000)

Los metales pesados cadmio, plomo y mercurio son especialmente frecuentes en la naturaleza debido a su alto uso industrial. Estos metales no tienen ninguna función biológica y son tóxicos incluso a dosis bajas.

Sensores moleculares fluorescentes

La detección y el control de analitos es una tarea esencial en muchas de las actividades humanas, como son la agricultura, la alimentación, las ciencias ambientales y de la salud. Por lo anterior, es fácil predecir un aumento tanto en la demanda de dispositivos capaces de llevar a cabo dichas funciones, como en la búsqueda de compuestos cuyas propiedades se modifiquen en la presencia de un analito diana, el cual es posible detectar mediante el uso de sensores químicos, en particular aquellos que presentan fluorescencia, debido al bajo límite de detección y fácil accesibilidad de esta técnica (Lodeiro y Pina, 2009).

En 1990 Wolfbeis definió a los sensores químicos como dispositivos de tamaño pequeño que comprenden un elemento de reconocimiento, un elemento de transducción, y un procesador de señal capaz de informar continuamente y de manera reversible una concentración química.

Algunas de las funciones que los sensores químicos deben ser capaces de realizar son:

- Transformar cantidades químicas en señales eléctricas
- Responder rápidamente

Mantener su actividad durante un período de tiempo largo (Gründler, 2007).

El concepto de sensor químico fue definido por Czarnik, como una molécula que contiene un sitio de unión (receptor), un fluoróforo (unidad de detección), y un mecanismo para la comunicación entre los dos (a través del espaciador) (véase la Figura 2) (Lodeiro y Pina, 2009).

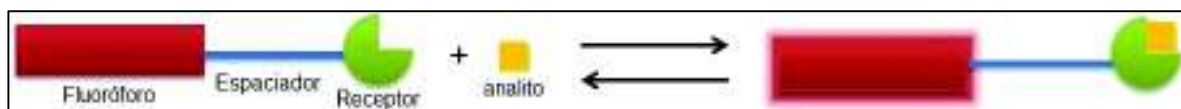


Figura 2. Representación esquemática de un sensor químico. El sensor tiene un sitio de unión (receptor), un fluoróforo (detección), y un mecanismo para la comunicación entre los dos (espaciador).

Un sensor fluorescente efectivo debe convertir el reconocimiento selectivo de cationes en una señal fácil de monitorear (Lee y col., 2009). La unidad de detección desempeña un papel central en el funcionamiento del sensor químico, función para la cual los hidrocarburos aromáticos han sido ampliamente usados debido a sus buenos rendimientos cuánticos de emisión de fluorescencia. Algunos de los fluoróforos más utilizados son los policíclicos aromáticos naftaleno, antraceno y pireno (Figura 3) (Lodeiro y Pina, 2009).

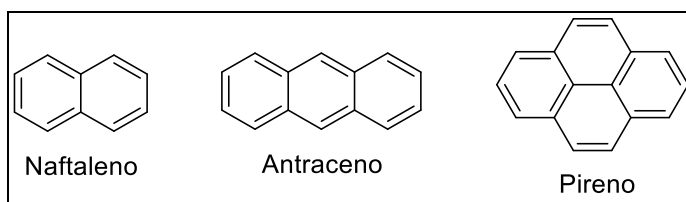


Figura 3. Estructuras de los hidrocarburos policíclicos aromáticos naftaleno, antraceno y pireno.

(21)

Entre los diferentes fluoróforos utilizados para el diseño de nuevos sensores químicos, el pireno destaca ya que proporciona muchas características sobresalientes, tales como una emisión de fluorescencia con alto rendimiento cuántico a aproximadamente 488 nm, una larga vida del estado excitado, y la posibilidad de formar dímeros, tanto en el estado basal como en el excitado (excímeros), lo que provoca cambios notables en el espectro de la fluorescencia (Prodi y col., 2000). En aquellos casos en los que la unidad de detección posee dos o más cromóforos los sensores se denominan biscromofóricos, estos pueden formar excímeros intramoleculares cuando las unidades de interconexión de las cadenas (o espaciadores) están diseñadas apropiadamente (Figura 4) (Machi y col., 2007).

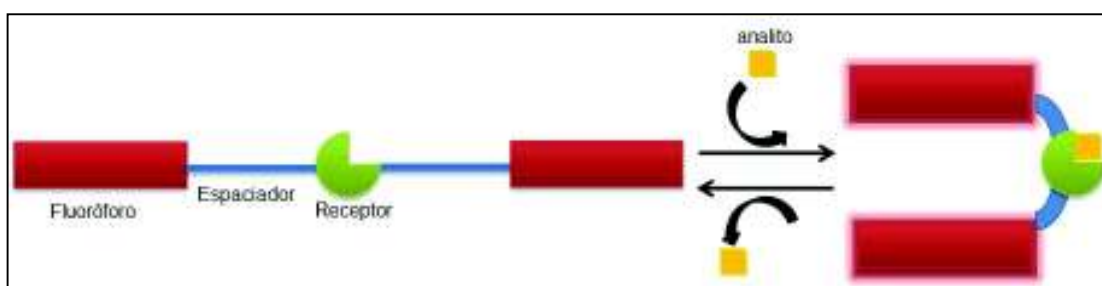


Figura 4. Sensor biscromofórico. La formación de complejos con un catión, anión u otro analito puede facilitar la formación o desaparición de excímeros intramoleculares.

La sensibilidad de los sensores biscromofóricos a un cambio en el ambiente químico es mayor que la del cromóforo monomérico correspondiente (Machi y col., 2009). En la literatura se encuentran reportados diversos ejemplos de sensores biscromofóricos de metales que contienen poliaminas lineales y poliéteres funcionalizados con naftaleno, antraceno o pireno como cromóforos en los extremos de la cadena (Machi y col., 2009). Sin embargo, normalmente los sensores derivados de pireno tienen muy baja solubilidad en agua debido a la alta hidrofobicidad de dicha unidad aromática. Sólo se han reportado unos pocos sensores *bis*-pirenil solubles en agua (Machi y col., 2009).

Entre los quimiosensores fluorescentes tipo *bis*-pirenil solubles en agua reportados se encuentra la poliamina L1 sintetizada por Shiraishi *et al.* (Sancenón y col., 2012) (Figura 11). Este derivado mostró emisión de excímero. Los autores estudiaron los efectos de la adición de cationes metálicos (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{+}) en las propiedades de emisión de L1.

Otras poliaminas funcionalizadas con pireno reportadas son las sintetizadas y caracterizadas por Sancenón *et al.* (Shiraishi y col., 2007) L2 y L3 (Figura 5). Los autores

estudiaron la protonación, coordinación hacia diversos iones metálicos y el comportamiento de fluorescencia de los ligandos en acetonitrilo-agua 70:30 v/v. Estos ligandos mostraron ser sensores químicos adecuados para la detección fluorimétrica de ciertos cationes metálicos mostrando un notable aumento en la fluorescencia en medio básico.

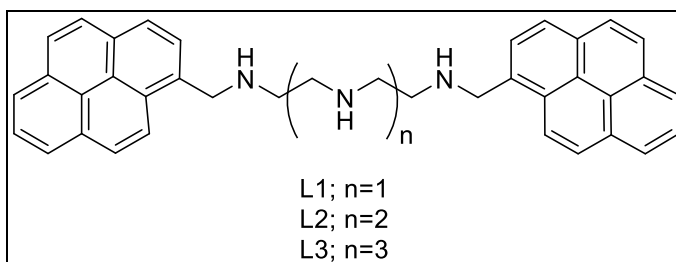


Figura 5. Quimiosensores tipo biscromofóricos L1 reportado por Shiraishi et al. y L2 y L3 reportados por Sancenón et al. (Shiraishi y col., 2007)

En el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora (DIPM-UNISON), el grupo de Química Supramolecular ha reportado una serie de quimiosensores fluorescentes acíclicos biscromofóricos, solubles en agua, derivados de edta, dtpa o ttha, funcionalizados con pireno (Machi y col., 2009; Pérez y col., 2011; Ávila, 2010). Este grupo de compuestos presenta bandas de emisión características tanto de monómero como de excímero, las cuales son sensibles a cambios de pH y a la presencia de cationes metálicos.

Síntesis orgánica en fase sólida (SOFS)

La síntesis orgánica en fase sólida es un área de rápida expansión de la química de síntesis. Es un método en el que las transformaciones sintéticas se llevan a cabo con una de las moléculas de reactivo unida a un material insoluble denominado soporte sólido (Gordon y Balasubramanian, 1999). El primer informe sobre el empleo de SOFS fue en 1963, cuando Bruce Merrifield desarrolló la metodología para la síntesis de péptidos, usando polímeros insolubles e inertes, que utilizó como soportes para la síntesis. (Amaral y col., 2003)

La síntesis orgánica en fase sólida presenta diferentes ventajas con respecto a la síntesis en solución:

- Los reactivos en un soporte sólido se eliminan fácilmente de las reacciones por filtración.
- Se puede utilizar un exceso de reactivos para conducir las reacciones a su finalización sin introducir dificultades en la purificación.

- El reciclaje de reactivos recuperados es económico.
- Las propiedades químicas se pueden ajustar modificando la elección del soporte y su preparación.
- Reactivos tóxicos, explosivos y/o nocivos a menudo se manejan con más seguridad cuando están inmovilizados en el soporte sólido.
- Los reactivos inmovilizados en un soporte sólido reaccionan de manera diferente, en su mayoría de forma más selectiva, que sus contrapartes no inmovilizadas.
- Las reacciones pueden a menudo ser conducidas de tal forma que se obtengan mayores rendimientos que los obtenidos en su reacción correspondiente en solución. (Ávila, 2010)

Inmovilización de receptores químicos a una fase sólida

Actualmente el método más utilizado para la inmovilización de receptores químicos es la SOFS.

La inmovilización de un receptor químico en un soporte sólido ofrece varias ventajas:

Mayor estabilidad del sistema

Permite realizar lecturas continuas, con un menor consumo de reactivo

Permite adecuar al sensor al medio en el que se van a realizar las mediciones. (Casanovas y col.,2005)

La síntesis orgánica en fase sólida cuenta con tres componentes fundamentales: soporte sólido, espaciador y grupo enlazante (Figura 6).

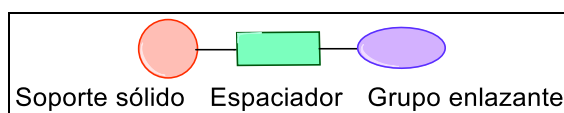


Figura 6. Representación general de los tres componentes fundamentales de la SOFS.

Soporte sólido

Los soportes sólidos son polímeros insolubles (resinas), que a menudo se componen de poliestireno, inertes a las condiciones de reacción empleadas. De manera general, se puede describir una resina utilizada como soporte sólido como una estructura compleja, la cual está formada por cadenas de polímeros lineales, compuestos de unidades repetidas de monómeros idénticos, formando una especie de red. Las cadenas se encuentran interconectadas transversalmente a través de un monómero bifuncional (reticulación) formando en la mayoría de ellas una esfera de tamaño estandarizado (Marquardt y Eifler, 2001).

En cuanto a las características físicas de las resinas (grado de resistencia a la agitación mecánica, temperatura y presión; comportamiento cuando está en contacto con solventes, etc.), éstas están fuertemente influenciadas por el grado de entrecruzamiento en el polímero (Marquardt y Eifler, 2001). Entre otros factores, la solvatación de la resina utilizada en el medio de reacción es crucial en la transformación rápida y completa. Cuando las perlas de resina no presentan un buen hinchamiento en los disolventes utilizados, esto puede resultar en mala accesibilidad a los sitios de reacción provocando la disminución de las velocidades de reacción (Santini y col., 1998).

Espaciador

El espaciador es la parte de la resina que une al material polimérico y al grupo enlazante. Este puede variar en longitud, pero debe mantener la condición de ser químicamente estable durante la síntesis o cuando se lleve a cabo la separación del material soportado (Marquardt y Eifler, 2001).

Grupo enlazante

El grupo enlazante une una molécula de sustrato a la fase sólida. En muchos sentidos, los grupos enlazantes poseen similitudes con los grupos protectores de química en solución y muchos de ellos se han desarrollado por analogía a estos.

Una característica importante de considerar de un grupo enlazante es la capacidad de reciclar, es decir, que la estructura de este sea regenerada tras la liberación del sustrato, permitiendo de este modo otro ciclo de síntesis o ensayo en la misma resina (Marquardt y Eifler, 2001). Actualmente se encuentran disponibles comercialmente diversas resinas, siendo de las más utilizadas las resinas Merrifield, Wang y Tentagel.

Resina Tentagel

Las resinas Tentagel, originalmente desarrolladas por *Bayer y Rapp*, consisten en una matriz de poliestireno (PS) enlazada covalentemente a cadenas de polietilenglicol (PEG). La Figura 7 muestra la estructura de la resina Tentagel. Estas resinas se pueden preparar por anclaje del PEG, funcionalizado convenientemente, sobre el poliestireno o bien por polimerización del oxireno sobre un soporte de poliestireno hidroxilado (Collado, 2004).

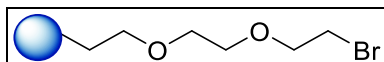


Figura 7. Estructura de la resina Tentagel.

La resina Tentagel se encuentra disponible comercialmente. Consiste en una matriz porosa de PS-DVB (30%, 1% de entrecruzamiento, DVB=divinilbenceno) y PEG (70%) con un peso molecular medio de 3000 g/mol. Esta resina es mucho más hidrofílica que el PS-DVB puro y puede hincharse con una extensa variedad de disolventes. La carga de los grupos funcionales de la resina Tentagel va de 0.15 a 0.30 mmol/g. En esta resina las cadenas de PEG son más móviles que en el PS entrecruzado. Esto permite la realización de espectros de RMN bien resueltos de las especies ancladas sobre tentagel. El PS-DVB u otros polímeros menos móviles dan señales de RMN muy anchas, a menos que se utilicen técnicas especiales.

Se ha propuesto que la gran movilidad de las cadenas ancladas sobre Tentagel proporcionarían un ambiente cuasi-solución, lo que permitiría reacciones más rápidas. Investigaciones recientes muestran, sin embargo, que la velocidad de las reacciones sobre soportes poliméricos depende, marcadamente, del tipo de reacción y de los reactivos que intervienen, y así, hay reacciones que son más rápidas sobre PS-DVB que sobre Tentagel (Collado, 2004).

Resina Merrifield

La resina de Merrifield, que tiene este nombre en honor al investigador responsable del diseño de la SOFS (Bruce Merrifield, de la Universidad Rockefeller, que le valió el premio Nobel en 1984), se caracteriza químicamente como PS/DVB/clorometilo (Figura 8). Los grupos clorometilo se encuentran unidos a grupos fenilo presentes en el polímero y es ahí donde tiene lugar la unión del sustrato que se fijará a la resina para luego reaccionar con otros; este grupo ofrece numerosas posibilidades de transformación a través de reacciones de sustitución nucleofílica. Esta resina sigue siendo de las más utilizadas (Mata, 1997).

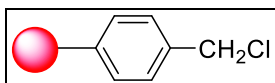


Figura 8. Estructura de la Resina Merrifield.

La resina Merrifield es utilizada para inmovilizar ácidos carboxílicos y alcoholes para la síntesis en fase sólida de una diversidad de compuestos derivados de dichas sustancias, en su mayoría péptidos, también es usada como material de partida para la preparación de diversas resinas modificadas. Se puede utilizar para la preparación de compuestos individuales, así como bibliotecas de compuestos, ya sea en una mezcla o en un modo paralelo (Pilar y Albericio, 2003). La resina Merrifield es insoluble en todos los disolventes orgánicos. Las perlas microporosas muestran buenas propiedades de hinchamiento (> 4 ml/g) en CH_2Cl_2 , DMF (dimetilformamida), THF (*tetrahidrofurano*), dioxano, y TFA (*ácido trifluoroacético*). Las perlas macroporosas, por otra parte, son rígidas, no se hinchan, y permiten la rápida difusión de disolventes y reactivos, por lo tanto estas perlas macroporosas no se limitan a utilizar en disolventes con buenas propiedades de hinchamiento y son adecuados para su uso generalizado en todo el rango de polaridad del disolvente (Pilar y Albericio, 2003).

Resina Wang

La resina *PS Hidroxi-alquilo*, mejor conocida como resina de Wang (Figura 9), contiene un grupo hidroxilo como parte fundamental del ligante y muchas de las reacciones que presenta son similares a la resina de Merrifield, principalmente en relación a las técnicas de separación (Marquardt y Eifler, 2001).

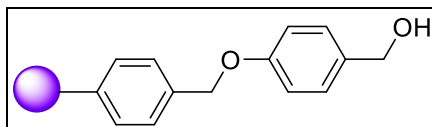


Figura 9. Estructura de la Resina Wang con OH como grupo enlazante.

La unión de sustratos a este polímero puede, por ejemplo ser obtenido con la ayuda de un grupo carboxilato. La diferencia fundamental entre las resinas de Wang y las de Merrifield se encuentra en la gran labilidad de ligando de la primera frente a medio ácido, lo que permite el uso de medios de separación no agresivos. Con respecto a la solvatación, hay gran semejanza entre estas resinas, la resina de Wang muestra en general una alta expansión en tetrahidrofurano, expansión promedio en una mezcla de agua/tetrahidrofurano y prácticamente no solvatación en metanol (Marquardt y Eifler, 2001).

En un ejemplo encontrado en la literatura reciente los autores describieron los diferentes rendimientos para una reacción de sustitución, involucrando una serie de aminas terciarias y

ésteres α -halogenados unidos a la resina, frente a diferentes disolventes. Se observó que los rendimientos fueron bajos en diclorometano, aunque este sea reconocido como un buen disolvente para resinas, moderados en diclorometano/dimetilformamida e isopropilamina, altos en acetonitrilo y máximo (95%) en dimetilsulfóxido, tal como se esperaba para este tipo de reacción, siendo este el disolvente elegido. El ejemplo muestra claramente el comportamiento particular de este tipo de resina frente a algunos disolventes, por lo tanto éstos deben ser seleccionados cuidadosamente (Marquardt y Eifler, 2001).

Grupos acoplantes y aditivos

Junto con el surgimiento de la SOFS se han vuelto muy importantes los cambios en estrategias de grupos de protección y soportes sólidos, muchos de los esfuerzos se han centrado en el desarrollo más eficiente de reactivos de acoplamiento en comparación con los utilizados originalmente como las carbodimidias y en los últimos 10 años se han utilizado reactivos de acoplamiento y aditivos tales como, HOAt (1-hidroxi-7-abanzotriazol), HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroniohexafluorofosfato), PyBOP (Benzotriazol-1-iloxi tripirrolidinofosfonio) que han sido introducidos con el objetivo de aumentar los rendimientos y reducir las reacciones laterales.⁽²²⁾ Recientemente el uso simultáneo de grupos acoplantes y aditivos, tales como DIC / HOBt, han contribuido a llevar a cabo reacciones con mayor rapidez y con altos rendimientos mejorando la eficiencia de la síntesis además de suprimir la racemización (Díaz y col., 2006).

Quimiosensores fluorescentes soportados en resinas poliméricas

En la literatura se encuentran varios reportes de quimiosensores fluorescentes soportados en resinas poliméricas. Entre los quimiosensores fluorescentes reportados está la biblioteca combinatoria de 80 derivados de EDTA amida α -aminonaftaleno- γ -ácido sulfónico en cuatro soportes diferentes con enlazadores de tipo alquildiaminas de longitud variable sintetizada por Santacruz - Ortega, H *et al.* Los autores estudiaron el comportamiento de fluorescencia de estos materiales para la detección de metales de transición (Santacruz y col., 2009).

Rivero *et al.* reportan la inmovilización en varios soportes sólidos de 20 derivados de 1,4,10,13-tetraoxa-7,15-diaza-ciclooctadecano con grupo dansil como unidad fluorescente para la detección de iones de metales alcalinos y alcalinotérreos. Los autores estudiaron el comportamiento de fluorescencia mediante análisis de inyección de flujo (Rivero y col., 2004).

Nath, S. y Maitra, U., A reportan sensores de PET basados en ácido quenodesoxicólico

para iones de metales alcalinos inmovilizados sobre las resinas Merrifield y Tentagel. Observaron que la fluorescencia de las perlas del sensor se ve reforzada con la unión de los cationes (Nath y Maitra, 2006).

Otro sensor reportado es el inmovilizado por Joshi, B. P *et al.* Los autores realizaron la inmovilización de un sensor péptido fluorescente en una resina PEG-PS e investigaron la capacidad de detección de iones metálicos en soluciones acuosas usando un espectrofluorómetro con agitador (Joshi y col., 2014).

Formación de complejos metálicos

Un complejo es una asociación entre un átomo metálico o ión y un ligando, que es un anión o una molécula polar. Todos los metales son capaces de formar complejos. En un complejo, el metal se comporta como un ácido de Lewis (aceptor de electrones) y el ligando como una base de Lewis (donante de electrones). La donación de un par de electrones de un ligando a un metal establece un enlace coordinado. Los ligandos pueden agruparse en monodentados, los cuales contienen un solo átomo donante y se unen al metal en una sola posición, y polidentados que tienen dos o más átomos donantes que pueden simultáneamente unirse al metal en dos o más posiciones (Wozniak y Martineau, 2007). Los complejos de ligandos polidentados se llaman complejos quelatados o simplemente quelatos. En general, los quelatos son más estables que los complejos monodentados debido a su mayor número de enlaces entre el metal y los ligandos (Wozniak y Martineau, 2007).

Los cationes pueden formar, en general, varios enlaces coordinados, normalmente hasta un máximo de dos, de cuatro o de seis, según los casos, aunque se conocen también excepciones. Se designa este número máximo con el nombre de índice de coordinación. Las especies producidas como consecuencia de la formación de enlaces coordinados pueden poseer carga eléctrica positiva o negativa, o ser neutras (Skoog, 2002). Constituyendo ejemplos comunes de ligandos simples que forman complejos con muchos metales se encuentran especies como la molécula de agua, la de amoníaco, el ion cloruro, el ion cianuro y otros (Skoog, 2002).

Los parámetros del acomplejamiento de los ligantes sobre soportes, depende de la naturaleza del esqueleto polimérico, la naturaleza y extensión del agente entrecruzante, la naturaleza del ligando y su distribución y accesibilidad en el polímero (Seqa, 2003).

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

El ligante 1mpy fue proporcionado por la Dra. Lorena Machi. El resto de los reactivos que se emplearon en el presente trabajo de tesis se obtuvieron comercialmente y se enlistan a continuación:

- N,N-dimetilformamida (DMF), marca Sigma
- K_2CO_3 , marca Sigma
- Acetona, marca Fermont
- N, N'-Diisopropilcarbodiimida (DIC), marca Aldrich Chemical
- 1-Hidroxibenzotriazol, hidrato (HOBt), marca Aldrich Chemical
- Resina Merrifield (cargado 1.5 mmol/g), marca Aldrich
- Ácido clorhídrico marca J.T. Baker
- Etilendiamina, marca Fluka
- Butilendiamina, marca Fluka
- Diaminohexano, marca Aldrich
- Diaminooctano, marca Aldrich
- Ácido etilendiaminotetraacético sal disódica (EDTA- Na_2), marca Aldrich
- $CdCl_2$, marca Aldrich
- $PbCl_2$, marca Aldrich
- $HgCl_2$, marca Baker Analyzed

Metodología

Modificación de la resina Merrifield con distintos grupos espaciadores diamina

En un matraz de reacción se colocó 250 mg de la resina Merrifield y se añadió 15 mL de dimetilformamida (DMF). Posteriormente se adicionaron 208 mg de K_2CO_3 y de las diaminas. El matraz de reacción se dejó en agitación mecánica constante por 36 horas. Transcurrido el tiempo de reacción la resina se lavó con agua, DMF y acetona. Posteriormente se secó a vacío por 10 horas. Al final se obtuvieron aproximadamente 0.230 g de cada uno de los materiales.

Prueba de Kaiser para detección de aminas

Se colocó una pequeña cantidad de la resina modificada en tubos de ensayo y se añadieron 2 gotas de piridina, 2 gotas de fenol y 2 gotas de ninhidrina/etanol a cada tubo. A continuación se calentaron los tubos en baño María por aproximadamente 2 minutos y finalmente se observó la coloración que tomó la disolución. Una vez verificada la presencia de los espaciadores en los diferentes materiales, se tomaron los espectros de infrarrojo tanto de la resina sin modificar, como de las resinas modificadas.

Inmovilización del ligante 1mpy en las resinas Merrifield funcionalizadas con los diferentes espaciadores diamina

En un matraz de reacción se colocó 100 mg de la resina modificada con 66.79 mg de ligante 1mpy, se añadió N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) y 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt), posteriormente se le adicionó DMF y se mantuvo en agitación mecánica por 24 horas. Después se hicieron lavados con DMF, agua y acetona para eliminar residuos de HOBt y DIC, y se secó en la estufa de vacío por 10 horas. Al final se obtuvieron aproximadamente 85 mg de cada uno de los materiales.

Evaluación de la capacidad del ligante 1mpy inmovilizado en las resinas de actuar como sensor fluorescente de los metales Cd, Pb y Hg

Valoración de las soluciones metálicas

Para realizar la valoración de las soluciones metálicas se agregaron en un matraz 3 gotas del indicador, 5 mL de buffer amonio y 0.1 mL de solución del metal a valorar. Para $PbCl_2$ y $HgCl_2$ se utilizó el indicador Anaranjado de Metilo y Negro de Eriocromo T para $CdCl_2$. Después se colocó en una bureta una solución valorada de EDTA disódico ($EDTANa_2$) 0.01 M, la cual se fue añadiendo gota a gota a cada uno de los matraces hasta que el indicador evidenció que fue alcanzado el punto final práctico de la titulación por un viraje de color; en el caso del indicador Anaranjado de Metilo el color de la solución viró de rojo a amarillo y al utilizar el Negro de Eriocromo T viró de morado a azul. Por último se midió el volumen consumido de EDTA, encontrando que este volumen fue de 0.15 mL y mediante un cálculo estequiométrico sencillo se calculó la concentración de cada una de las soluciones metálicas la cual fue de 0.015 M.

Estudios de fluorescencia

Se colocaron aproximadamente 25 mg de la resina Merrifield a evaluar en una celda de flujo marca Hellma QS de una capacidad de 8 μ l, se hizo pasar la solución estandarizada de cada una de las sales metálicas (CdCl_2 , PbCl_2 , HgCl_2 de concentración 0.005 M) con la ayuda de una bomba peristáltica por algunos minutos a una velocidad de flujo de 1.2 mL/min y se tomaron los espectros de fluorescencia. (Véase la Figura 10).

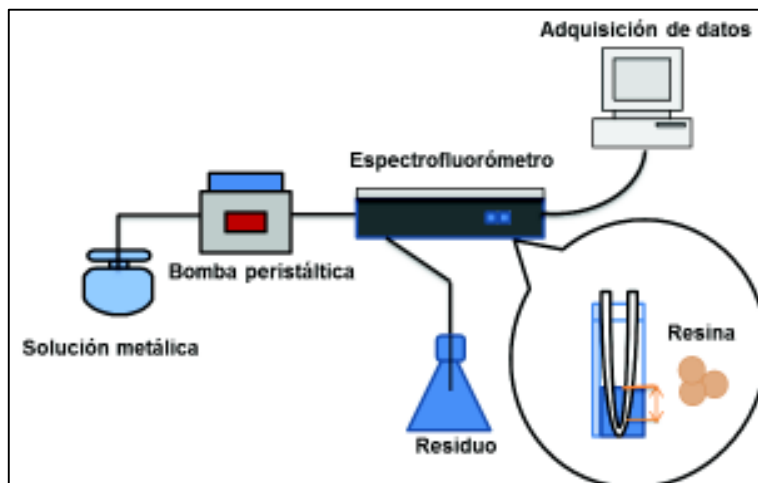


Figura 10. Sistema de flujo para la evaluación de la capacidad del ligante 1mpy inmovilizado en la resina Merrifield de actuar como sensor fluorescente de los metales Cd, Pb y Hg.

Pruebas de reusabilidad de los materiales

Después de cada medición de fluorescencia con los metales, se pasó por varios minutos agua, agua/HCl 0.01 M por el sistema de flujo y se obtuvieron de nuevo los espectros de fluorescencia para comprobar si se restablecía la intensidad original de emisión de fluorescencia del material.

Equipo empleado

Los espectros de emisión y de excitación se obtuvieron en un espectrofotómetro de Luminiscencia marca Perkin-Elmer, modelo LS50B.

Los espectros de infrarrojo de los materiales obtenidos en cada una de las etapas de síntesis se obtuvieron en pastillas de KBr, utilizando un espectrómetro FT-IR marca Perkin-Elmer Modelo Spectrum GX.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modificación de resinas y prueba de detección de amina

En este trabajo se llevó a cabo la inmovilización del ligante 1mpy en la resina polimérica Merrifield con el objetivo de contribuir al desarrollo de nuevos materiales sensores con un alto nivel de sensibilidad y selectividad para la detección y cuantificación de cationes metálicos de gran interés médico y ambiental. Se realizaron titulaciones fluorimétricas del ligante inmovilizado en la resina con los metales divalentes Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} para evaluar sus propiedades como sensor de dichos analitos. La resina fue previamente modificada con grupos espaciadores diaminoetano (**E**), diaminobutano (**B**), diaminohexano (**H**) y diaminooctano (**O**), para esto se utilizó la metodología reportada en la tesis profesional del Q.B.C. Francisco Cadena Cadena (Cadena, 2011) (Figura 11).

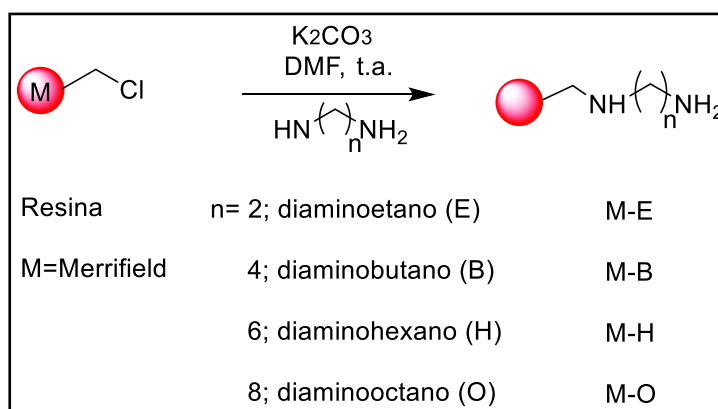


Figura 11. Modificación de la resina Merrifield con las diaminas.

Para comprobar que la resina se modificó con los distintos grupos espaciadores, se realizó una prueba de detección de amina. En todos los casos se observó una coloración azul-violeta lo cual indica la presencia de aminas primarias.

Para verificar que las reacciones se llevaron a cabo los materiales fueron caracterizados por infrarrojo y fluorescencia en cada etapa. La Figura 12 muestra los espectros de infrarrojo de la resina **M** y de la resina **M** modificada con los distintos grupo espaciadores, se observa la banda perteneciente al grupo amina secundaria.

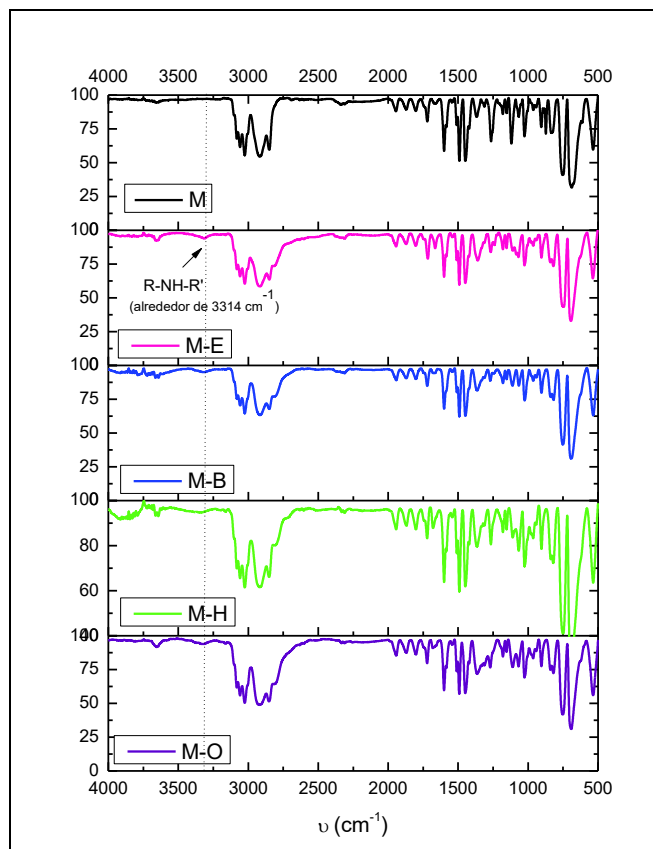


Figura 12. Espectros de infrarrojo de las resinas M, M-E, M-B, M-H y M-O. Para el análisis, las muestras fueron preparadas con KBr.

Al comparar los espectros IR de la resina Merrifield y de la resina modificada con las diaminas (**M-E**, **M-B**, **M-H** y **M-O**) se puede observar la siguiente diferencia importante: la ausencia de la banda a 873 cm^{-1} en los espectros de las resinas modificadas, la cual es indicativa del enlace C-Cl presente en la resina sin modificar (ver Figura 13). Esto indica que la reacción se llevó a cabo, dándose la sustitución del Cl de la resina Merrifield por el grupo amino de los distintos grupos espaciadores.

Como parte de la caracterización se obtuvieron los espectros de fluorescencia, de la resina **M** sin modificar y de la resina **M** modificada con los grupos espaciadores. En la Figura 14 se muestra el conjunto de espectros de fluorescencia de los materiales y en la Tabla 1 se resumen los datos espectroscópicos.

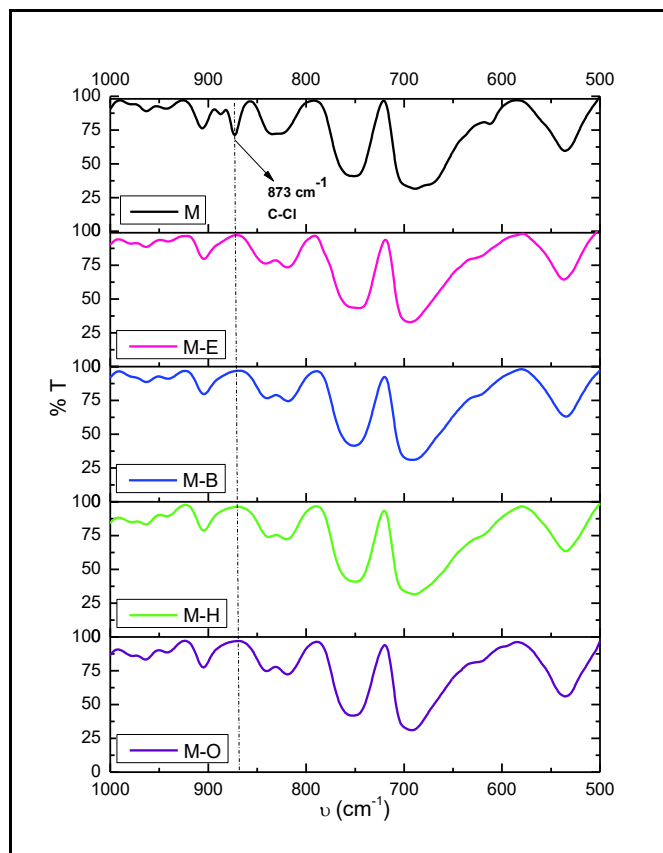


Figura 13. Espectros IR de la resina Merrifield sin modificar (M) y de la resina modificada con las diferentes diaminas (M-E, M-B, M-H y M-O). Banda a 873 cm^{-1} indicativa del enlace C-Cl presente en la resina sin modificar.

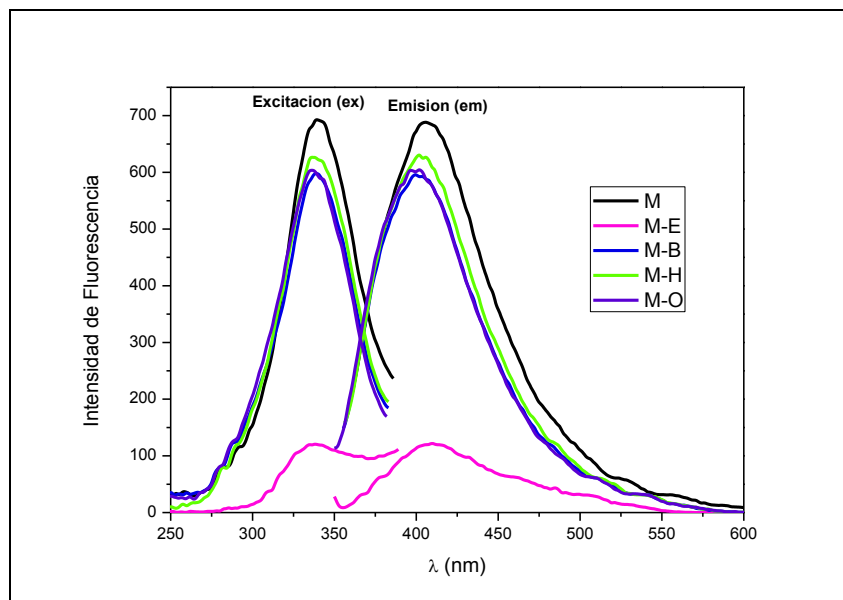


Figura 14. Espectros de fluorescencia de la resina Merrifield sin modificar (M) y de la resina modificada con las diferentes diaminas (M-E, M-B, M-H y M-O).

Tabla 1. Datos espectroscópicos de la resina Merrifield (M) sin modificar y modificada con los diferentes espaciadores (M-diamina). λ_{ex} , λ_{em} e I_R de los nuevos materiales respecto a la emisión de la resina Merrifield (I_M), $I_R=I/I_M$.

Resina	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	I_R
M	342	407	1
M-E	337	410	0.18
M-B	339	403	0.85
M-H	340	402	0.92
M-O	336	402	0.88

El espectro de la resina Merrifield presenta en su banda de excitación un máximo a 342 nm y su máximo en el espectro de emisión a 407 nm.

En los espectros de fluorescencia de la resina modificada con las distintas diaminas se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia y, excepto en el caso de la resina M-E, un desplazamiento en los máximos de excitación y emisión hacia el azul con respecto a la resina de partida. Los cambios observados en los espectros de fluorescencia nos indican que la modificación de la resina con los distintos grupos espaciadores se llevó a cabo.

Funcionalización de las resinas Merrifield modificadas (M-E, M-B, M-H y M-O) con el ligante 1mpy utilizando un grupo acoplante y un aditivo

Se inmovilizó al ligante **1mpy** en las resinas Merrifield modificadas con los diferentes espaciadores del tipo diaminas, con lo que se obtuvieron cuatro nuevos materiales: **M-E-1mpy**; **M-B-1mpy**; **M-H-1mpy** y **M-O-1mpy**. (Figura 15). La Figura 16 muestra los espectros de infrarrojo completos de los productos finales y la Figura 17 una ampliación de la región de frecuencias de 2800-3900 cm^{-1} .

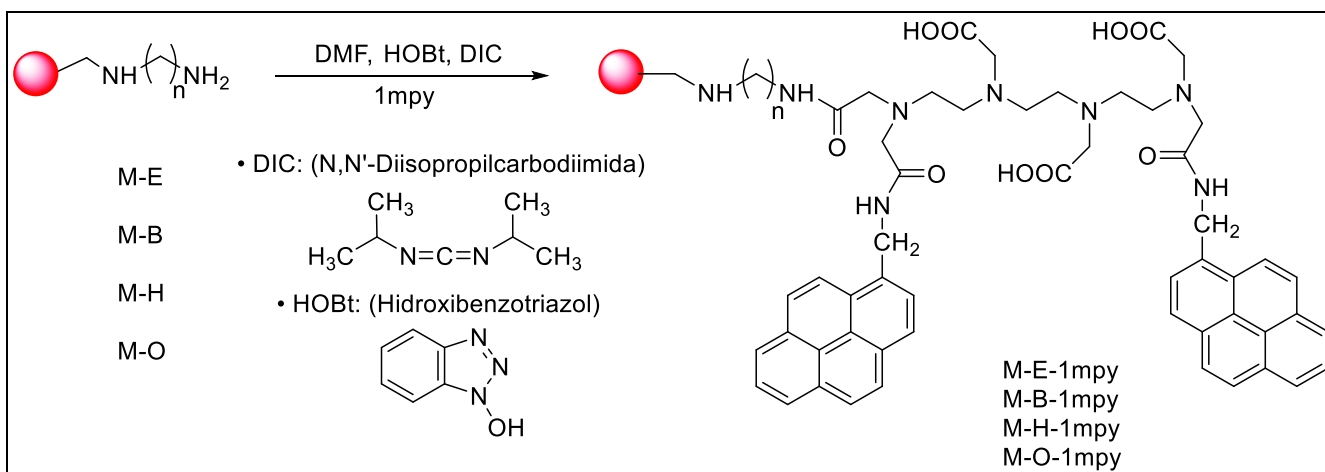


Figura 15. Inmovilización del ligante 1mpy en la resina Merrifield modificada con los distintos grupos diamina.

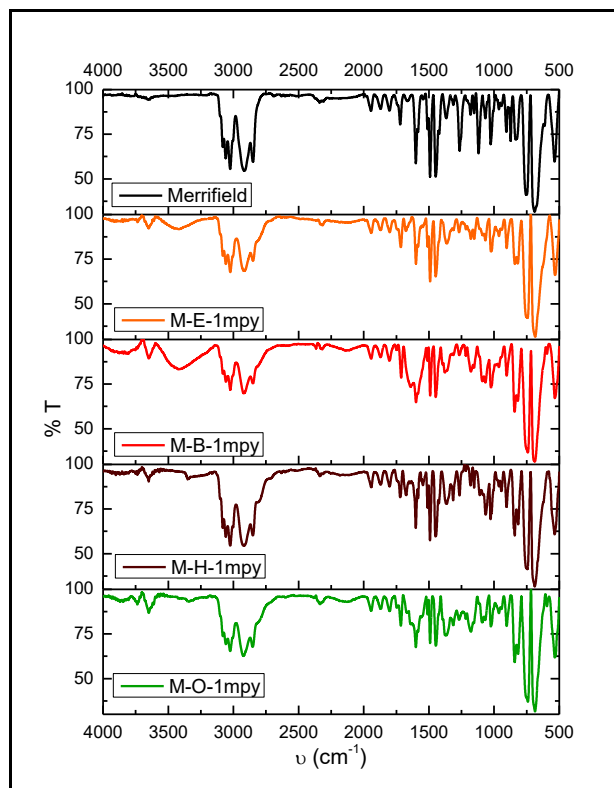


Figura 16. Espectros de infrarrojo de las resinas M, M-E-1mpy, M-B-1mpy, M-H-1mpy y M-O-1mpy. Para el análisis, las muestras fueron preparadas con KBr.

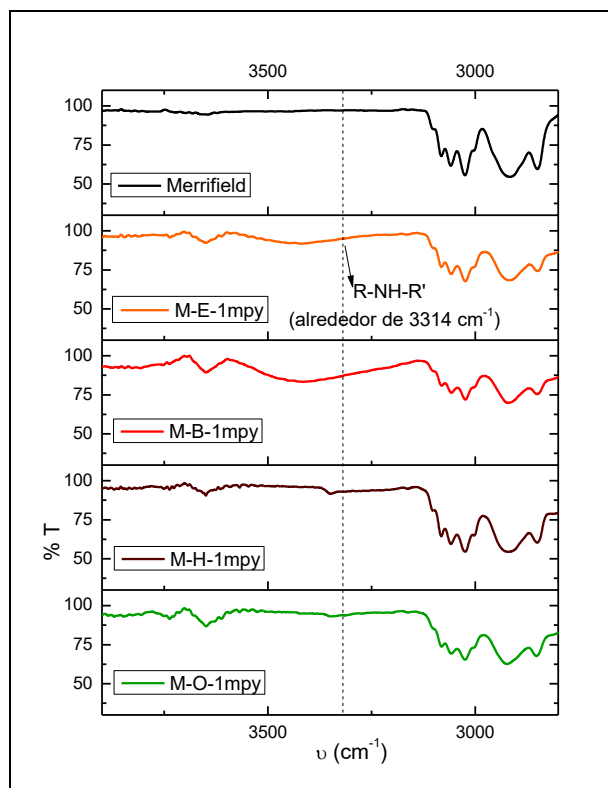


Figura 17. Espectros de infrarrojo de las resinas **M**, **M-E-1mpy**, **M-B-1mpy**, **M-H-1mpy** y **M-O-1mpy**. Donde se observa la ampliación de las bandas pertenecientes al grupo amino secundario. Para el análisis, las muestras fueron preparadas con KBr.

En la Figura 17 se puede apreciar el ensanchamiento de las bandas pertenecientes al grupo amino secundario (que se observan desplazadas alrededor de 3314-3420 cm^{-1}). Al comparar los espectros de emisión de **M** con los espaciadores, con los espectros de emisión correspondientes de **M-espaciadores-1mpy**, en todos los casos se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia y un desplazamiento hacia el rojo del máximo de emisión y excitación. (Figuras 18-21).

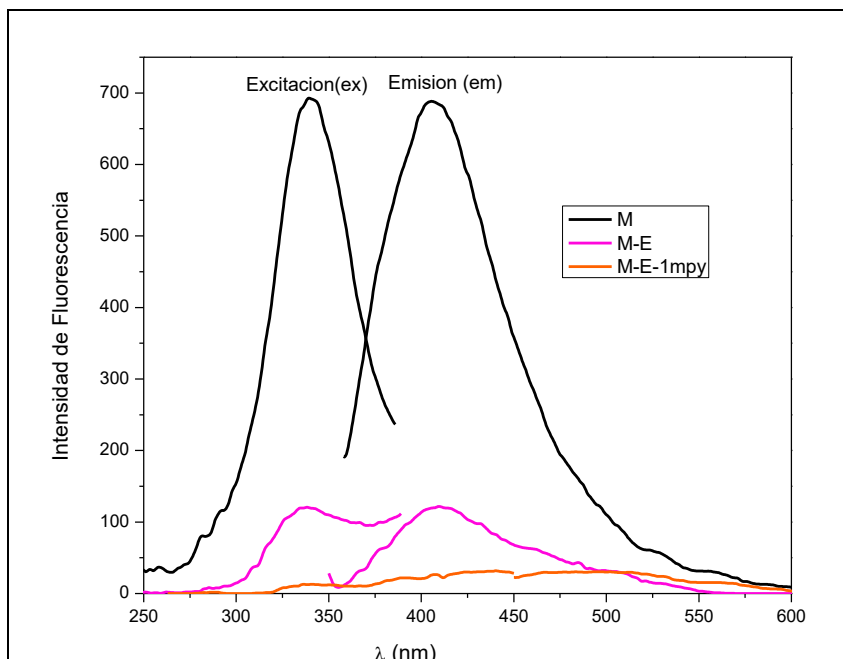


Figura 18. Espectros de fluorescencia de:
Merrifield (M), M-diaminoetano (M-E) y M-E-1mpy.

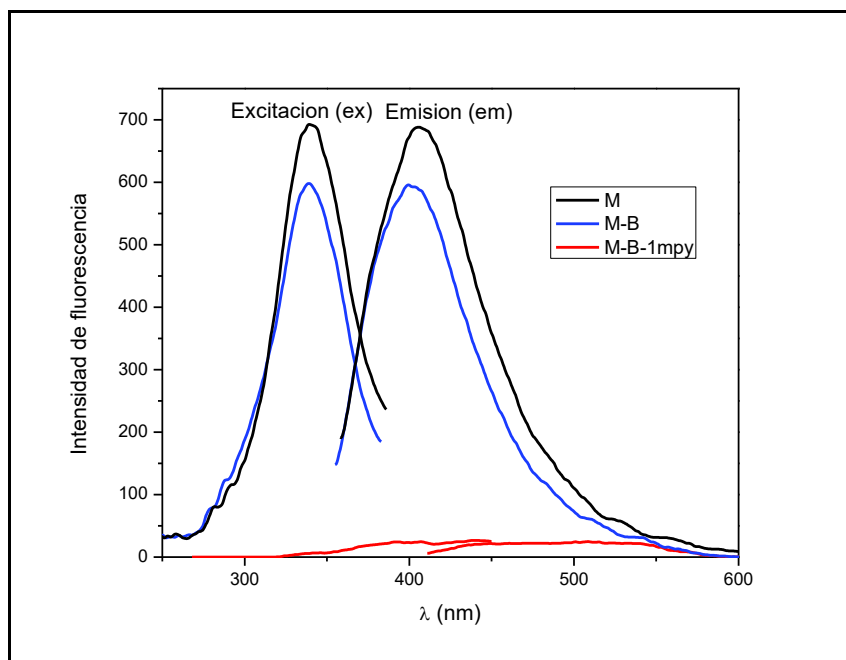


Figura 19. Espectros de fluorescencia de:
Merrifield (M), M-diaminobutano (M-B) y M-B-1mpy.

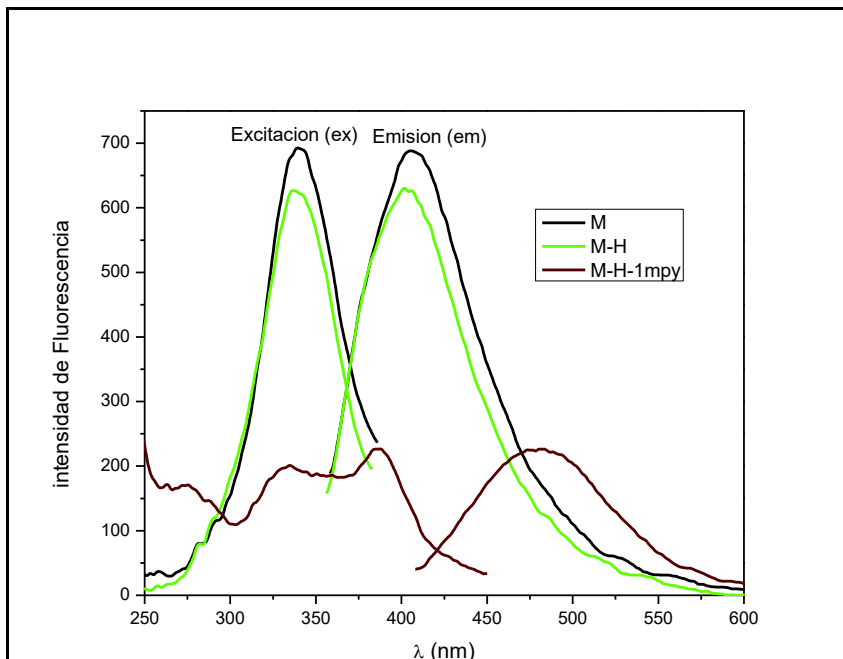


Figura 20. Espectros de fluorescencia de: Merrifield (M), M-diaminohexano (M-H) y M-H-1mpy.

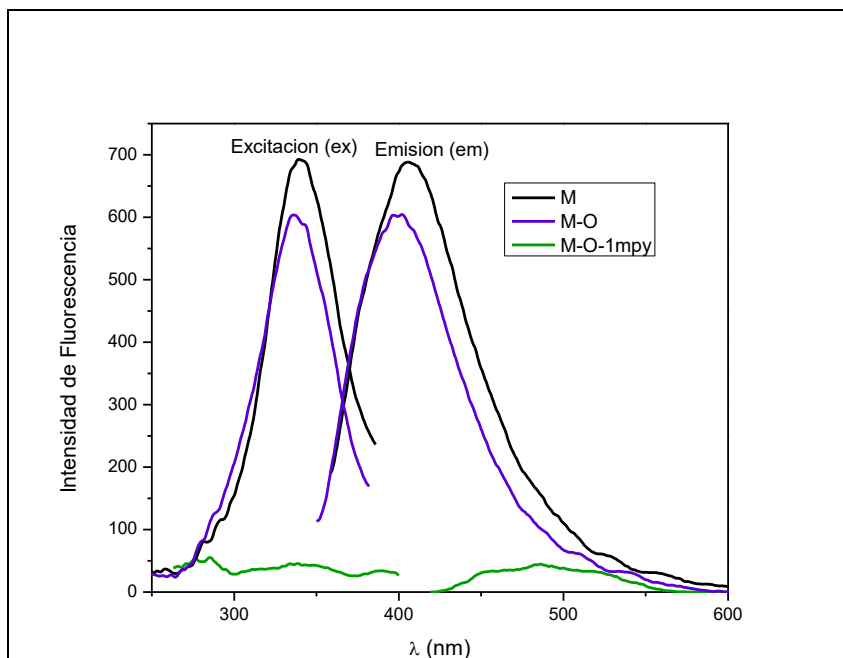


Figura 21. Espectros de fluorescencia de: Merrifield (M), M-diaminooctano (M-O) y M-O-1mpy.

En la figura 22 se muestra el conjunto de espectros de fluorescencia de las resinas funcionalizadas con el ligante **1mpy** y en la tabla 2 se resumen los datos espectroscópicos. En todos los espectros se observó disminución de la intensidad de fluorescencia, en el caso de **M-H-1mpy** la disminución fue menor.

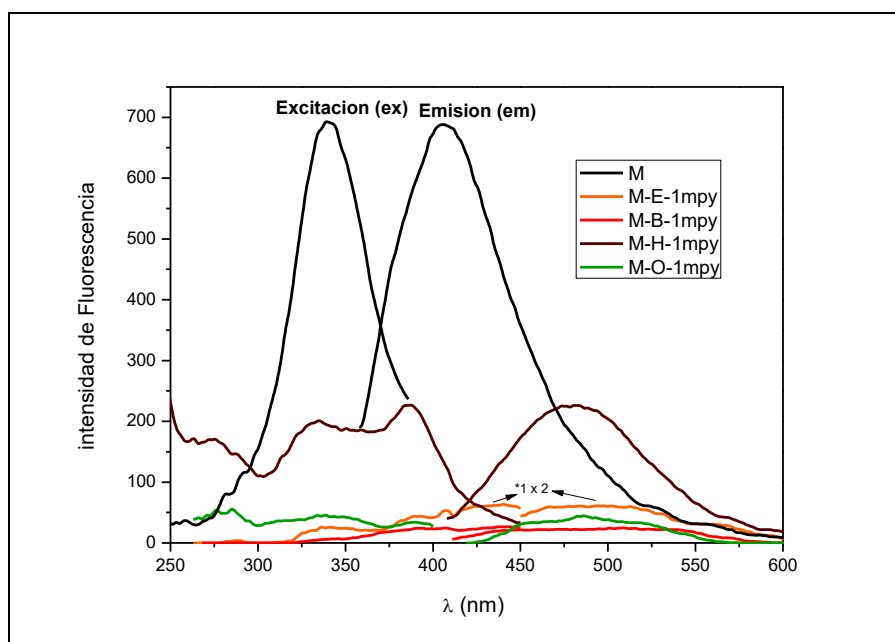


Figura 22. Espectros de excitación y emisión de los productos finales y de la resina M sin modificar. (* La intensidad de la gráfica de emisión y excitación fue multiplicada por dos).

Tabla 2. Datos espectroscópicos de la resina Merrifield (M) sin modificar y en sus formas finales funcionalizada con el ligante 1mpy (M-diamina-1mpy). λ_{ex} , λ_{em} e I_R de los nuevos materiales respecto a la emisión de la resina Merrifield (I_M), $I_R=I/I_M$.

Resina	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	I_R
M	342	407	1
M-E	337	410	0.18
M-B	339	403	0.85
M-H	340	402	0.92
M-O	336	402	0.88

Los espectros de emisión de los materiales M-E-1mpy, M-B-1mpy, M-O-1mpy –presentaron poca similitud con la emisión del ligante en solución. El material M-H-1mpy presentó la mayor intensidad de fluorescencia y un espectro similar al ligante en solución, por lo que se eligió este material para estudiar su respuesta a los iones Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} .

Estudios de fluorescencia del material M-H-1mpy con Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+}

Con el fin de evaluar la capacidad del ligante 1mpy inmovilizado en la resina Merrifield de actuar como sensor fluorescente de los metales Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} , se llevó a cabo un estudio de fluorescencia utilizando un sistema de flujo. Los iones Pb^{2+} , Hg^{2+} y Cd^{2+} , provocaron una disminución de la intensidad de fluorescencia del material M-H-1mpy. Con el ion Pb^{2+} se observó un apagamiento de la fluorescencia a un tiempo de 45 min de pasar la solución metálica, y no se observó saturación en la fluorescencia (Figura 23). El porcentaje de amortización total fue 22.7%. Una vez concluida la prueba con Pb^{2+} , el material fue sometido a un proceso de lavado con agua por un sistema de flujo, con el propósito de liberar al ion Pb^{2+} y valorar la reusabilidad de la resina en la detección de metales. Se encontró que el material es reciclable, debido a que se restableció completamente la intensidad de la fluorescencia. (Figura 24).

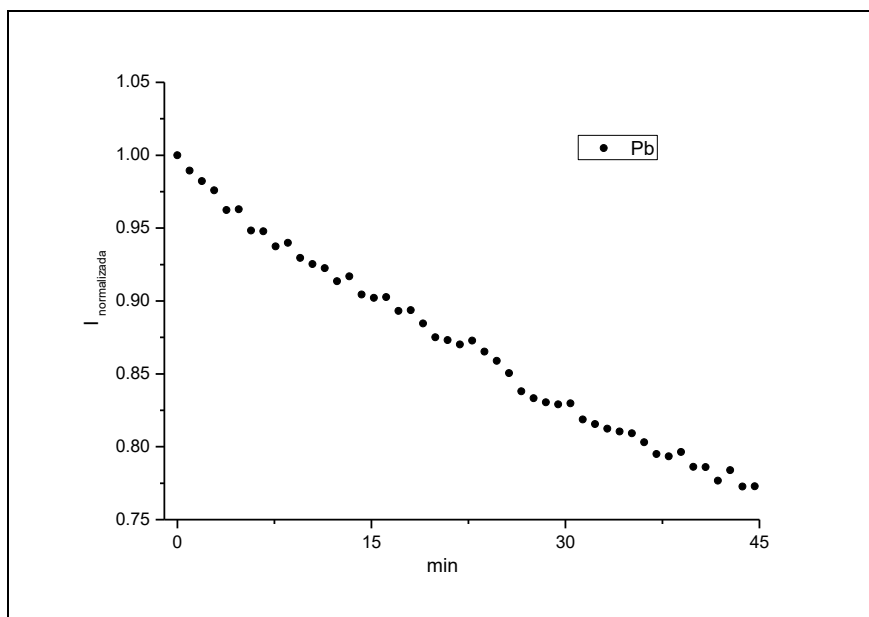


Figura 23. Perfil de intensidad de fluorescencia en sólido de M-H-1mpy en presencia de Pb^{2+} .

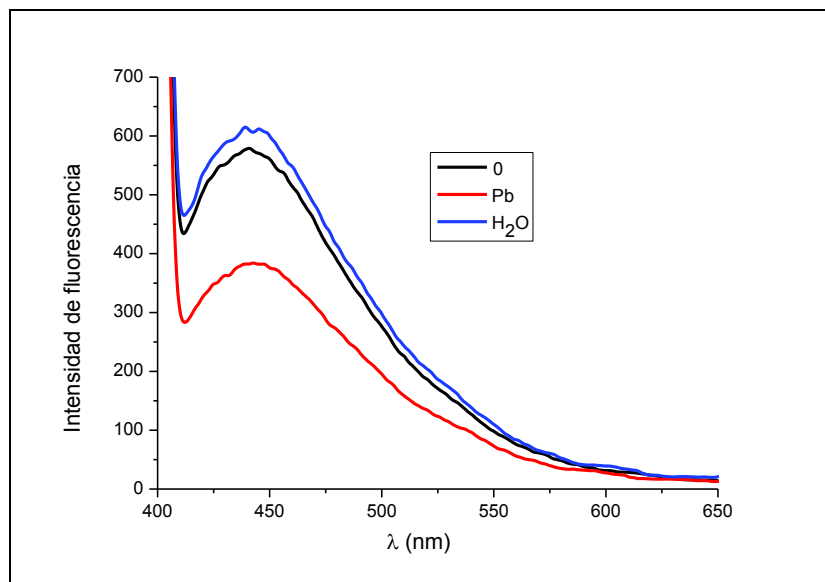


Figura 24. Espectros de emisión de la resina M-H-1mpy libre (negro), después de 45 min de contacto con la solución de Pb^{2+} (rojo) y regenerada por tratamiento con agua (azul).

En una segunda etapa de prueba, se hizo pasar una solución de Hg^{2+} durante 40 min. Como en el caso de Pb^{2+} , en este experimento también se observó una disminución de la fluorescencia, sin que el sistema alcance una saturación. El porcentaje de amortización total fue 8.21%, menor al observado con Pb^{2+} a los 40 min (21.4%) (Figura 25). Una vez terminada la prueba, el material **M-H-1mpy** fue de nuevo sometido a un lavado con agua y HCL 0.01 M para liberar al ion Hg^{2+} y regenerar la fluorescencia al valor inicial. Sin embargo, en este caso no se restableció la intensidad de fluorescencia original (Figura 26), lo que indica que el material no libera al metal, es decir, no se regenera.

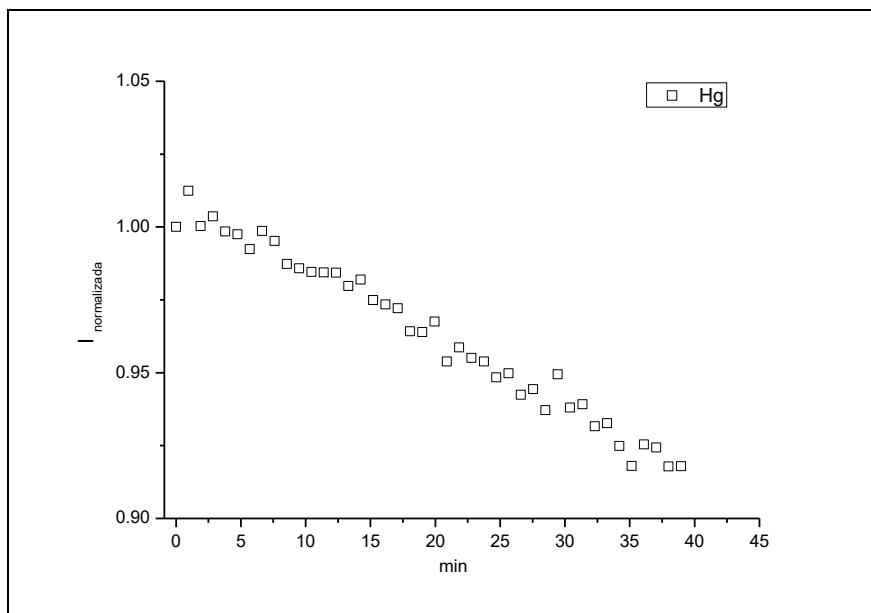


Figura 25. Perfil de intensidad de fluorescencia en sólido de **M-H-1mpy** en presencia de Hg^{2+} .

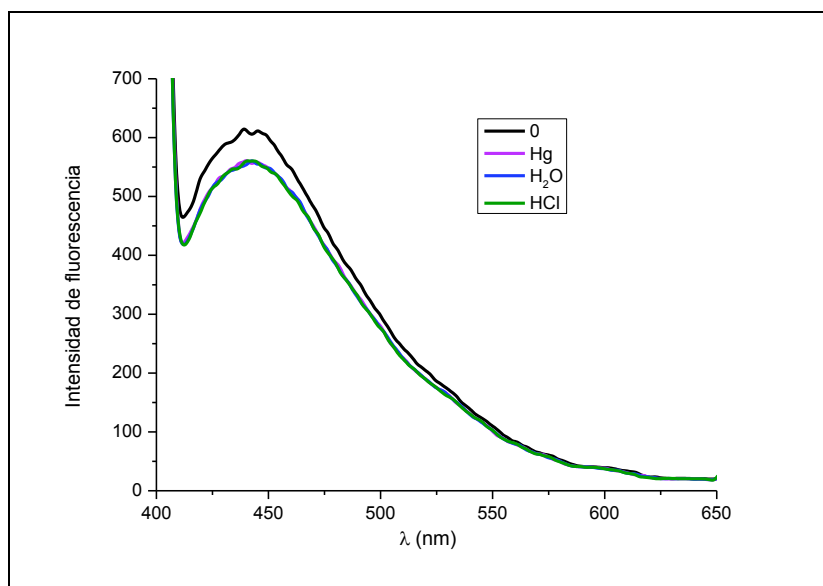


Figura 26. Espectros de emisión de la resina M-H-1mpy libre (negro), después de 40 min de contacto con la solución de Hg^{2+} (rosa), tratamiento con agua (azul) y tratamiento con HCl (verde).

Debido a que no se pudo regenerar el material sensor después de la medición con Hg^{2+} , se hizo un nuevo cargado de la celda de flujo con **M-H-1mpy** y se le hizo pasar una solución metálica de Cd^{2+} . Se observó una disminución lineal de 10% en la intensidad de fluorescencia en los primeros 20 min. Sin embargo, a tiempos más largos, la intensidad mostró fluctuaciones

(Figura 27). Por lo anterior, transcurridos 80 minutos, se decidió detener el experimento y realizar el procedimiento de lavado para la regeneración de la resina. Se encontró que, al igual que ocurrió con Hg^{2+} , la fluorescencia del material no se restablece (Figura 28), lo cual es indicativo de que el material no se regenera al utilizar el ion Cd^{2+} .

Los resultados de los estudios de coordinación de **M-H-1mpy** hacia los cationes metálicos Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} revelan que: 1) Estos metales disminuyen la intensidad de fluorescencia del material; 2) El material no libera a los iones Cd^{2+} y Hg^{2+} ; 3) El material libera al ion Pb^{2+} , por lo que se puede reciclar.

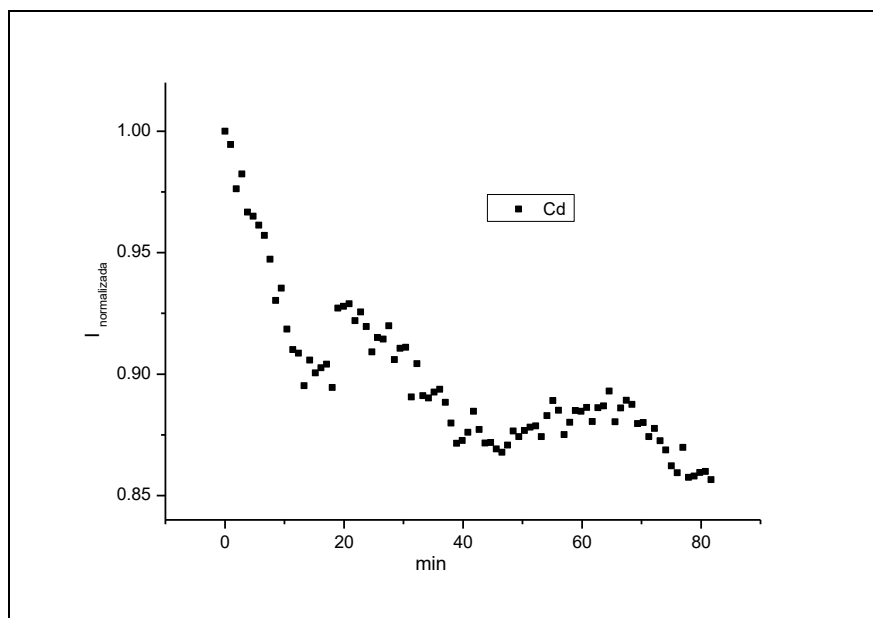


Figura 27. Perfil de intensidad de fluorescencia en sólido de M-H-1mpy en presencia de Cd^{2+} .

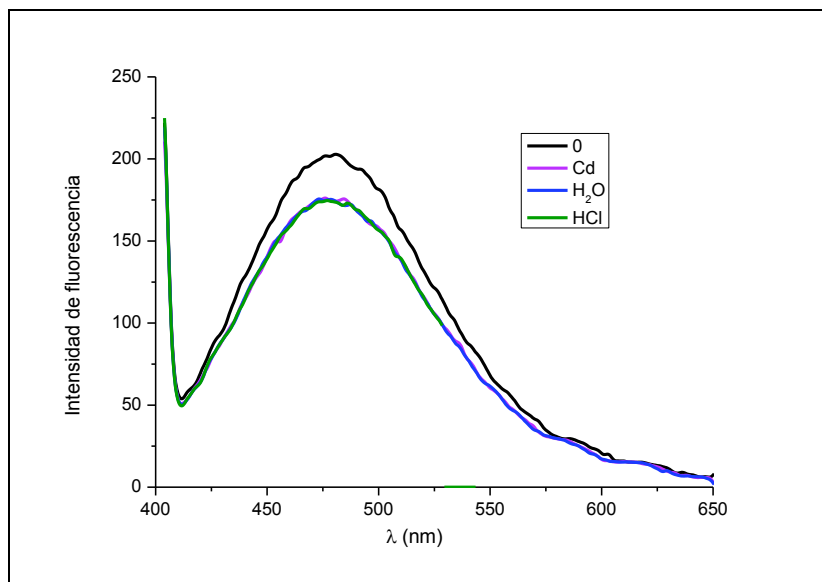


Figura 28. Espectros de emisión de la resina M-H-1mpy libre (negro), después de 80 min de contacto con la solución de Cd^{2+} (rosa), tratamiento con agua (azul) y tratamiento con HCl (verde).

CONCLUSIONES

1. Se logró inmovilizar al ligante 1mpy en las resinas Merrifield modificadas con los diferentes espaciadores del tipo diaminas, obteniéndose cuatro nuevos materiales: M-E-1mpy; M-B-1mpy; M-H-1mpy y M-O-1mpy, los cuales presentaron bandas de emisión anchas, localizadas en el intervalo de 425 a 550 nm.
2. El material M-H-1mpy presentó las mejores propiedades fluorescentes y un espectro muy similar al del ligante 1mpy en solución, por lo que se eligió este material para estudiar su respuesta hacia los metales divalentes Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} .
3. Los iones Pb^{2+} , Hg^{2+} y Cd^{2+} , provocaron la disminución en la intensidad de fluorescencia del material M-H-1mpy.
4. Se encontró que el material M-H-1mpy libera al ion Pb^{2+} restableciendo completamente la intensidad de la fluorescencia, lo que permite reutilizarlo para mediciones con otros metales y contribuye al desarrollo de nuevos materiales sensores con un alto nivel de sensibilidad y selectividad para la detección y cuantificación de cationes metálicos de gran interés médico y ambiental.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar la respuesta de los materiales M-E-1mpy, M-B-1mpy y M-O-1mpy como sensores de los metales Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} .
2. Evaluar la respuesta de los materiales sintetizados con soluciones de metales de distinta concentración.
3. Analizar los materiales obtenidos en el presente trabajo para determinar su uso en la recuperación de iones de importancia biológica.
4. Utilizar otras resinas poliméricas como la Wang o Argopore para comparar las respuestas de los materiales obtenidos con los metales Pb, Cd y Hg.

BIBLIOGRAFÍA

- Amaral P, Neves G, Farias F, Eifler VL. 2003. Química combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 39(4):351-63.
- Ávila MJ. 2010. Síntesis de un nuevo quimiosensor fluorescente tipo bis-cromofórico, derivado del ácido Trietilentetraaminohexaacético (TTHA) funcionalizado con grupos pireno y estudios de coordinación hacia los iones Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} en solución acuosa. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- Cadena CF. 2011. Inmovilización de dos ligantes biscromofóricos derivados de EDTA y de naftaleno en las resinas Merrifield y Argopore y evaluación de sus propiedades como sensores y/o dosímetros hacia metales de transición divalentes. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.
- Cañizares RO. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología México* 42(3):131-143.
- Casanovas J, Armelin E, Iribarren J, Alemán C, Liesa F. 2005. La Modelización Molecular como Herramienta para el Diseño de Nuevos Polímeros Conductores. *Polímeros: Ciencia y Tecnología* 15(4):239-244.
- Chowdhury BA, Chandra RK. 1987. Biological and health implications of toxic heavy metal and essential trace element interactions. *Progress in food & nutrition science* 11(1):55-113.
- Collado Lozano M. 2004. Aminoácidos Naturales como Materiales de Partida en la Preparación de Nuevos Reactivos y Catalizadores Soportados. 239.
- Diaz JJ, Mario AF, Bradley M. 2006. Microwave-assisted coupling with DIC/HOBt for the synthesis of difficult peptoids and fluorescently labelled peptides—a gentle heat goes a long way. *Tetrahedron Letters* 47.1011–1014.
- Duruibe J, Ogwuegbu M, Ekwurugwu J. 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences* 2(5):112-118.
- Ercal N, Gurer H, Aykin N. 2001. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal-induced Oxidative Damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1(6):529-539.
- Gordon K, Balasubramanian S. 1999. Solid phase synthesis – designer linkers for combinatorial chemistry: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74(9):835-851.

- Gründler P. 2007. Chemical sensors: an introduction for scientist and engineers. Springer. 283.
- Joshi BP, Park JY, Lee KH. 2014. Recyclable sensitive fluorimetric detection of specific metal ions using a functionalized PEG-PS resin with a fluorescent peptide sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* 122-129.
- Lee MH, Kang G, Kim JW, Ham S, Kim JS. 2009. Tren-spaced rhodamine and pyrene fluorophores: Excimer modulation with metal ion complexation. *Supramolecular Chemistry* 21(1-2):135-41.
- Lodeiro C, Pina F. 2009. Luminescent and chromogenic molecular probes based on polyamines and related compounds. *Coordination Chemistry Reviews* 253(9–10):1353-1383.
- Machi L, Muñoz IC, Pérez R, Sánchez M, Inoue M. 2009. Pyrene bichromophores composed of polyaminopolycarboxylate interlink: pH response of excimer emission. *Supramolecular Chemistry* 21(8):665-73.
- Machi L, Santacruz H, Sánchez M, Inoue M. 2007. Cd²⁺-sensing bichromophore: Excimer emission from an EDTA-methylnaphthalene derivative. *Inorganic Chemistry Communications* 10(5):547-50.
- Marquardt M, Eifler VL. 2001. A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. *Química Nova* 24(6):846-855.
- Mata E. 1997. Una nueva era en el descubrimiento de medicamentos. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy* 7(40).
- Morton O. 2006. Contenido de metales pesados en suelos superficiales de la Ciudad de México. 9(1):45-47.
- Nath S, Maitra UA. 2006. Simple and General Strategy for the Design of Fluorescent Cation Sensor Beads. *Organic Letters*. 8:3239-3242.
- Pilar F, Albericio F. 2003. Merrifield Resin. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*.
- Prodi L, Ballardini R, Gandolfi MT, Roversi R. 2000. A simple fluorescent chemosensor for alkaline-earth metal ions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 136(1):49-52.
- Sancenón F, Descalzo AB, Lloris JM, Martínez R, Pardo T, Seguí MJ, Soto J. 2002. Open-chain polyazaalkanes functionalised with pyrene groups as sensing fluorogenic receptors for metal ions. *Polyhedron* 21(14): 1397-1404.
- Sanín LH, González T, Romieu I, Hernández M. 1998. Acumulación de plomo en hueso y sus efectos en la salud. *Salud Pública de México* 40(4):359-368.

- Santacruz OH, Pina LG, Karime LS, Rivero IA. 2009. Preparation of a Library of EDTA Amide α -Aminonaphthalene- γ -sulfonic Acid Derivatives on Solid Phase and Their Fluorescence Behavior toward Transition Metals. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 11:1030-1037.
- Santini R, Griffith MC, Qi M. 1998. A Measure of Solvent Effects on Swelling of Resins for Solid Phase Organic Synthesis. *Tetrahedron letters* 39(49):8951-8954.
- Shiraishi Y, Ishizumi K, Nishimura G, Hirai T. 2007. Effects of metal cation coordination on fluorescence properties of a diethylenetriamine bearing two end pyrene fragments. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(30): 8812-8822.
- Skoog DM. 2002. *Introducción a la química analítica*. España: Reverte. 589 p.
- Waalkes MP. 2000. Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of Inorganic Biochemistry* 79(1–4):241-4.
- Wozniak E, Martineau J. 2007. Quelatos/Complejos Derivados Naturales de Cytozyme. *Plant Nutrition for Sustainable Agriculture* 10(2):1-2.