POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DE CHIMIE DE MONTPELLIER

TESIS DE DOCTORADO

RETENCIÓN DE CLOROFILA EN HIDROTALCITAS

PRESENTA

SOMMER MÁRQUEZ ALICIA ESTELA

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS

Directores de tesis

Dr. Didier Tichit (ENSCM)
Dr. Geolar Fetter (BUAP)

Asesor externo

Dr. Pedro Bosch (UNAM)

JUNIO 2013

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dr. Álvaro Sampieri Croda, Dra. María Verónica del Rosario Hernández Huesca, Dra. Griselda Corro Hernández, Dra. Silvia Patricia Paredes Carrera, Dr. Didier Tichit, Dr. José Ángel Rivera Ortega y Dra. María del Lourdes Ruiz Peralta, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada ***"Retención de clorofila por hidrotalcitas"****, que presenta la* ***M.C. Alicia Estela Sommer Márquez*** *para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas.*

Se extiende la presente a los siete días del mes de junio del año dos mil trece.

A T E N T A M E N T E

Dr. Álvaro Sampieri Croda

Dra. María Verónica del Rosario Hernández Huesca

Dra. Griselda Corro Hernández

Dra. Silvia Patricia Paredes Carrera

Dr. Didier Tichit

Dr. José Ángel Rivera Ortega

Dra. María de Lourdes Ruiz Peralta

DEDICATORIAS

A mi familia por estar siempre conmigo apoyándome en los momentos buenos y malos de mi vida…

A la memoria de mi hijo, te amo bebé…

A mis sobrinas Alejandra y María José por enseñarme tanto a pesar de su corta edad, las amo…

A todas las personas que han contribuido en mi formación personal y profesional…

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Porque creo en ti y por no dejarme sola…

A mi familia

Por todo su apoyo pero sobre todo por creer en mi…

A Thibault

Por su paciencia, amor y enseñanzas…

A mis directores de tesis

Dr. Geolar y Dr. Didier Tichit por su apoyo incondicional, por creer en mí, por sus enseñanzas, por su generosidad, por su sencillez, por su amistad y por poner todo de su parte para que lograra la doble titulación. Dr. Pedro Bosch por su apoyo y conocimiento compartido así como su amistad y confianza…

A Dan Lerner

Por su ayuda ya que gracias a él se han podido obtener muy buenos resultados. Por su paciencia, enseñanzas y conocimiento compartidos así como su generosidad y amabilidad.

A mis amigos

Por su ayuda y apoyo, en especial al Dr. Álvaro Sampieri, al Dr. Ángel Rivera y a la Dra. Lourdes Ruiz que han sido pilar en el desarrollo de este trabajo…

A mis profesores

Por sus enseñanzas y por creer en mí y apoyarme, en especial a las Dras. Rosario Hernández y Patricia Amador que han sido un gran ejemplo para mí…

A CONACyT

Por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado y el apoyo para realizar mi estancia en Francia…

Al proyecto CONACyT 154060 "Inmovilización de clorofila en hidrotalcitas"

A la Maestra Leticia Baños, al Dr. Enrique Lima, al Dr. Eduardo Palomares y a Thomas Alacarierre

Por su trabajo técnico en la difracción de rayos X, análisis elemental, análisis por ICP-OES, análisis termogravimétrico y microscopia electrónica de barrido.

A la Maestra Laura del Laboratorio Central del Instituto de Física de la Buap.

Este trabajo fue realizado en las siguientes instituciones:

- Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP
- Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM
- Institut Charles Gerhardt de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, Francia
- Plant pilote de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, Francia
- Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, CIRAD, Francia

INDICE

RESUMEN…….……..... 1

ABSTRACT……... 3

RÉSUMÉ……..... 5

INTRODUCCIÓN..... 7

OBJETIVOS..... 10

CAPÍTULO 1. GENERALIDADES

1 Pigmentos fotosintéticos…….……..... 12

1.1 Formación y estructura general de las clorofilas……..... 12

1.1.2 Clorofila ***a***……..... 15

1.1.3 Clorofila ***b***……. 16

1.1.4 Clorofila ***c***…….…… 16

1.1.5 Clorofila ***d***…….. 16

1.2 Propiedades espectroscópicas de las clorofilas……. 17

1.3 Extracción de clorofilas……... 21

1.3.1 Disolventes de extracción…….. 21

1.3.1.1 Métodos físicos empleados en la extracción……..... 23

1.3.1.2 Trituradores (molinos)……. 23

1.3.1.3 Ultrasonido…… 24

1.3.1.4 Calentamiento……..... 24

1.3.1.5 Liofilización y congelamiento……..... 24

1.3.1.6 Filtración.…….. 25

1.3.1.7 Centrifugación…….…… 25

1.4 Separación y purificación de clorofilas.…… 25

1.4.1 Saponificación…….. 25

1.4.2 Separación por partición……. 26
1.4.3 Cromatografía…….. 27
1.4.3.1 Cromatografía en columna……. 27
1.4.3.2 Cromatografía de capa fina……..... 28
1.5 Compuestos derivados de las clorofilas…….. 29
1.5.1 Productos de degradación…… 29
1.5.1.1 Feofitinas…….. 30
1.5.1.2 Feoforbidas……... 31
1.5.1.3 Clorofilidas……..... 32
1.5.1.4 Clorofilinas…… 32
1.6 Fotosíntesis…….. 34
1.6.1 ¿En donde se lleva a cabo la fotosíntesis?..... 35
1.6.2 Fases del almacenamiento de energía en la fotosíntesis……. 36
1.6.2.1 Antenas y procesos de transferencia de energía……... 36
1.6.2.2 Transferencia primaria de electrones en los centros de reacción..... 32
1.6.2.3 Estabilización por reacciones secundarias..... 39
1.6.2.4 Síntesis y exportación de productos estables..... 40
1.7 Las arcillas…… 41
1.7.1 Arcillas aniónicas…… 42
1.7.1.1 Composición y estructura…….. 43
1.7.1.2 Naturaleza del catión…….. 45
1.7.1.3 Naturaleza del anión……... 46
1.7.2 Estabilidad de las hidrotalcitas…….. 47
1.7.3 Estabilidad térmica de las hidrotalcitas…… 47
1.7.4 Procedimientos de preparación de hidrotalcitas**…….....** 48
1.7.4.1 Métodos convencionales de coprecipitación……. 48
1.7.4.2 Método sol-gel…….. 49

1.7.4.3 Método de intercambio…….. 49

1.7.4.4 Método de regeneración..……..... 50

1.7.4.5 Método por microondas……..... 50

1.7.5 Usos y aplicaciones de las hidrotalcitas…… 50

CAPÍTULO 2. EXPERIMENTAL

2.1 Síntesis de las hidrotalcitas……..……..... 53

2.2 Síntesis de los híbridos clorofilina-hidrotalcita..... 54

2.2.1 Síntesis por efecto memoria……..... 54

2.2.2 Síntesis por coprecipitación simultánea…….. 55

2.3 Síntesis de híbridos clorofila ***a***-hidrotalcita…….. 57

2.3.1 Obtención de clorofila ***a*** pura a partir de pigmentos fotosintéticos….. 57

2.3.1.1 Extracción de los pigmentos…….. 57

2.3.1.2 Separación de los pigmentos por cromatografía en capa fina……. 58

2.3.1.3 Separación de los pigmentos por cromatografía en columna…….. 58

2.3.2 Preparación de los híbridos clorofila ***a***-hidrotalcita (Chl *a*/HT)……. 60

2.3.3 Desorción de la clorofila ***a*** de los híbridos Chl *a*/HT en acetona..... 62

2.4 Métodos de caracterización……... 62

2.4.1 Análisis elemental CHNS-O……... 62

2.4.2 Espectroscopia de emisión de plasma de acoplamiento inductivo…. 63

2.4.3 Difracción de rayos-X……..... 64

2.4.3.1 Ley de Bragg……..... 64

2.4.4 Espectroscopia de infrarrojo…….…… 64

2.4.5 Adsorción-desorción de nitrógeno…… 65

2.4.6 Microscopia electrónica de barrido..... 65

2.4.7 Análisis térmico gravimétrico y térmico diferencial……..... 65

2.4.8 Espectroscopias de absorción y emisión de luz..... 66

2.4.8.1 Espectroscopia ultravioleta visible……..... 68

2.4.8.1.1 Ley de absorción de Lambert-Beer…… 68

2.4.8.1.2 Mediciones de absorción……. 69

2.4.8.2 Espectroscopia de ultravioleta visible de reflectancia difusa……... 70

2.4.8.2.1 Ventajas…… 70

2.4.8.2.1 Desventajas…….. 70

2.4.8.3 Espectroscopia de fluorescencia……... 71

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Hidrotalcitas……..... 75

3.1.1 Hidrotalcitas sintetizadas por coprecipitación e irradiación con microondas en la etapa de tratamiento hidrotérmico..... 76

3.1.1.1 Estructura..... 76

3.1.1.2 Composición química elemental……... 79

3.1.1.3 Especies…… 80

3.1.1.4 Textura…….. 82

3.1.1.5 Morfología……. 85

3.1.1.6 Comportamiento térmico…… 89

3.1.1.7 Comportamiento óptico…….. 92

3.1.2 Hidrotalcitas sintetizadas por coprecipitación empleando el método convencional……... 94

3.1.2.1 Estructura..... 95

3.1.2.2 Comportamiento óptico……..... 97

3.2 Híbridos clorofilina-hidrotalcita…….. 99

3.2.1 Estructura…….. 99

3.2.2 Composición química elemental……... 100

3.2.3 Especies…… 102

3.2.4 Textura…… 104

3.2.1.5 Comportamiento térmico…… 107

3.2.1.6 Comportamiento óptico…….. 110

3.2.7 Discusión..... 112

3.3 Clorofila ***a***……..... 114

3.3.1 Separación por cromatografía en capa fina……..... 114

3.3.1.1 Espectro ultravioleta visible de los pigmentos obtenidos de la separación por cromatogarfía en capa fina…… 114

3.3.2 Separación por cromatografía en columna……..... 115

3.3.2.1 Clorofila ***a*** pura obtenida por separación en columna……..... 116

3.4 Híbridos clorofila ***a***-hidrotalcita…….. 120

3.4.1 Efecto de la naturaleza del catión M^{II} de los soportes en la adsorción y estabilización de la clorofila ***a***…….. 120

3.4.1.1 Estructura..... 120

3.4.1.2 Comportamiento óptico……..... 122

3.4.2 Efecto de la relación metálica molar M^{II}/Al de los soportes en la adsorción y estabilización de la clorofila ***a***..... 126

3.4.2.1 Estructura……..... 126

3.4.2.2 Comportamiento óptico…….. 128

3.4.3 Efecto del tratamiento hidrotérmico de la síntesis de las hidrotalcitas en la adsorción y estabilización de la clorofila ***a***…… 131

3.4.3.1 Comportamiento óptico……..... 131

3.4.4 Efecto del disolvente empleado para disolver la clorofila ***a*** en la adsorción y estabilización de la clorofila ***a*** en las hidrotalcitas…… 133

3.4.4.1 Comportamiento óptico…….. 133

3.4.5 Desorción de la clorofila ***a*** con acetona de los híbridos Mg/Al y Zn/Al después de 10 y 30 días de almacenado…… 135

3.4.6 Discusión…….. 137

CONCLUSIÓN…..……..... 140

REFERENCIAS…… 142

LISTA DE FIGURAS..... 149

LISTA DE TABLAS..... 154

RESUMEN

El proceso fotosintético es uno de los procesos vitales que sostiene la vida en la Tierra, consiste en transformar el dióxido de carbono a azúcares con la ayuda de la luz del Sol. Los organismos capaces de llevar a cabo este proceso en la Tierra son las plantas superiores, las algas y algunas bacterias. Para aprovechar esta energía solar, los organismos fotosintéticos han desarrollado diferentes pigmentos recolectores de luz o antenas, similares a una antena satelital, capturando energía y concentrándola en un receptor donde la señal es convertida a una forma diferente. Estos pigmentos en las plantas superiores son las clorofilas, los carotenoides y las bacterioclorofilas de las bacterias. La clorofila es esencial para la mayoría de los organismos fotosintéticos puesto que es la molécula más eficiente encontrada en la naturaleza para la captación y recolección de la luz que después libera en forma de energía química. Generalmente en las plantas superiores las clorofilas se encuentran formando complejos pigmento-proteína, en donde las proteínas actúan como soporte de las clorofilas. Esto ayuda a tener una distancia y orientación óptimas entre ellas ya que de lo contrario existiría el riesgo de inhibir sus propiedades.

Para los experimentos basados en la fotosíntesis artificial se requiere que las moléculas de clorofila estén dispersadas homogéneamente. La clorofila y sus derivados pueden ser inmovilizadas en algún material adecuado. En este trabajo se sintetizaron, por primera vez, nuevos materiales híbridos empleando hidrotalcitas y un derivado de la clorofila: clorofilina. Se estudió el efecto de la irradiación con microondas sobre la cristalización de los materiales. La clorofilina puede retenerse en las hidrotalcitas en un proceso de un solo paso, ya sea por efecto memoria o por coprecipitación simultánea. Dependiendo del uso del agente coprecipitante (NaOH) o de la irradiación con microondas, tanto la morfología como la porosidad de las muestras pueden controlarse. Además, estas condiciones determinan la cantidad y el arreglo de las moléculas de clorofilina en la hidrotalcita: entre las láminas o en las bocas de los poros. Se obtuvieron

materiales híbridos estables en todos los casos, las moléculas de clorofilina se unieron a la hidrotalcita a través de los grupos OH por enlaces de hidrógeno.

Se sintetizaron nuevos materiales híbridos constituidos por hidrotalcitas y clorofila ***a***. También se estudió el efecto de la composición de las hidrotalcitas empleadas como soportes en la estabilización de la clorofila ***a***. La estabilidad de la clorofila ***a*** se vió afectada por la relación metálica molar y la naturaleza de la hidrotalcita siendo las más favorables las de Zn y Mg. Todas las muestras se sometieron a pruebas de lixiviación con acetona. En todas las pruebas, la molécula de clorofila ***a*** se mantiene intacta incluso después de treinta días en contacto con los sólidos, aunque las hidrotalcitas de Ni/Al descomponen una pequeña fracción de la clorofila ***a*** en feofitina.

Por su estructura y propiedades, las hidrotalcitas resultan un material adecuado para estabilizar las moléculas de clorofilina y de clorofila ***a***.

ABSTRACT

The photosynthetic process is a vital process that sustains life on Earth, converting carbon dioxide into sugars with the help of sunlight. The organisms capable of carrying out this process on Earth are higher plants, algae and some bacteria. To exploit this solar energy, photosynthetic organisms have developed different light harvesting pigments or antennas, similar to a satellite dish, by capturing the energy and concentrating this energy into a receptor where the signal is converted to a different form. These pigments in the higher plants are chlorophylls, carotenoids and bacteriochorophylls of the bacteria. The chlorophyll is essential for most of the photosynthetic organisms, since this molecule is the more efficient one for capturing and collecting the sunlight then released as chemical energy. Usually the higher plants, chlorophylls are forming protein-pigment complexes, where the proteins act as support of the chlorophylls. It helps to have an optimal distance and orientation between them in order to avoid the inhibition of its natural properties.

In experiments modeling photosynthesis, well dispersed chlorophyll molecules are required. Indeed, chlorophyll and its derivatives could be anchored on a suitable material. In this work, new hybrid materials were synthesized using hydrotalcite and a chlorophyll derivative: chlorophyllin. Chlorophyllin is incorporated and dispersed in hydrotalcite through simultaneous precipitation or during hydrotalcite reconstruction in a one-step process. In presence of a precipitant agent (NaOH) or microwave irradiation, both morphology and porosity of the hybrids can be controlled as the results obtained by adsorption-desorption isotherms, pore size distributions plots, infrared and ultraviolet visible spectra show. The effect of microwave irradiation on the crystallization step is discussed. In all cases stable materials are obtained; chlorophyllin molecules are isolated and bonded through hydrotalcite OH groups. Furthermore, the synthesis conditions employed in this work, determine the number and arrangement of the chlorophyllin molecules: between the layers or in the pore mouths of the hydrotalcites.

Besides, new hybrid materials were synthesized using hydrotalcites and chlorophyll ***a***. The effect of the support composition on chlorophyll ***a*** stabilization is discussed. The stability of the adsorbed chlorophyll *a* is affected by the support nature and the metal ratio of the hydrotalcite. The obtained hybrid compounds (chlorophyll ***a*** on hydrotalcite) are stable being the ones of Mg and Zn the more stable ones. Furthermore those hybrids were tested in lixiviation with acetone. In all cases, the lixiviated compound was chlorophyll *a* showing that the composition and nature of the molecule was preserved even after thirty days, although Ni/Al hydrotalcites decomposed a small fraction of chlorophyll to pheophytin. As the hydrotalcites are basic compounds, they are adequate materials to avoid degradation of chlorophyll molecules.

RÉSUMÉ

La photosynthèse est un procédé fondamental de la vie sur terre qui convertit le dioxyde de carbone en sucre en utilisant la lumière solaire. Les organismes capables d'effectuer la photosynthèse sont les plantes supérieures, les algues et certaines bactéries. Pour exploiter l'énergie solaire les organismes photosynthétiques ont développé différents pigments récepteurs de lumière ou antennes, semblables à des antennes paraboliques, en captant et concentrant l'énergie au sein d'un récepteur dans lequel le signal est converti sous différentes variantes. Ces pigments dans les plantes supérieures sont les chlorophylles, les caroténoïdes et les bactériochlorophylles des bactéries. La chlorophylle est essentielle pour la plupart des organismes photosynthétiques car cette molécule est la plus efficace pour capter et collecter la lumière solaire, restituée ensuite sous forme d'énergie chimique. Généralement les chlorophylles des plantes supérieures forment des complexes protéines-pigments dans lesquels la protéine joue le rôle de support des chlorophylles. Ceci permet d'avoir une distance et une orientation optimale entre elles et d'empêcher une inhibition de leurs propriétés naturelles.

Dans les expériences simulant la photosynthèse il est nécessaire de bien disperser les molécules de chlorophylle. La chlorophylle et ses dérivés peuvent être ancrés sur un matériau possédant les propriétés requises. Dans le présent travail, de nouveaux matériaux hybrides ont été synthétisés utilisant l'hydrotalcite et un dérivé de la chlorophylle : la chlorophyline. La chlorophyline est incorporée et dispersée dans l'hydrotalcite par précipitation simultanée ou au cours d'un procédé en une étape par reconstruction de l'hydrotalcite préalablement calcinée. La morphologie et la porosité des hybrides peuvent être contrôlées en présence d'un agent de précipitation (NaOH) ou d'irradiation microonde, comme le montrent les isothermes d'adsorption-désorption d'azote, les distributions de tailles de pores et les spectres Infrarouge et UV-Visible. L'influence de l'irradiation microondes sur l'étape de cristallisation est discutée. Dans tous les cas des matériaux stables sont obtenus : les molécules de chlorophyline sont isolées et liées aux groupements OH de l'hydrotalcite. De plus, les conditions de synthèse déterminent le nombre et

l'arrangement des molécules de chlorophyline situées, soit entre les feuillets, soit à l'entrée des pores des hydrotalcites.

Par ailleurs de nouveaux hybrides ont été aussi préparés à partir d'hydrotalcites et de chlorophylle *a*. L'influence de la composition du support sur la stabilisation de la chlorophylle *a* est discutée. La stabilité de la chlorophylle *a* adsorbée dépend de la nature du support et du rapport entre cations divalents et trivalents dans le réseau de l'hydrotalcite. Les composés hybrides obtenus (chlorophylle *a* sur hydrotalcite) présentent une bonne stabilité qui est la plus élevée dans le cas des hydrotalcites Mg/Al et Zn/Al. Ces hybrides ont été testés vis-à-vis de la lixiviation par l'acétone. Dans tous les cas le composé lixivié est la chlorophylle *a* montrant que la composition et la nature de la molécule sont conservées, même après trente jours. Une faible fraction de chlorophylle est décomposée en phéophytine dans le cas de l'hydrotalcite Ni/Al.

Les hydrotalcites, du fait de leurs propriétés basiques, sont des matériaux de choix pour empêcher la dégradation des molécules de chlorophylle adsorbées.

INTRODUCCIÓN

La clorofila es esencial para la mayoría de los organismos fotosintéticos puesto que es la molécula más eficiente encontrada en la naturaleza para la captación y recolección de la luz que después libera en forma de energía química. El proceso fotosintético es uno de los procesos vitales que sostiene la vida en la Tierra, consiste en transformar el dióxido de carbono a azúcares con la ayuda de la luz del Sol. Los organismos capaces de llevar a cabo este proceso en la Tierra son las plantas superiores, las algas y algunas bacterias. La luz del Sol en la superficie de la Tierra alcanza su intensidad máxima en el rango de 380 a 750 nm en el espectro electromagnético. También existe una significante contribución en el área del infrarrojo cercano (750-1000 nm). Para aprovechar esta energía solar, los organismos fotosintéticos han desarrollado diferentes pigmentos recolectores de luz o antenas, similares a una antena satelital, capturando energía y concentrándola en un receptor donde la señal es convertida a una forma diferente. Estos pigmentos en las plantas superiores son las clorofilas, los carotenoides y las bacterioclorofilas de las bacterias. Además, la clorofila transfiere la energía absorbida el centro de reacción principal para llevar a cabo la fotosíntesis. Dicho proceso se discute con mayor detalle en el Capítulo 1.

Generalmente en las plantas superiores las clorofilas se encuentran formando complejos pigmento-proteína, en donde las proteínas actúan como soporte de las clorofilas. Esto ayuda a tener una distancia y orientación óptimas entre ellas ya que de lo contrario existiría el riesgo de inhibir sus propiedades. La mayoría de las moléculas de clorofila son insolubles en agua y muy inestables en presencia de luz y temperatura. Sin embargo las moléculas de clorofila modificadas químicamente (compuestos derivados de la clorofila como la clorofilina) o retenidas en soportes muestran una mejor estabilidad. Existen diferentes formas de convertir la clorofila a clorofilina, pero la más conocida y usual es la saponificación del extracto de pigmentos fotosintéticos y una posterior separación por cromatografía. La clorofila y la clorofilina son sustancias anticarcinógenas y antimutagénicas. Además de combatir radicales libres,

protegen contra ciertas toxinas celulares (nitrosaminas, aflatoxinas e hidrocarburos). Sin embargo, estas moléculas presentan una alta inestabilidad a la luz. Para conferirles una mayor estabilidad es necesario tener una organización adecuada de las moléculas en un medio o soporte que haría la función de las proteínas en las plantas. Una solución puede ser el adsorber las moléculas de clorofila en un material "anfitrión" debidamente seleccionado. Se han hecho diferentes intentos de estabilización de los pigmentos fotosintéticos, sobre todo la clorofila y sus derivados, usando un soporte inorgánico. La inmovilización de la clorofila ***a*** en zeolitas no resulta efectiva debido a que el tamaño de poro de estos materiales los hace inaccesibles, en efecto el diámetro de poro es más pequeño que el radio dinámico de la clorofila ***a***. Aunque se ha reportado que se ha logrado estabilizar la clorofila ***a*** en arcillas catiónicas, no se especifica cuán estable es la clorofila en estos materiales con el tiempo. Las sílices mesoporosas, si no se tratan con silanoles para conferirles superficies menos ácidas, provocan la feofitinización de las moléculas. Las hidrotalcitas, por su estructura y propiedades, resultan un buen candidato para favorecer tanto la estabilización como la correcta organización y dispersión de las moléculas de clorofila ***a*** y sus derivados (Rivera y col., 2006; Ishi y col., 1995). En este sentido, en el presente trabajo se reporta, por primera vez, la retención de clorofilina o de clorofila ***a*** en hidrotalcitas. El trabajo se enfoca en la síntesis y caracterización de hidrotalcitas de diferente composición y relación molar, para su empleo en la inmovilización de la clorofila y de la clorofilina por diferentes métodos, como regeneración estructural, síntesis simultánea o intercambio. El detalle de los procedimientos de síntesis de las hidrotalcitas iniciales y de los híbridos clorofilina-hidrotalcita y clorofila ***a***-hidrotalcita se describen en el Capítulo 2. Una discusión de los resultados obtenidos en este trabajo se presenta en el Capítulo 3, donde se analizan las interacciones entre los materiales iniciales y las moléculas retenidas, así como su posible arreglo en las hidrotalcitas, empleando diferentes técnicas de caracterización como la difracción de rayos X, el análisis termogravimétrico y termodiferencial, las espectroscopias de infrarrojo, ultravioleta visible, ultravioleta visible de reflectancia difusa y emisión de fluorescencia, el análisis elemental, la

adsorción-desorción de nitrógeno y la microscopía electrónica de barrido.

Se espera que los híbridos obtenidos en este trabajo y a futuro, puedan emplearse como unidades constructoras para obtener fotoantenas para la recolección de la energía luminosa o como sensores para canalizarla. Además, aplicaciones como motores moleculares o en la terapia fotodinámica pueden resultar muy importantes.

OBJETIVOS

- **General**

Estudiar la inmovilización de clorofila ***a*** o de clorofilina en hidrotalcitas de diferentes composiciones y relaciones metálicas molares obtenidas por diferentes procedimientos de síntesis.

- **Específicos**

1. Sintetizar hidrotalcitas de diferente composición M^{II}/Al (M^{II} = Mg, Ni, Zn) y de diferente relación metálica molar $M^{II}/Al = X$ (X = 2, 3 o 4;) en presencia de microondas.

2. Sintetizar hidrotalcitas de diferente composición M^{II}/Al (M^{II} = Mg, Ni o Zn) de relación metálica molar $M^{II}/Al = 3$ por el método convencional.

3. Retener las moléculas de clorofilina en la hidrotalcita por efecto memoria y por coprecipitación simultánea.

4. Inmovilizar las moléculas de clorofila ***a*** en las hidrotalcitas por impregnación.

5. Caracterizar los sólidos empleando diferentes técnicas como: difracción de rayos X, análisis elemental, fisisorción de nitrógeno, microscopia electrónica de barrido, análisis termogravimétricos, espectroscopias de infrarrojo, de ultravioleta visible, de ultravioleta visible de reflectancia difusa y de emisión de fluorescencia.

6. Probar la lixiviación de la clorofila ***a*** retenida en las hidrotalcitas estudiando su estabilidad en función del tiempo.

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES

CAPÍTULO 1. GENERALIDADES

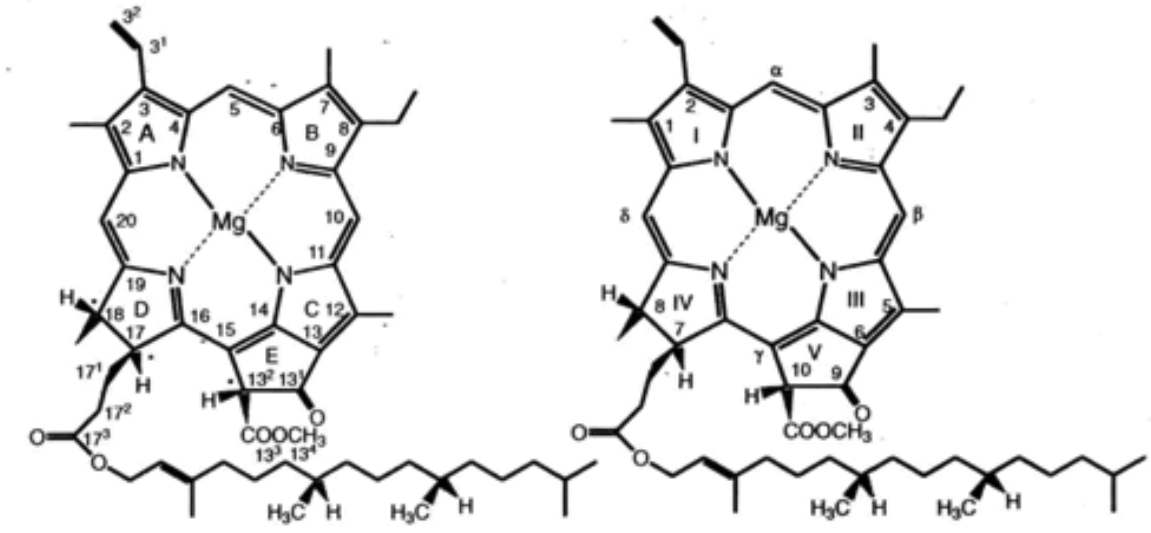
1 Pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos son el “alma” de los organismos fotosintéticos. Sin ellos, la luz no puede ser absorbida y, por lo tanto, la energía no puede almacenarse para después transformarse en energía química. En la naturaleza se encuentran diferentes tipos de pigmentos fotosintéticos, tienen diferentes funciones y se pueden encontrar en diferentes organismos o microorganismos (Blankenship, 2002). Las clorofilas se nombran de la ***a*** a la ***d*** y las bacterioclorofilas de la *a* a la ***g***, en orden de su descubrimiento. Existen además los carotenoides y las bilinas como otra de las dos más importantes clases de pigmentos fotosintéticos. Para el desarrollo de este trabajo sólo se estudiarán las clorofilas y sus derivados.

Las clorofilas han sido objeto de estudio por muchos investigadores (Aronoff, 1966; Scheer, 1991). Fue Pelletier el primero en utilizar la palabra clorofila, en 1818, para describir los pigmentos verdosos que estaban involucrados en el proceso de la fotosíntesis en las plantas.

1.1 Formación y estructura general de las clorofilas

La fórmula química molecular de la clorofila ***a*** es $C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$. Así simplemente con esta representación es muy poco probable lograr apreciar las propiedades esenciales de tan extraordinaria molécula. La fórmula estructural de la clorofila ***a***, se representa en la Figura 1.1.



Clorofila *a* (IUPAC) **Clorofila *a* (Fischer)**

Figura 1.1. Fórmula estructural de la clorofila ***a*** y su sistema de numeración IUPAC (izquierda) y la más antigua de Fischer (derecha), Blankenship, 2002.

Se trata de una molécula con una porción plana (macrociclo) en forma de cuadrado con 14.5 Å de lado (*Material Studio, dreiding force field*, *DFF*, para la parte orgánica y *universal force field, UFF*, alrededor del Mg) y una cadena larga o grupo fitol de 20 Å. En el centro de esta porción plana, se localiza un átomo de magnesio el cual está coordinado a cuatro átomos de nitrógeno. Estos cuatro nitrógenos son, cada uno, parte de un elemento subestructural de la molécula llamado anillo pirrólico, es un compuesto orgánico cíclico de cinco miembros, un nitrógeno y cuatro carbonos. Es por ello, que usualmente se hace referencia a las clorofilas y a sus compuestos derivados como tetrapirroles. Se forma un quinto anillo en la esquina inferior derecha del “cuadrado” y una cadena larga hidrocarbonada, llamada grupo fitol. Esta cadena está unida a la esquina inferior izquierda (en la representación estándar). Químicamente, las clorofilas se relacionan con las porfirinas, las cuales son también tetrapirroles, pero las porfirinas son, generalmente, moléculas más simétricas.

Los cinco anillos en las clorofilas se etiquetan con las letras, en mayúsculas, de la A hasta la E, y las posiciones de los sustituyentes sobre el macrociclo (tetrapirrol) se enumeran en el sentido de las manecillas del reloj, como se muestra

en la Figura 1.1, de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC. Existe otra nomenclatura, más antigua, conocida como el sistema Fischer, Figura 1.1. Por convención, el eje molecular ***y*** de todas las clorofilas, es el que pasa a través de los átomos de N de los anillos A y C; el eje ***x*** pasa a través de los átomos de N de los anillos B y D. El eje ***z*** es perpendicular al plano del macrociclo. Una extensa deslocalización de electrones π se tiene en casi toda la molécula, exceptuando el anillo D, en el cual el doble enlace en los carbonos C-17 y C-18 se reduce a un enlace sencillo. La cadena o grupo fitol, se forma por condensación de cuatro unidades de isopreno y después es esterificada al anillo D.

La mayoría de las clorofilas se clasifican como clorinas más que porfirinas debido al anillo D reducido. Gran parte de las bacterioclorofilas se denominan similarmente, bacterioclorinas, por la reducción de los anillos B y D, en este tipo de moléculas. Todas las clorofilas y bacterioclorofilas contienen el anillo “extra” E, llamado anillo isocíclico. Casi todos los pigmentos tipo clorofila, contienen tres átomos de carbono quirales, C-13[2], C-17 y C-18. En todos los casos, la fidelidad estereoquímica de las enzimas biosintéticas, es extremadamente alta, por lo que los compuestos encontrados en las células son especies únicas y no mezclas de diasterómeros. En la Figura 1.2 se muestra la estructura de los cuatro tipos principales de las clorofilas.

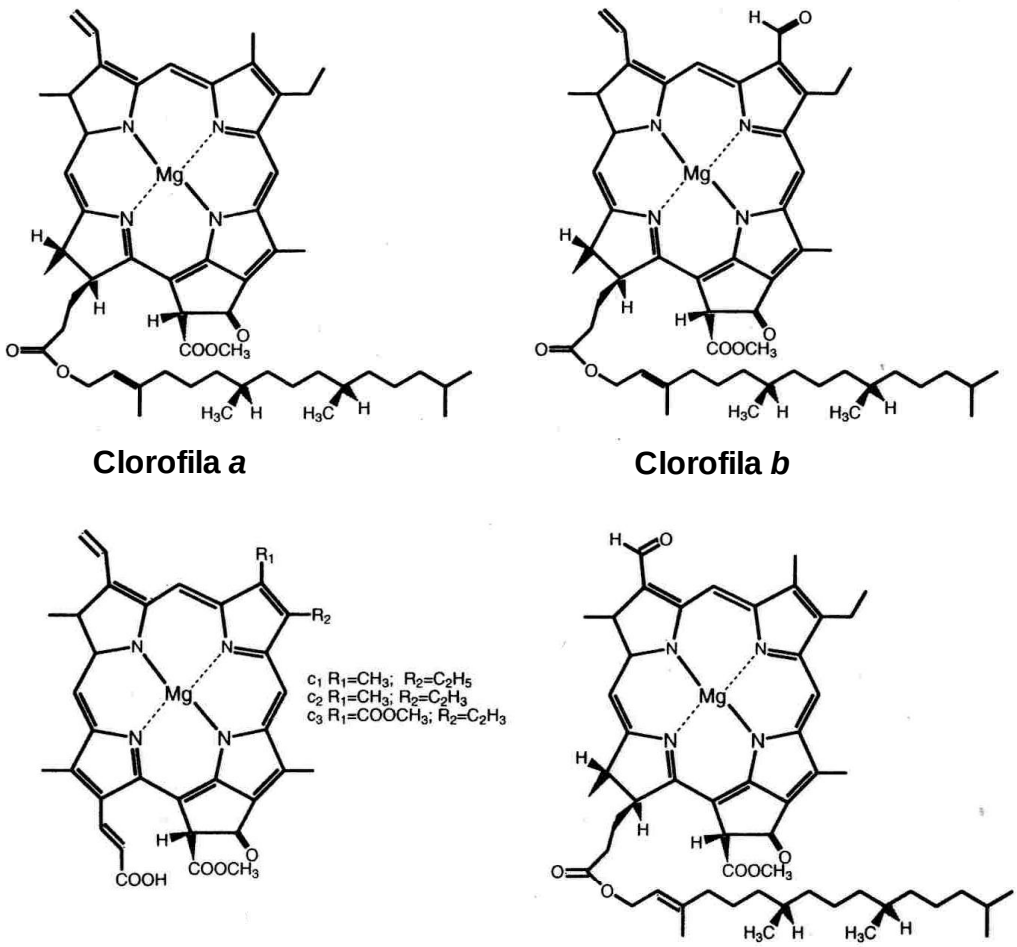


Figura 1.2 Estructura de las clorofilas *a*, *b*, *c* y *d*, Blankenship, 2002.

1.1.2 Clorofila *a*

La clorofila ***a*** se encuentra en todos los organismos conocidos como eucarióticos. Entre los procarióticos se encuentra en grandes cantidades sólo en las cianobacterias (incluyendo a los proclorofitos), aunque también se pueden encontrar trazas de variantes menores de la clorofila ***a*** en algunas bacterias anoxigénicas, la heliobacteria y la sulfobacteria verde, en donde tiene una importante función como intermediario en la cadena de transporte de electrones. Algunos proclorofitos contienen divinil clorofila ***a***, en el que el sustituyente en la posición C-8 del anillo B, es un grupo vinilo en lugar de un grupo etilo. Existe una variación muy importante de la clorofila ***a***, llamada clorofila ***a'***, la cual se diferencia de la clorofila ***a***, solamente en la estereoquímica de la posición del C-13[2]. Se encuentra en pequeñas pero

reproducibles cantidades en los complejos del fotosistema I, donde una molécula forma la mitad del llamado P700, sistema primario donador de electrones. Las propiedades redox y las propiedades espectrales de la clorofila ***a'*** son muy similares a los de la clorofila ***a***.

1.1.3 Clorofila *b*

La clorofila ***b*** es idéntica a la clorofila ***a*** excepto que, en la posición C-7, un grupo formilo reemplaza al grupo metilo. Este cambio mueve el máximo de absorción a longitudes de onda más cortas. La clorofila ***b*** es el principal pigmento o accesorio absorbedor de luz en los organismos fotosintéticos eucarióticos, con la excepción de las algas roja y café. En organismos fotosintéticos procarióticos se encuentra sólo en los proclorofilos.

1.1.4 Clorofila *c*

La clorofila ***c*** es quizás, la más inusual de todas las clorofilas, además no tiene la cadena fitólica y tampoco tiene el anillo D reducido. Por estas razones, se clasifica como porfirina y no como clorina. La clorofila ***c*** se encuentra principalmente en varios grupos de algas marinas, tales como las diatomeas y dinoflagelados. Funciona como un pigmento o accesorio recolector de luz, en complejos de proteína-pigmento similares a los que ocurren con la clorofila ***b*** en las plantas y algas verdes.

1.1.5 Clorofila *d*

La clorofila ***d*** es diferente de la clorofila ***a*** en sólo una cosa: el sustituyente en la posición C-3 es un grupo formilo en la clorofila ***d***, mientras que en la clorofila ***a*** se tiene un grupo vinilo. Hace algún tiempo, la clorofila ***d*** se conocía solo como una traza constituyente de ciertas algas y se suponía que así era. Sin embargo, en 1996 se descubrió una cianobacteria (*Acariocloris marina*) como un simbionte en un invertebrado marino. Este organismo contiene clorofila ***d*** como pigmento principal, aunque también contiene clorofila ***a*** y clorofila ***b***, entre otros.

1.2 Propiedades espectroscópicas de las clorofilas

Todas las clorofilas tienen dos bandas principales de absorción, una en el azul o cerca de la región ultravioleta y otra en el rojo o cerca de la región del infrarrojo. El color verde o verde azulado de las clorofilas, se debe a la falta de una absorción en la región verde del espectro. Estas bandas de absorción son principalmente transiciones electrónicas π →π* del sistema π conjugado del macrociclo clorin. Los espectros de absorción y de fluorescencia de la clorofila ***a*** se muestran en la Figura 1.3, (Blankenship, 2012).

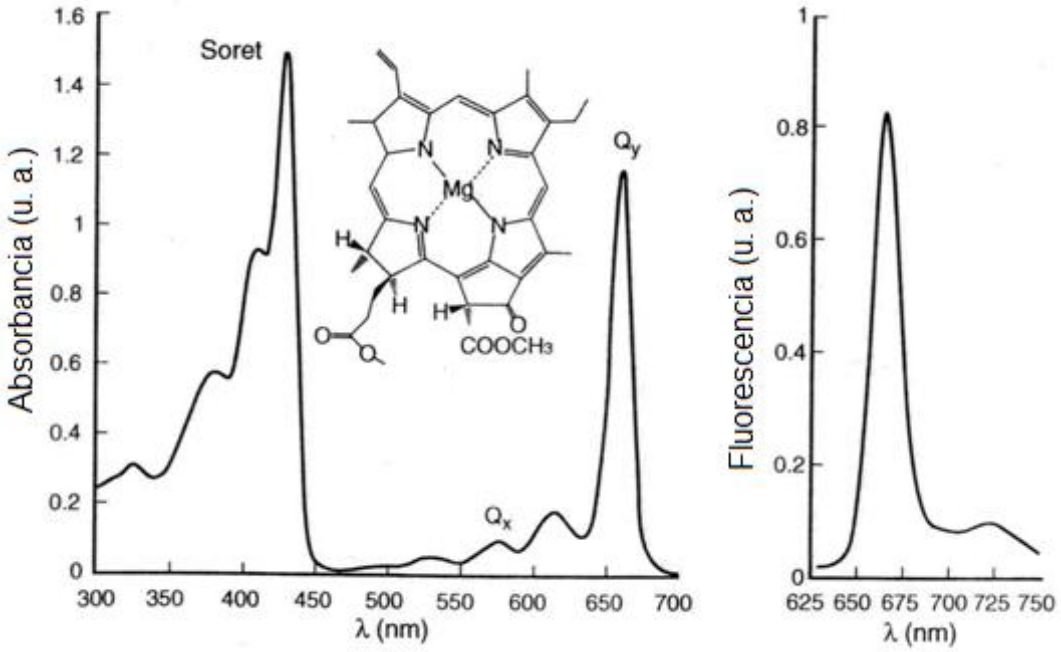


Figura 1.3. Espectros de absorción (izquierda) y fluorescencia (derecha) de la clorofila ***a*** en éter.

Los espectros obtenidos para esta molécula pueden describirse teóricamente con el modelo de “cuatro orbitales” propuesto, originalmente, por Martin Gouterman, 1961. Este modelo propone que existen cuatro orbitales moleculares π que están involucrados principalmente en estas transiciones y son los dos orbitales ocupados de más alta energía (HOMO) y los dos orbitales desocupados de más baja energía (LUMO). En la Figura 1.4 se muestran los diagramas de orbitales moleculares y las transiciones predichas para una porfirina simétrica, el grupo clorin y el grupo

bactereoclorin. Las dos transiciones de más baja energía se conocen como bandas Q y las dos bandas de más alta energía como bandas B o también bandas de Soret.

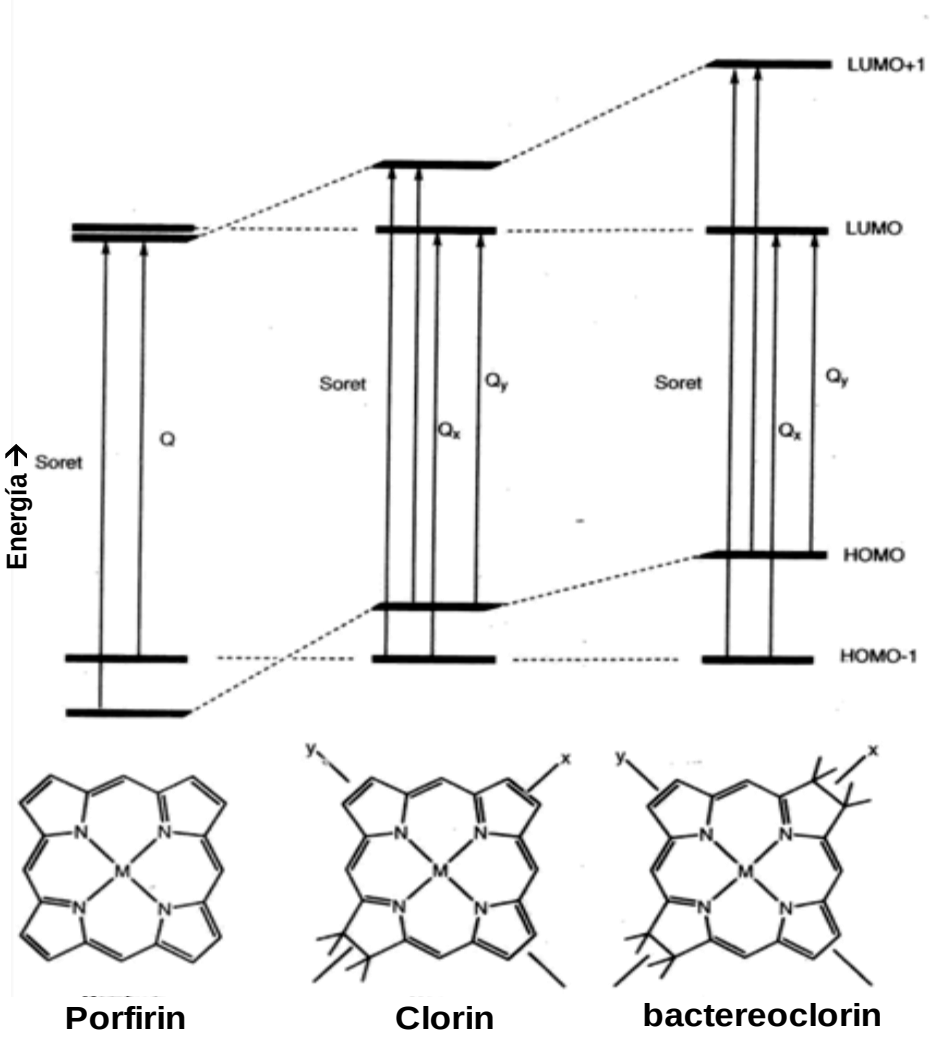


Figura 1.4. Diagrama de orbitales moleculares de los niveles de energía del grupo porfirin, del grupo clorin y del grupo bactereoclorin. Se indica una representación muy simple de las diferentes transiciones electrónicas, Blankenship, 2002.

Las transiciones electrónicas tienen momentos dipolares de transición con diferentes fuerza y orientación. La transición con longitud de onda más grande se polariza, invariablemente, a lo largo del eje ***y*** de la molécula y se conoce como la transición Q_y. Esto significa que la absorción será más fuerte si el vector eléctrico del

plano de la luz polarizada que está excitando al pigmento es paralelo al eje molecular ***y*** de éste. La luz de excitación acopla a los electrones π de la molécula y los rearregla de cierta manera durante la transición. La transición Q_y provoca un desplazamiento en la densidad electrónica dirigido a lo largo del eje molecular ***y*** de la molécula, como se ilustra en la Figura 1.5. La transición Q_x, es más débil que la transición Q_y, sin embargo es más intensa y mejor definida en la bacterioclorofila ***a*** que en la clorofila ***a*** y cálculos teóricos sugieren que no está polarizado a lo largo del eje x de la molécula de clorofila ***a*** como lo estaría en la bacterioclorofila ***a***. Las bandas de Soret tienen una polarización mixta.

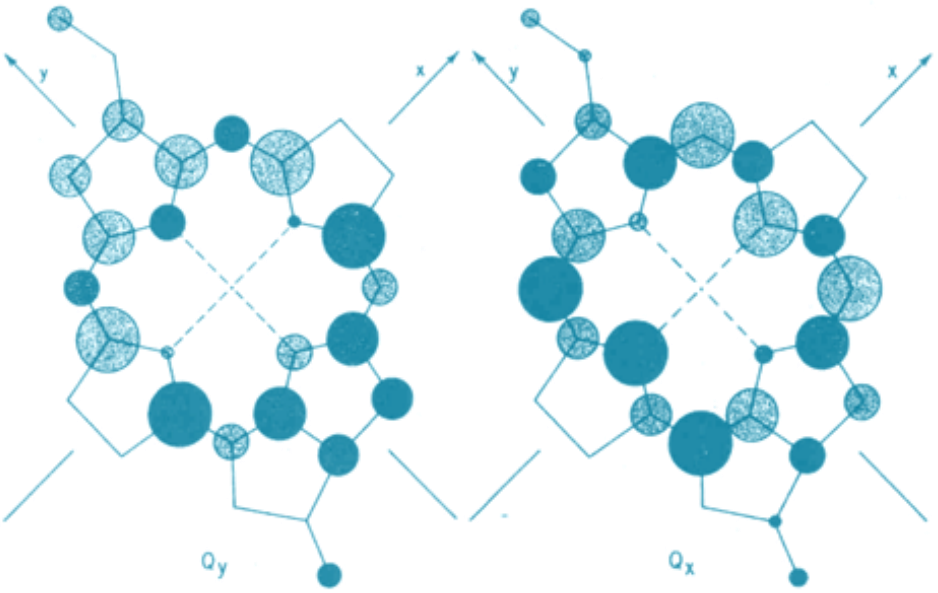


Figura 1.5. Cambios de densidad electrónica asociados a las transiciones Q_x y Q_y de la bactereoclorofila ***a***.

Además de las transiciones electrónicas fundamentales Q y B se pueden también observar transiciones conocidas como sobretonos, especialmente sobre la banda de absorción Q_y, esto es, se tienen transiciones electrónicas y vibracionales, siendo su estado final, un estado vibracional excitado, del estado electrónico excitado. Se puede observar una progresión de estados vibracionales, por ejemplo, la transición más intensa, la banda 0,0 presenta los siguientes estados de más alta energía, llamados satélites 0,1; 0,2; etc. El primer número es el número cuántico vibracional del estado electrónico basal antes de la absorción de luz, y el segundo

número es el estado vibracional del estado electrónico excitado después de la transición. En la molécula de clorofila hay muchas vibraciones y solo una de estas es la responsable de la estructura vibracional en su espectro de absorción. El espectro de fluorescencia de todas las clorofilas presenta picos en longitudes de onda ligeramente más grandes que el pico máximo de absorción. La emisión de fluorescencia se polariza a lo largo del eje molecular ***y*** puesto que es emitida desde la transición Q_y. El espectro de fluorescencia usualmente tiene una relación característica, “imagen especular”, con el espectro de absorción. Este se debe a que los estados basal y de excitación tienen formas similares, entonces, las vibraciones moleculares que se activan durante la absorción electrónica se activan tras la emisión. Sin embargo, en este caso, el estado inicial es el estado vibracional basal del estado electrónico excitado, y el estado final, es el estado vibracional excitado del estado electrónico basal. Esto causa un desplazamiento en la emisión a una longitud de onda más grande.

En la Tabla 1.1 se muestran las longitudes de onda de absorción, el coeficiente de extinción molar y los tiempos de vida media de fluorescencia de las clorofilas en disolventes orgánicos. Las propiedades espectrales de estos pigmentos se alteran significativamente, cuando se incorporan en complejos proteínicos. En todos los casos, la longitud de onda máxima se desplaza a longitudes de onda más grandes en sistemas proteína-pigmento; algunas veces este desplazamiento es de más de 100 nm (Blankenship, 2002).

Tabla 1.1 Propiedades espectroscópicas de las clorofilas *in vitro*[a].

Clorofila	Disolvente	λ_{max} (nm)	ξ_{max}[b] ($mM^{-1}cm^{-1}$)	τ_f (ns)[c]
a	éter	662, 578, 430	90.0	6.1
b	éter	644, 549, 455	56.2	3.6
c_1	piridina	640, 593, 462	35.0	6.1
d	éter	688, 447	-	-

[a] datos tomados de Scheer, 1991

[b] valores obtenidos de la máxima absorción en la banda Q_y

[c] valores tomados de Seely y Cannolly, 1986

1.3 Extracción de clorofilas

1.3.1 Disolventes de extracción

Los pigmentos clorofílicos son insolubles en agua pero son solubles en disolventes orgánicos como por ejemplo en el alcohol etílico y en la acetona. Los disolventes que extraen simultáneamente todos los pigmentos de una hoja se les suele llamar extractantes. Existen otros disolventes que presentan afinidad por algunos pigmentos y se les llama separadores, como por ejemplo el tetra cloruro de carbono y el éter de petróleo.

La mayoría de los autores que ha trabajado con la extracción de pigmentos en algas concuerdan en que el disolvente inicial de extracción debe ser miscible en agua (normalmente metanol o acetona) y deben emplearse alrededor de 20 mL por gramo de hojas (Strain y Svec, 1969) así, el agua en el interior de la célula se diluye rápidamente previniendo la degradación de los pigmentos. La acetona es el

disolvente que ha sido empleado tradicionalmente como disolvente de extracción de pigmentos en plantas superiores. Barrett y Jeffrey (1964, 1971) mostraron que a concentraciones arriba del 90 % se inhibe la enzima clorofilasa, la cual es responsable de la hidrólisis de las clorofilas *a* y *b* a sus respectivas clorofilidas. Algunos autores encontraron que la acetona es poco satisfactoria para la extracción de los pigmentos liposolubles de una manera eficaz. Jeffrey y col. (Jeffrey 1968a, c, 1974, 1981; Jeffrey, Sielicki y Haxo, 1975; Jeffrey y Hallegraeff, 1980a; Jeffrey y Wright, 1987) encontraron que la acetona (100 %) es incluso muy eficaz en la extracción de los pigmentos de algunas microalgas. Bjørnland y Tangen, 1979 y Bjørnland, Borch y Liaaen-Jensen, 1985 hicieron una primera extracción con acetona pura para inhibir la clorofilasa seguida de una segunda extracción con una mezcla de acetona-metanol (3:7) mientras que Whiters y col., 1978a y Fiksdahl y col., 1984b usaron acetona al 100 % después al 90 y 80 % con ultrasonido. Cuando no era muy importante inhibir a la clorofilasa (por ejemplo en la extracción de la clorofila ***c*** o de los carotenos), Ricketts 1966a, 1967c; Jeffrey 1968b, 1969, 1972; Mandelli 1968 y Haxo 1985 usaron acetona al 90 %. Algunos otros emplearon acetona al 85 % (Weber y Czygan, 1972).

Para la extracción de clorofila ***a*** en plantas superiores también se han probado diferentes métodos e incluso se han establecido procedimientos óptimos para la extracción (Porra y col., 1989). En la mayoría de estos estudios al igual que para las algas o microalgas se ha utilizado la acetona pura o acuosa como disolvente de extracción seguida de múltiples extracciones. La acetona se usó tradicionalmente en la extracción para facilitar los estudios espectrofotométricos (Porra y col., 1989). Se ha dicho que la extracción con metanol puro, bajo ultrasonido, es el método más efectivo y seguro, debido al disolvente (Wright, 1987). En algunos otros estudios basados en la metodología de Wright (Wright y col., 1997) se ha utilizado el metanol acuoso como disolvente de extracción para las hojas de las plantas. Algunos otros han trabajado con etanol anhidro como disolvente de extracción. Sin embargo es necesario determinar si dichos procedimientos de extracción son los adecuados y los mejores para la eficiente extracción de los pigmentos fotosintéticos, incluyendo a la clorofila, de las plantas o bien si es

necesario combinarlos o crear un nuevo procedimiento partiendo de los ya existentes.

1.3.1.1 Métodos físicos empleados en la extracción

Las técnicas o los métodos para la extracción de los pigmentos pueden variar según el tipo de planta del que se trate y se ha encontrado que en general el procedimiento consiste en cortar las hojas (o algas) en pequeños pedazos y triturarlas en un matraz, en licuadoras, en trituradores para café o bien en trituradores diseñados especialmente para este tipo de tareas. Algunos congelan y descongelan las hojas (o algas) antes de la trituración o las hierven unos minutos. Extraer los pigmentos evitando su degradación depende de la rapidez con que éstos se remuevan del medio que provoque la degradación. Strain utilizó una mezcla de metanol y éter de petróleo para extraer los pigmentos provocando así que éstos puedan emigrar rápidamente a una fase no acuosa donde se separan de cualquier agente soluble en agua que pueda provocar su degradación como por ejemplo las enzimas, los ácidos o los agentes oxidantes.

1.3.1.2 Trituradores (molinos)

Normalmente, para extraer los pigmentos fotosintéticos se necesita una ruptura mecánica de las células muy rápida, tanto en algas como en plantas superiores. Los mejores y más modernos molinos tienen afiladas cuchillas que giran dentro de unos discos o placas fijas que lanzan el tejido molido o triturado a través de las cuchillas por la fuerza centrífuga y succionan la suspensión fresca de abajo. Estos trituradores como el Ultra-turrax o el Polytron, son mucho más eficientes que las licuadoras usadas en casa como las empleadas por Goodwin, 1955; Jensen, 1978 y Bjørnland, 1984. Además, el calor del motor eléctrico no se propaga a las cuchillas. Existen algunos que se han diseñado para soportar temperaturas tan bajas como la del nitrógeno líquido. Para cantidades pequeñas de muestra, un mortero y pistilo con arena de cuarzo por ejemplo, también resulta efectivo en la extracción de los pigmentos fotosintéticos.

1.3.1.3 Ultrasonido

Para tener una extracción eficiente utilizando ultrasonido se requiere un muy buen contacto entre las células que hay que “romper” y el contenedor del instrumento. Nelson, 1969 fue el primero en utilizar ultrasonido para la extracción de los pigmentos del fitoplancton reportando de un 11 a 33 % más clorofila ***a*** en los extractos usando un oscilador ultrasónico a 9 kV por un tiempo máximo de 9 minutos y una extracción en acetona a 4°C durante toda la noche.

1.3.1.4 Calentamiento

La oxidación, hidrólisis e isomerización son las reacciones de degradación principales que sufren sobre todo las clorofilas durante la extracción y algunos investigadores han decidido utilizar calentamiento para inhibir las enzimas responsables de tales reacciones (T ~ 50 °C). Aunque el calentamiento puede inhibir algunas enzimas puede incrementar la isomerización y la pirólisis (Strain, 1954; Strain y Svec, 1966). Un calentamiento breve, parece ser mejor cuando se realizan extracciones a gran escala donde los productos de degradación que se formaron durante la extracción pueden eliminarse mediante una purificación subsecuente (Jeffrey, 1972).

1.3.1.5 Liofilización y congelamiento

Esta técnica se utiliza para preservar lo mejor posible las algas o las hojas de las plantas si es que no van a ser utilizadas inmediatamente después de haber sido cosechadas para la extracción de los pigmentos. Se ha comprobado que no existe mejora alguna en la extracción (Withers y col., 1978a; Yokohama y col., 1981a, 1983).

1.3.1.6 Filtración

Normalmente la filtración se utiliza para remover los tejidos restantes de la célula y dejar un extracto ópticamente transparente y sin residuos que puedan provocar opalescencia. Esto es necesario para los análisis realizados por espectroscopia de ultravioleta visible, por ejemplo, en donde es necesario que la muestra en cuestión sea ópticamente transparente, es decir sin ninguna traza de opalescencia para poder medir correctamente la absorción.

1.3.1.7 Centrifugación

La centrifugación puede usarse con el mismo propósito que la filtración.

1.4 Separación y purificación de clorofilas

La cromatografía ha reemplazado a todas las técnicas y métodos antiguos basados en la separación de fases usadas en las primeras investigaciones sobre separación y purificación de pigmentos fotosintéticos, en especial las clorofilas. En trabajos basados en la purificación de carotenos únicamente se utiliza la saponificación para remover las clorofilas y algunos ácidos orgánicos.

1.4.1 Saponificación

La saponificación involucra el uso de KOH disuelto en metanol y se adiciona al extracto crudo dejándolo reposar en la oscuridad a temperatura ambiente para así formar sales de potasio de los ácidos orgánicos, incluyendo a las clorofilas *a* y *b* las cuales ahora son solubles en agua. Existen otros métodos utilizados donde se recomienda evaporar el extracto crudo hasta secarlo, después disolver el extracto con una pequeña cantidad de éter y agregar la misma cantidad en volumen de una disolución metanólica de KOH al 10 %. Después de una o dos horas en la oscuridad y a temperatura ambiente, los pigmentos que no han sido saponificados se recuperan agregando una disolución de NaCl 2-5 % en un embudo de separación

dejando los pigmentos saponificados y otros ácidos en la hipofase y los pigmentos no saponificados en la epifase del éter el cual puede evaporarse bajo una corriente de nitrógeno gaseoso y analizarse en un cromatograma (Liaaen Jensen y Jensen, 1971; Jensen, 1978). Davies (1965, 1976) recomienda disolver el pigmento en metanol o etanol, después adicionar en una relación 1:10 una disolución de KOH acuoso al 60 % y después ya sea calentar la mezcla alcalina de 5 a 10 min en la oscuridad a baño maría, o bien mantener la mezcla en la oscuridad a temperatura ambiente. Ambos tratamientos deben llevarse a cabo bajo una atmósfera de nitrógeno gaseoso. Goodwin, 1955 adiciona KOH en una relación de 1:10 en volumen pero mantiene la mezcla en la oscuridad durante toda la noche. Existen algunas ligeras modificaciones a los métodos descritos anteriormente que se han hecho en otros trabajos (Chapman y Haxo, 1963; Thomas y Goodwin, 1965; Britton y Goodwin 1971; Lubian y Establier, 1982). Algunos autores agregan el KOH directamente al disolvente de extracción (Hiyama y col., 1969).

1.4.2 Separación por partición

La polaridad variable de los pigmentos lipo-solubles permite la partición de las muestras en una fracción epifásica (arriba) y una hipofásica (abajo). El sistema de dos fases normalmente contiene éter de petróleo en la epifase y metanol al 90 % en la hipofase (Goodwin, 1955; Davies, 1965, 1976; Britton y Goodwin, 1971). Los carotenos, las clorofilas *a* y *b*, y las xantofilas contienen un grupo epóxido, ceto o hidroxilo y ésteres, y los pigmentos metilados generalmente se mueven hacia la epifase mientras que las xantofilas remanentes se mueven a la hipofase. Las xantofilas, que son lábiles en álcalis como la fucoxantina y la piridina, estarán en la hipofase permitiendo así la esterificación de las clorofilas que se encuentran en la epifase (Liaaen-Jensen, 1971). Las xantofilas que se encuentran en cualquiera de estas hipofases metanólicas pueden recuperarse adicionando éter y agua. Parsons, 1963 utilizó un sistema bifásico teniendo hexano en la epifase y acetona acuosa en la hipofase, para separar la clorofila ***c*** (hipofase) de los carotenoides y de otras clorofilas. Este fue uno de los primeros trabajos para la determinación de la clorofila ***c*** presente en algas. Derivados de las clorofilas (sin el grupo fitol) se mueven junto con la clorofila ***c*** (clorofilidas y feoforbidas).

1.4.3 Cromatografía

La cromatografía es ahora el método más utilizado para separar y purificar pigmentos liposolubles, va usualmente precedida por una saponificación cuando sólo se requiere examinar y cuantificar carotenoides. Los pigmentos no están lo suficientemente concentrados en los extractos iniciales para aplicarlos directamente a las placas cromatográficas. La mayoría de los investigadores concentran y purifican parcialmente el extracto crudo o inicial que se encuentra en el metanol o la acetona (o cualquiera que haya sido el disolvente empleado para la extracción) adicionando un pequeño volumen de un disolvente que sea inmiscible en agua, por ejemplo éter, hexano, acetato de etilo o éter de petróleo y después adicionando agua para formar una epifase en la cual el pigmento se concentra y es liberado de algunos de los componenetes más polares los cuales se mueven a la hipofase, rica en agua.

1.4.3.1 Cromatografía en columna

Este método fue esencialmente desarrollado por Tswett (1906a, 1911). Una columna de vidrio se rellena con algún adsorbente, una disolución concentrada de pigmentos se coloca en la parte superior de la columna y dichos pigmentos se separan en bandas sucesivas por medio de lavados continuos con uno o más disolventes orgánicos a través de la columna con o sin una ligera succión (arriba de unas 0.5 atm). Las columnas empleadas suelen ser de 5 a 10 cm de diámetro y alrededor de 35 cm de largo para columnas preparativas.

Davies, 1976 dividió los métodos de cromatografía en columna según tres tipos básicos:

Cromatografía de zona: el disolvente usado debe separar a todos los pigmentos mientras éstos están todavía en la columna después deben ser extruidos y disueltos en el disolvente apropiado (Strain, 1958; Liaaen-Jensen, 1971). El adsorbente utilizado para rellenar la columna debe mantener su forma después de la extrusión, por ejemplo, la sucrosa, el $CaCO_3$ y la sílica gel (aunque en menor grado que los anteriores). Alternativamente a este procedimiento, los pigmentos separados

pueden irse recolectando de la columna como van siendo resueltos (separación flash por cromatografía en columna).

Cromatografía de elución por etapas: la columna se lava con disolventes de polaridad creciente o bien se utilizan diferentes columnas para separar los pigmentos. Omata y Murata, 1938a separaron las clorofilas ***a*** y ***b*** de los carotenos usando una segunda columna de Sefarosa-DEAE CL-6B y separaron la clorofila ***a*** de la ***b*** usando una tercera columna de Sefarosa CL-6B. Además, descubrieron que se necesitan columnas pequeñas y velocidades de flujo altas. Araki y col., 1984 fueron cambiando los disolventes de elución para que los carotenos, la clorofila ***a***, la feofitina ***a*** y la clorofilida ***a*** pudieran separarse en una sola columna de Sefarosa-DEAE.

Cromatografía líquida de alta resolución: este método utiliza columnas de diámetro pequeño, tamaños de partícula muy finos y velocidades de flujo muy rápidas. Tiene la ventaja de ser muy rápido y sensible además de que los pigmentos quedan más protegidos de la degradación a causa del oxígeno. Schwartz y von Elbe, 1982 revisaron los sistemas utilizados para la separación de los pigmentos de plantas y realmente muy pocos lograron separar todas las clorofilas y carotenos en mezclas que contienen más de 10 pigmentos. No obstante ninguno ha separado completamente todos los pigmentos.

1.4.3.2 Cromatografía de capa fina

La cromatografía de capa fina (CCF) es una forma de cromatografía de adsorción sólido-líquido que constituye una técnica importante para el análisis rápido de muestras que en algunos casos puede estar alrededor de 10^{-9} g. La separación de clorofilas y sus productos de degradación por CCF fue realizada por Sestak 1967, 1982 y Dolphin, 1983. Para realizar el análisis de una muestra se utiliza un adsorbente sólido, como la sílica gel o la alúmina, unido a una placa rectangular de vidrio o de plástico. La sílica gel es la más empleada por su facilidad de manejo en la impregnación de las placas y puede almacenarse durante un tiempo relativamente largo.

1.5 Compuestos derivados de las clorofilas

1.5.1 Productos de degradación

Como se mencionó, cuando se extraen las clorofilas de las hojas de espinaca, por ejemplo, además de tener los pigmentos fotosintéticos, especialmente las clorofilas, también se pueden encontrar productos de degradación de la clorofila. Los productos de degradación más comunes son los derivados de la pérdida del Mg central, feofitinas o feoporfirinas. La pérdida del grupo fitol por hidrólisis, es otro producto común de degradación y forma a las clorofilidas y a las feoforbidas. La naturaleza de los productos de degradación de la clorofila dependen de qué parte de la molécula está siendo afectada. Gracias a Stoll, 1912 se tienen contribuciones acerca del rompimiento de la molécula de la clorofila fue él quien descubrió la enzima clorofilasa y la hidrólisis enzimática de la clorofila ***a***, Figura 1.6.

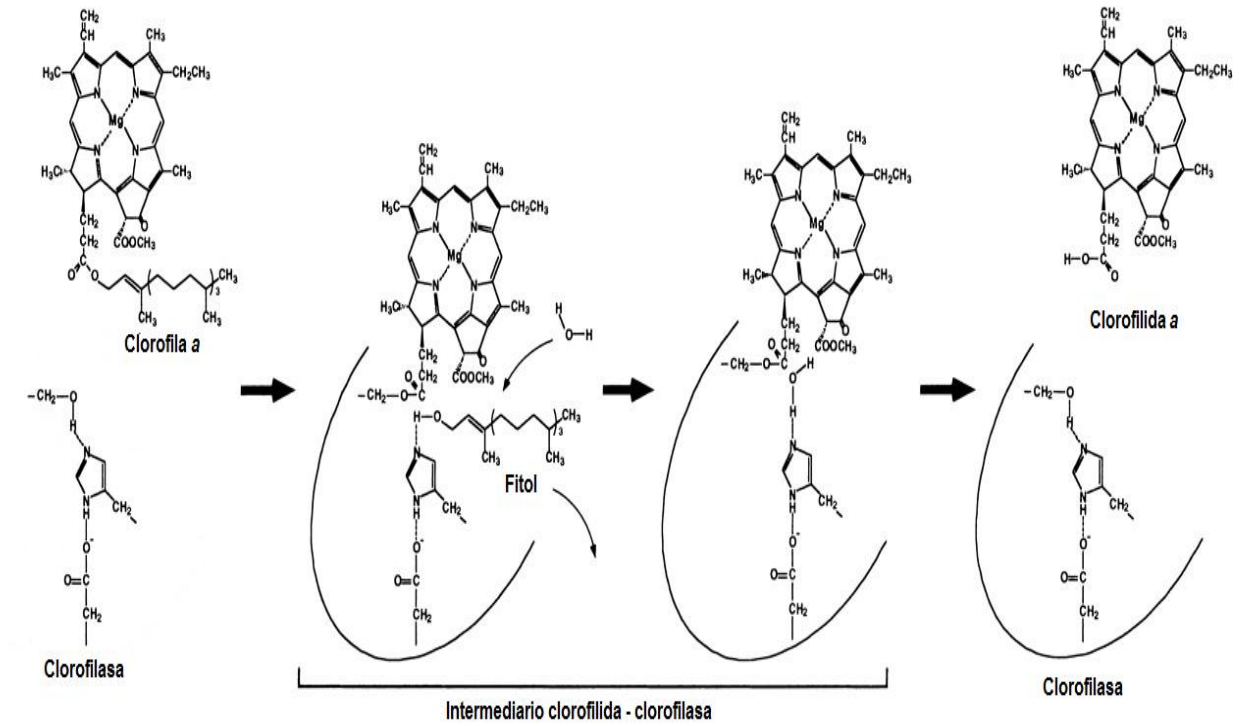


Figura 1.6. Esquema general de la hidrólisis de la clorofila ***a***.

La cadena o grupo fitol, es muy importante para la unión o anclaje de la clorofila con las proteínas y a su vez, estos complejos proteína-pigmento, pueden insertarse dentro de las membranas tilakoidales de los cloroplastos. La pérdida del fitol sienta las bases para continuar con la degradación tanto de la clorofilida como de las proteínas (Stoll, 1912; Matile, 1987; Scheer, 1991; Beale y Weinstein, 1991; Matile y col., 1996). La degradación (catabolismo) de la corofila es un proceso inverso al proceso de formación (anabolismo). La presencia de diferentes sustituyentes en sitios alrededor del perímetro del macrociclo, puede dar como resultado un efecto significativo en las propiedades espectrales, electrónicas y fotoquímicas. También todos estos cambios que sufre la molécula de clorofila debido al proceso de degradación generan efectos en sus propiedades.

1.5.1.1 Feofitinas

Como se mencionó anteriormente, las feofitinas son moléculas de clorofila que han perdido el magnesio central del macrociclo cuya pérdida es ocasionada generalmente por condiciones ácidas y dos H^+ reemplazan al Mg^{2+}, Figura 1.7. Estos compuestos son considerados como los primeros productos de degradación de las clorofilas; sin embargo, pequeñas cantidades de feofitinas son claramente componentes esenciales en complejos centro de reacción y, de cierta forma son hechas por específicas razones pero aun no se sabe con exactitud. Las feofitinas son algo más fáciles de reducir que las correspondientes clorofilas, por lo que podrían funcionar como un aceptor de electrones en algún momento de la secuencia de transporte de electrones, en donde, la clorofila no funcionaría.

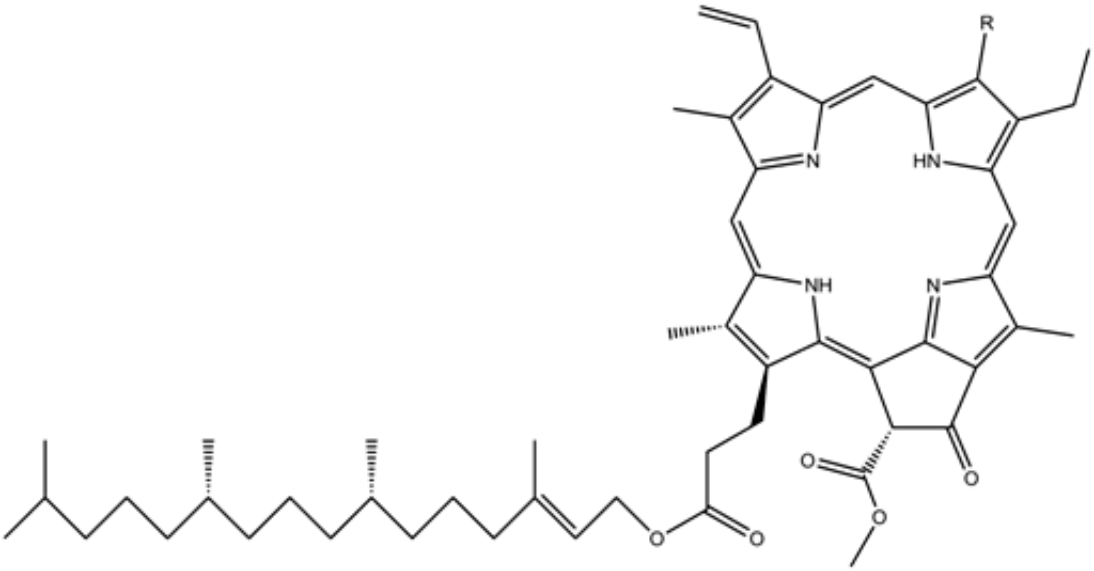


Figura 1.7. Estructura de la feofitina ***a***.

1.5.1.2 Feoforbidas

La feoforbida es un producto de degradación de la clorofila como ya se mencionó anteriormente y se utiliza como fotosensibilizador. La feoforbida se produce por la pérdida del magnesio central del macrociclo y del grupo fitol, Figura 1.8.

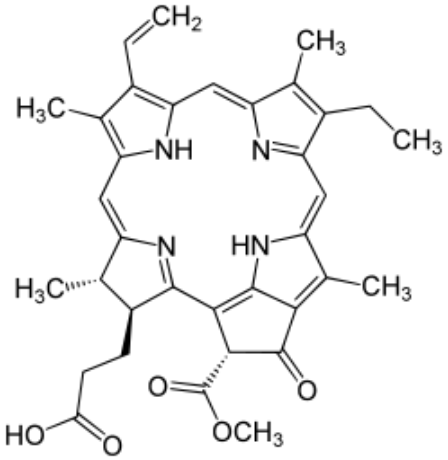


Figura 1.8. Estructura de la feoforbida ***a***.

1.5.1.3 Clorofilidas

Anteriormente se mencionó que las clorofilidas, Figura 1.9, se forman por acción enzimática o por hidrólisis de la clorofila ***a***. Estas moléculas son sustancias solubles en agua y a partir de ellas pueden obtenerse fácilmente las clorofilinas.

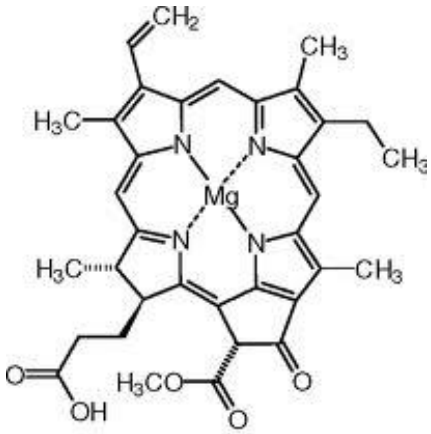


Figura 1.9. Estructura de la clorofilida ***a***.

1.5.1.4 Clorofilinas

Existen diferentes formas de convertir la clorofila a clorofilina, Figura 1.10, pero la más conocida y usual es la saponificación del extracto de pigmentos fotosintéticos y una posterior separación por cromatografía. El proceso consiste en colocar el extracto en una disolución etanólica o acuosa de hidróxido de sodio, NaOH, (la concentración dependerá de qué tanto quiera degradarse la molécula de la clorofila). La saponificación elimina los grupos estéricos metilo y fitol y puede abrir parcialmente el anillo isocíclico o ciclopentenilo y entonces se les denomina clorofilinas. Pero estas clorofilinas que contienen magnesio son los productos derivados de la clorofila más inestables por lo que se hace necesario estabilizarlas. Para este propósito, un metal más pesado debe reemplazar al magnesio central del macrociclo. Dicho reemplazo se lleva a cabo muy fácilmente. Para la preparación de clorofilinas de cobre, cobalto, hierro, nickel, zinc, manganeso u oro se requiere una disolución ácida. Por ejemplo, para preparar una clorofilina de cobre el intercambio entre el magnesio y éste se lleva a cabo adicionando una disolución caliente de sal

de cobre en exceso, seguida de una acidificación. La clorofilina de cobre se contamina con una larga cantidad de ácidos grasos los cuales se forman durante su preparación y éstos deben ser removidos lavando con un disolvente, en el cual los ácidos grasos sean solubles pero no la molécula de clorofilina. Después de filtrar el precipitado de la clorofilina (polvo negro-azul) se suspende en agua y el hidrógeno de los grupos carboxilo, es reemplazado por la adición de un metal alcalino para así formar la sal de la clorofilina de cobre.

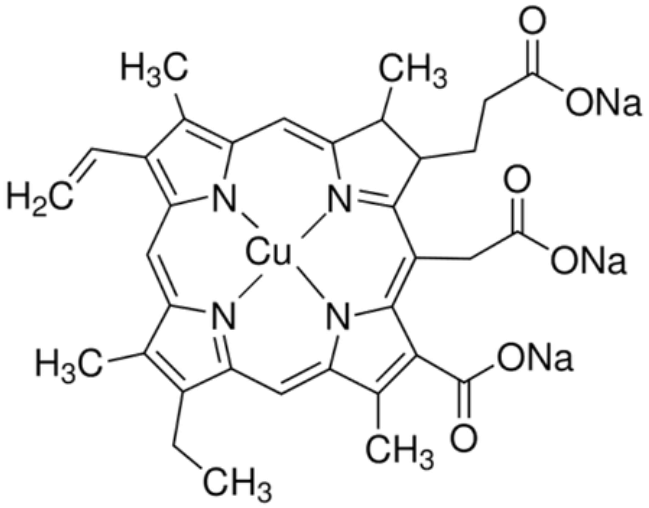


Figura 1.10. Clorofilina de cobre y sodio.

La clorofila y la clorofilina son consideradas sustancias anticarcinógenas y antimutagénicas. Además de combatir radicales libres, protegen contra ciertas toxinas celulares (nitrosaminas, aflatoxinas e hidrocarburos), inhiben el crecimiento celular tumoral (carcinogénesis) y pueden mejorar los efectos secundarios de algunos fármacos. La clorofila apoya los sistemas desintoxicativos corporales (desintoxicación hepática, intestinal, renal y transpiración), por lo que tanto este compuesto como la clorofilina, son eficaces para neutralizar el mal olor corporal ejerciendo una función desodorizante. Disminuyen de forma significativa el colesterol y los triglicéridos séricos y apoyan en la síntesis y renovación de los glóbulos rojos. Además, apoyan las funciones del sistema digestivo mejorando la absorción de nutrientes y minerales en el intestino, combatiendo el estreñimiento y facilita la función desintoxicativa intestinal (Smith, 2001).

Como se mencionó, la clorofila ***a*** es un pigmento fotosintético que desempeña un papel crucial en los procesos primarios de la fotosíntesis.

1.6 Fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso biológico en el cual la energía solar es capturada y almacenada por una serie de eventos que convierten la energía pura de la luz en energía química. Tan importante proceso provee casi toda la energía y todo el alimento necesarios para la vida. Literalmente, fotosíntesis significa “síntesis con luz”, sin embargo esta definición involucraría procesos que no se relacionan y que no deben incluirse. Una definición más adecuada es la siguiente: fotosíntesis es el proceso en el cual la energía luminosa es capturada y almacenada por un organismo, y esta energía almacenada es utilizada para llevar a cabo ciertos procesos celulares (Blankenship, 2002). Las plantas superiores son organismos fotosintéticos con los cuales se está más familiarizado, y derivan toda su energía celular de la luz. Sin embargo, hay muchos organismos que utilizan la luz como una fuente energética pero que, bajo ciertas condiciones, no pueden derivar su energía celular de la luz y en otras condiciones, sí lo hacen.

Como cualquier proceso bioquímico la fotosíntesis se puede representar por una ecuación global que en este caso resume una reacción de óxido-reducción en la que el agua cede electrones (en forma de hidrógeno) para la reducción del dióxido de carbono a glúcidos $(CH_2O)_n$ con liberación de oxígeno.

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow[luz]{} O_2 + (CH_2O)_n$$

La forma más común de fotosíntesis involucra pigmentos tipo clorofila y se lleva a cabo por transferencia de electrones la cual es inducida por la luz solar. El Sol, como todas las estrellas, produce un amplio espectro de luz, desde los rayos gama hasta las ondas de radio. Solo parte de esta luz solar emitida en el intervalo de longitudes de onda de 400 a 700 nm es visible a los ojos y se le conoce como “rango del visible”. Todo este intervalo y parte del infrarrojo cercano (700 a 1000 nm) son altamente activos en el proceso de la fotosíntesis en ciertos organismos. La región

espectral de 400 a 700 nm también se conoce como radiación fotosintéticamente activa, PAR (por sus siglas en inglés), aunque esto es sólo para los organismos que contienen clorofila ***a***.

1.6.1 ¿En donde se lleva a cabo la fotosíntesis?

En el caso de las plantas superiores la fotosíntesis se lleva a cabo en las hojas, en organismos subcelulares llamados cloroplastos ubicados en las células del parénquima, que es uno de los tejidos de la hoja, Figura 1.11. Las hojas además poseen pequeñas aberturas o estromas formados por células que pueden abrir o cerrar la abertura para regular la entrada o salida de agua y gases, como el O_2 y el CO_2. Los cloroplastos son organelos formados por una doble membrana externa y vesículas apiladas llamadas grana. Cada grana está formada por varios tilacoides (Blankenship, 2002). En la membrana de los tilacoides (membrana tilacoidal) se ubican los pigmentos fotosintéticos que pueden captar la energía luminosa y dar comienzo a la etapa fotodependiente. A estas unidades se les llama fotosistemas. Cada unidad tiene numerosas moléculas de pigmentos que se utilizan como antenas para atrapar la luz. Cuando la energía luminosa es absorbida por uno de los pigmentos, se lleva a cabo una transferencia de electrones que “rebotan” en el fotosistema, hasta llegar al centro de reacción.

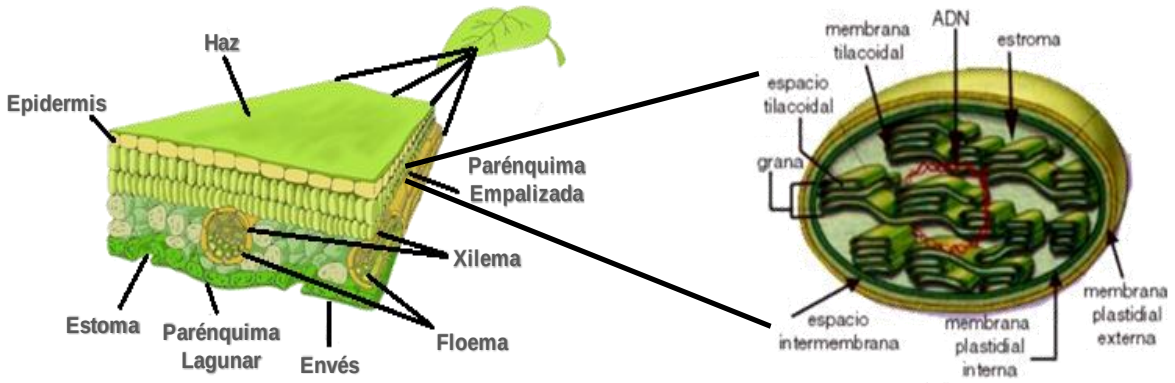


Figura 1.11. Esquema de composición de una hoja en las plantas superiores. Modificado de *recursos.cnice.mec.es*

1.6.2 Fases del almacenamiento de energía en la fotosíntesis

Para un mejor entendimiento del proceso de almacenamiento de energía en la fotosíntesis es conveniente dividirlo en cuatro fases, empezando por la absorción de un fotón y terminando con la exportación de productos de carbono estables de los cloroplastos. Las cuatro fases son: 1) absorción de la luz y suministro de energía por los sistemas “antena”, 2) transferencia de electrones primaria en los centros de reacción, 3) estabilización de energía por procesos secundarios y 4) síntesis y exportación de productos estables.

Los términos reacción a la luz y reacción en la oscuridad, han sido tradicionalmente usados para describir diferentes fases del almacenamiento de energía en la fotosíntesis. Las primeras tres fases forman parte de las reacciones a la luz y la cuarta fase abarca las reacciones en la oscuridad. A continuación se describen las fases de la fotosíntesis.

1.6.2.1 Antenas y procesos de transferencia de energía

Para que la energía luminosa pueda ser almacenada, primero debe de ser absorbida por uno de los pigmentos asociados con el aparato fotosintético. La absorción de un fotón genera un estado excitado que eventualmente conduce a una separación de carga en el centro de reacción. No todos los pigmentos llevan a cabo la fotoquímica; la mayoría funcionan sólo como antenas, capturando la luz y después entregan esta energía al centro de reacción donde la fotoquímica se lleva a cabo. El sistema de antena es similar a una antena satelital, capturando energía y concentrándola en un receptor donde la señal se convierte en una forma diferente.

El sistema de antena no realiza ninguna química; funciona por una transferencia de electrones que implica la migración de estados excitados de una molécula a otra. Esto es un proceso puramente físico que depende de un acoplamiento energético débil de los pigmentos. En la mayoría de los casos, los pigmentos están enlazados a proteínas.

Los sistemas de antena incorporan usualmente un mecanismo canalizador espacial y energético, en el que los pigmentos que están en la periferia del complejo,

absorben longitudes de onda más cortas y por lo tanto, energías más altas que los que se encuentran en el “núcleo”. Como se realiza una transferencia electrónica es de pensarse que los electrones se mueven de los pigmentos con más alta energía a los pigmentos de menor energía y al mismo tiempo hacia el centro de reacción. Estos sistemas incrementan grandemente la cantidad de energía que puede ser absorbida comparada con un solo pigmento.

1.6.2.2 Transferencia primaria de electrones en los centros de reacción

La transformación de la energía pura de los estados excitados en cambios químicos en la molécula se realiza en los centros de reacción, Figura 1.12. Un centro de reacción es un complejo de subunidades múltiples de proteínas incrustadas en la membrana fotosintética. Es un complejo proteína-pigmento, que incorpora clorofilas y otros cofactores de transferencia electrónica como las quinonas o centros de sulfuro de hierro, junto con péptidos altamente hidrofóbicos que entran y salen múltiples veces a través de la membrana.

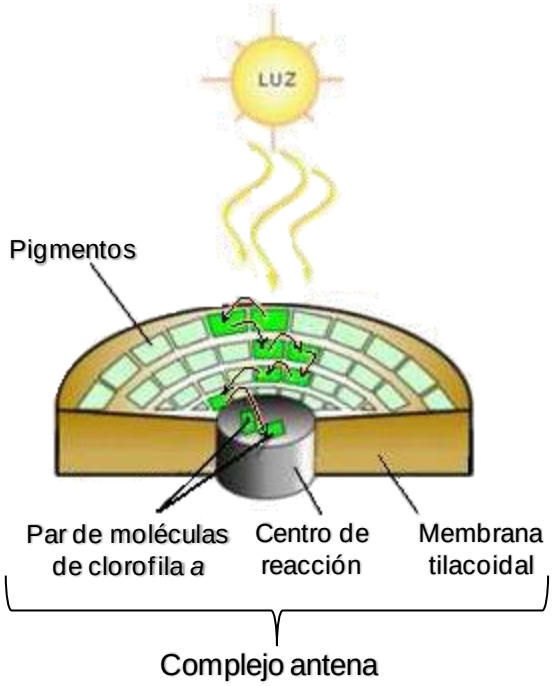


Figura 1.12. Estructura y funcionamiento de los pigmentos antena. Modificado de *recursos.cnice.mec.es*.

La transferencia de energía desde la antena al centro de reacción se realiza con una pérdida mínima en 10^{-10} s. En este proceso de transferencia es determinante el ordenamiento preciso en la membrana de los tilacoides, de los componentes de la antena y del centro de reacción (Blankenship, 2002).

El centro de reacción contiene un dímero especial de pigmentos que es el donador de electrones primario en la cascada de transferencia de electrones. Estos pigmentos son químicamente idénticos (o prácticamente idénticos) a las clorofilas las cuales son pigmentos-antena, pero su entorno en la proteína de centro de reacción, les confiere propiedades únicas. La etapa final del sistema de antena, es transferir la energía a este dímero creando una excitación electrónica en éste. El proceso básico que se lleva a cabo en todos los centros de reacción se describe esquemáticamente en la Figura 1.13 (Blankenship, 2002). Un pigmento tipo clorofila (P) es promovido a un estado electrónico excitado, ya sea por la absorción directa de un fotón o bien, por transferencia electrónica del sistema de antena. El estado excitado del pigmento es un reductor muy potente, éste cede un electrón rápidamente a la molécula aceptora de electrones más cercana (A), generando un estado iónico P^+A^-. Esta es la primera reacción de la fotosíntesis. La energía ha sido transformada de un estado de excitación electrónica a una energía redox. El sistema está ahora en una posición vulnerable respecto a la pérdida de la energía almacenada. Si el electrón simplemente se regresa a P^+ de A^-, el resultado neto es que la energía se transforma en calor y pérdida y el sistema no es capaz de realizar ningún trabajo. Esto puede suceder ya que las especies altamente oxidantes P^+ están físicamente posicionadas al lado de las especies altamente reductoras A^-. El sistema evita dicha recombinación y pérdida por una serie de reacciones secundarias inmediatas que compiten satisfactoriamente con dicha recombinación. Estas reacciones, que son más eficientes del lado del aceptor del par iónico, separan espacialmente las cargas positiva y negativa. El resultado final es que dentro de un tiempo muy corto (menos de un nanosegundo) las especies oxidadas y reducidas se separan por aproximadamente el espesor de la membrana biológica (~30 Å).

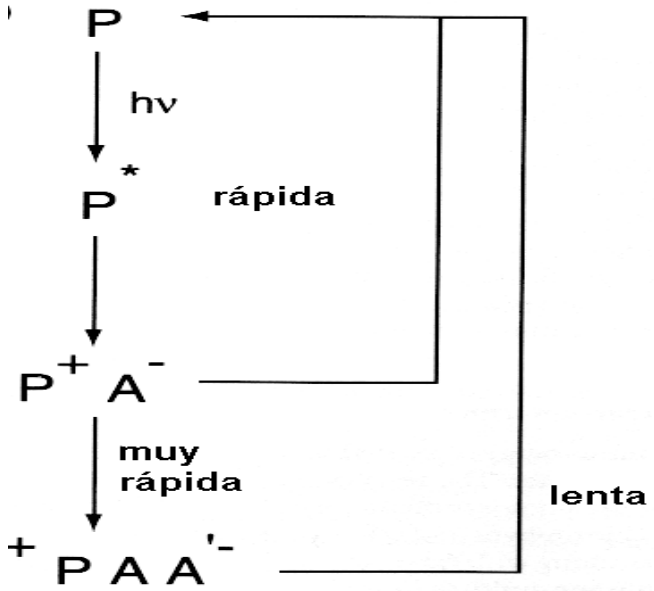


Figura 1.13. Esquema general de transferencia electrónica en los centros de reacción fotosintéticos.

1.6.2.3 Estabilización por reacciones secundarias

La esencia del almacenamiento de la energía fotosintética es la transferencia de un electrón del estado excitado del pigmento tipo clorofila a una molécula aceptora del complejo proteína-pigmento, llamado centro de reacción. Los organismos fotosintéticos oxigénicos más comunes tienen diferentes patrones de transferencia electrónica. Tienen dos centros de reacción fotoquímicos que funcionan juntos en una cadena de transferencia electrónica acíclica, como se muestra en la Figura 1.14. Los dos centros de reacción se conocen como fotosistemas I y II, (PSI = P700 y PSII = P680). El fotosistema II remueve los electrones del agua, oxidándola a oxígeno molecular, el cual es liberado como producto residual. Los electrones extraídos del agua se donan al fotosistema I y después, un segundo paso de transferencia electrónica se lleva a cabo, consiste en reducir el nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, NADPH, que es un aceptor de electrones intermediario. Los protones también se difunden a través de la membrana hacia el lumen, durante el proceso de transferencia de electrones acíclico, generando una diferencia de pH.

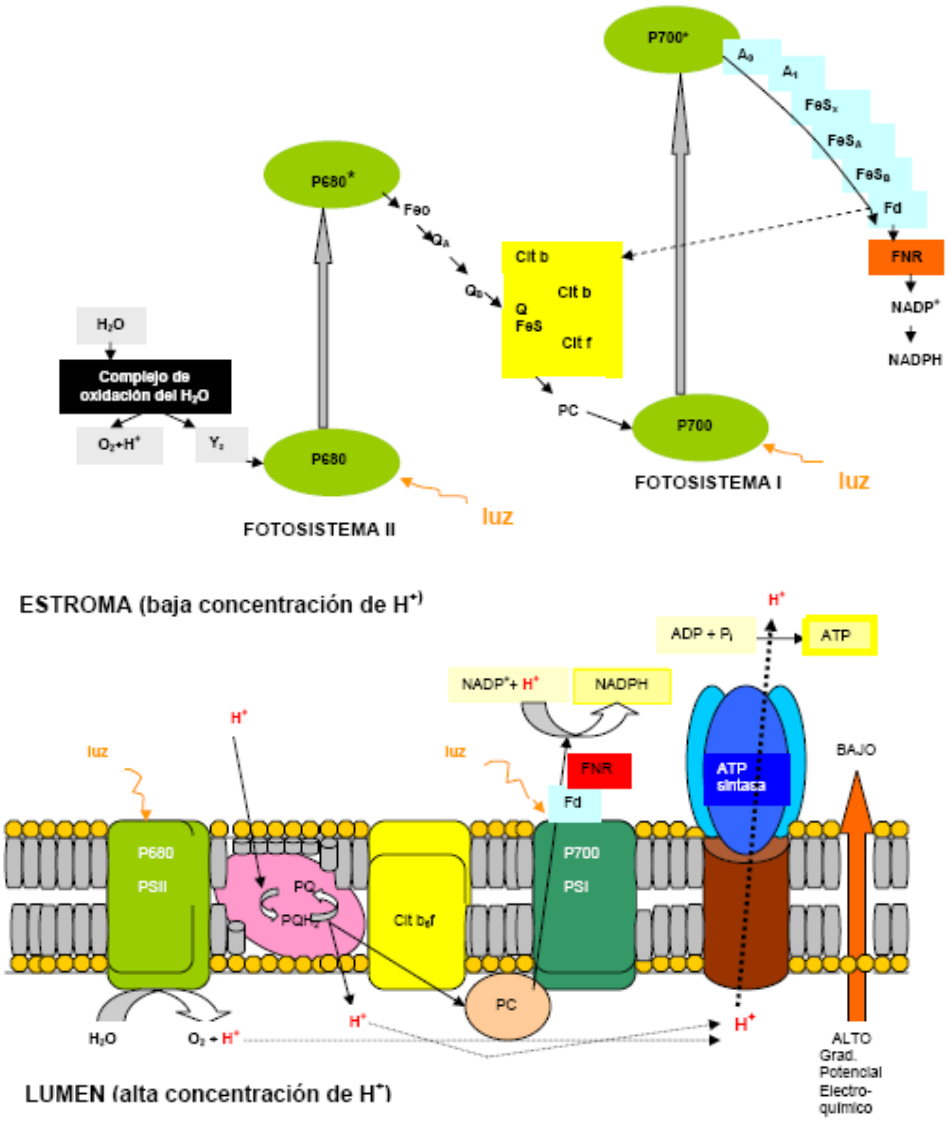


Figura 1.14. Diagrama esquemático del proceso de transferencia electrónica acíclico encontrado en los organismos aerobios. El diagrama de arriba, es un diagrama energético del proceso de transferencia electrónica. El diagrama de abajo muestra los complejos proteínicos y su arreglo en la membrana fotosintética.

1.6.2.4 Síntesis y exportación de productos estables

La fase final del almacenamiento de energía fotosintética implica la producción de moléculas energéticamente estables que se utilizan para llevar a cabo

una variedad de procesos celulares. Esta fase utiliza un compuesto intermediario reducido, NADPH, generado por el fotosistema I, junto con el ATP para reducir el CO_2 a azúcares. En los organismos fotosintéticos eucarióticos los azúcares fosforilados se exportan desde los cloroplastos. La asimilación del carbono y las reacciones de reducción son procesos catalizados por enzimas que se llevan a cabo en el estroma del cloroplasto.

Para poder llevar a cabo experimentos que se basen en el proceso de la fotosíntesis, se ha establecido que es necesario tener una organización adecuada de las moléculas de clorofila. Esto puede ser el adsorber las moléculas de clorofila en un material "anfitrión" debidamente seleccionado. Las clorofilas naturales han usado poco en la fotosíntesis artificial debido a su inestabilidad como pigmento y/o como molécula. Sin embargo se han hecho diferentes intentos para estabilizarla usando un soporte inorgánico. Intentar inmovilizar a la clorofila ***a*** en zeolitas no es posible debido a que el tamaño de poro de estos materiales los hace inaccesibles puesto que son más pequeños que el tamaño dinámico de la clorofila ***a***. Aunque se ha reportado que se ha logrado estabilizar la clorofila ***a*** en arcillas catiónicas (Ishi y col., 1995; Itoh y col., 1998) no se especifica si ésta fue intercalada entre las láminas o simplemente adsorbida en la superficie externa. Se ha observado que el ion metálico central (Mg^{2+}) en las clorofilas adsorbidas en los sitios ácidos de la superficie de una sílice amorfa es inestable y se pierde, resultando una feofitinización de la clorofila ***a*** (Watanabe y col., 1984). Las arcillas aniónicas, hidrotalcitas o hidróxidos de doble lámina, por su estructura y propiedades, pueden resultar un buen candidato para favorecer tanto la estabilización como la correcta organización y dispersión de las moléculas de clorofila ***a***.

1.7 Las arcillas

En general, una arcilla se define como una roca finamente dividida, constituida esencialmente por minerales arcillosos cristalinos, pudiendo contener también minerales que no son considerados como arcillosos (calcita, dolomita, cuarzo y otros), materia orgánica y otras impurezas (Souza, 1975).

Químicamente los minerales arcillosos son materiales de aluminio/magnesio hidratados (aunque también pueden contener otros elementos como hierro, potasio, calcio, sodio y otros) de estructura cristalina laminar o fibrosa. Tienen propiedades fisicoquímicas muy diversas como una gran capacidad de adsorción; pueden alojar moléculas en el interior de su espacio interlaminar, presentan tamaños de poro seis veces más grandes que las zeolitas convencionales y una gran capacidad de intercambio iónico, entre otras propiedades (Souza y Vieira, 1988). Se clasifican de acuerdo a su afinidad por los cationes o bien por los aniones en: **arcillas catiónicas**, abundantes en la naturaleza, que poseen en su estructura laminar una deficiencia de carga positiva generada por la sustitución isomórfica de iones metálicos de menor valencia y compensada por la presencia de cationes en el espacio interlaminar; y **arcillas aniónicas,** que son poco frecuentes en la naturaleza, al contrario de las anteriores, y que poseen un exceso de carga positiva, generada ahora por la sustitución en la red de iones metálicos de mayor valencia y compensada por aniones.

Las arcillas tienen diferentes campos de aplicación y en la actualidad el uso de las arcillas en numerosos productos se ha ido incrementando, por ejemplo, en los nuevos materiales poliméricos para lograr superficies suaves al tacto y propiedades mecánicas mejoradas, en los juguetes, en las partes de automóvil y en otros componentes que son, además, resistentes a la flama y al desgaste. Los catalizadores empleados en la refinación del petróleo, los productos de la industria farmacéutica y los productos de belleza, incorporan arcillas en alta proporción.

1.7.1 Arcillas aniónicas

Las arcillas aniónicas tienen un comportamiento básico definido principalmente por su estructura química. Estos materiales han recibido diferentes nombres genéricos como “hidróxidos de doble lámina” (HDL) o simplemente “hidrotalcitas” (HTs). La hidrotalcita mineral formada por una mezcla hidroxicarbonada de aluminio y magnesio, descubierta en Suecia en 1842, es considerada como el prototipo de estos materiales. Su fórmula química: $\mathbf{Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O}$, fue sugerida por primera vez por Manasse quien también

fuera el primero en proponer que los iones carbonato son una parte esencial del mineral (Cavani y col, 1991).

1.7.1.1 Composición y estructura

Las HTs pueden describirse con la fórmula química:

$$[(M^{II})_{1-x}(M^{III})_x(OH)_2]^{x+}[(A^{m-})_{x/m}n\cdot H_2O$$

donde:

M^{II} y M^{III}: metales di y trivalentes, respectivamente

A^{m-}: anión de carga m

x: relación metálica molar entre M^{II} y M^{III} y tiene valores entre 0.20 y 0.33

$$x = M^{II}/(M^{II} + M^{III})$$

n: número de moléculas de agua

La estructura de las hidrotalcitas puede describirse basándose en la estructura de la brucita ($Mg(OH)_2$), que está constituida por unidades octaédricas con átomos centrales de Mg^{2+} coordinados hexaédricamente con los grupos OH situados en los vértices de los octaedros. Las láminas infinitas bi-dimensionales se conforman entonces por la unión de los octaedros de forma tal que cada grupo OH comparte su vértice con tres unidades octaédricas formando así una capa infinita, Fig. 1.15.

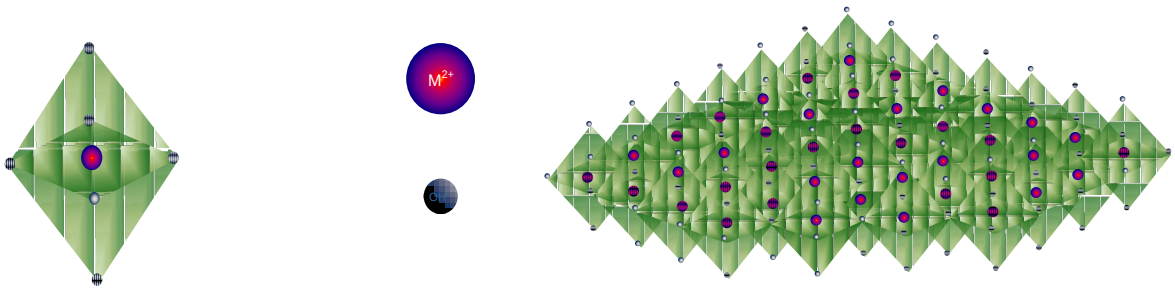


Figura 1.15. Representación de una lámina de brucita.

Cuando un ion Mg^{2+} es sustituido isomórficamente por un ion trivalente con un radio iónico similar, por ejemplo Al^{3+}, se genera una carga positiva en la capa octaédrica, misma que se compensa con aniones CO_3^{2-}, los cuales son muy afines a estos compuestos y se depositan entre dos capas de brucita modificada, Fig. 1.16 (Cavani y col., 1991). El espacio interlaminar que se genera por la presencia de los aniones está además ocupado por moléculas de agua.

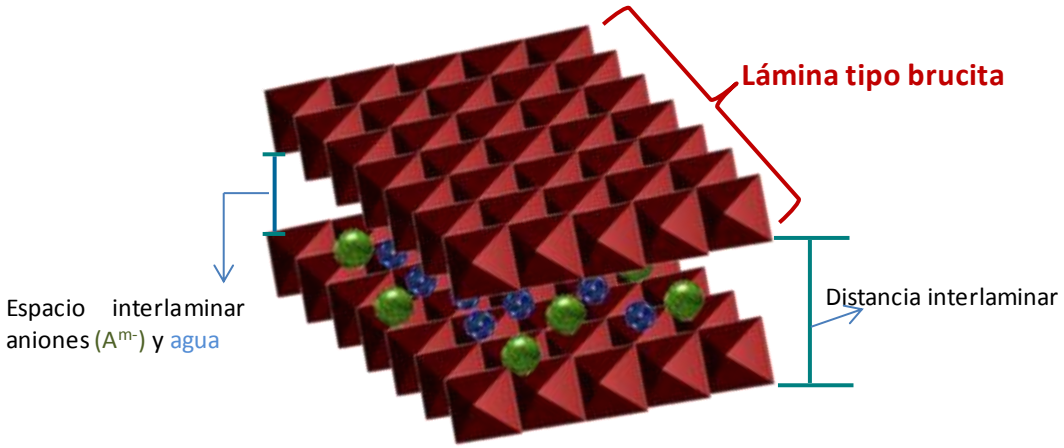


Figura 1.16. Estructura de una hidrotalcita.

Su estructura cristalina depende de la composición y del procedimiento de preparación. En la brucita, la distancia de los grupos OH-OH es de 2.8 Å y el espacio entre las láminas es de 2.1 Å (Belloto y col., 1996). Por difracción de rayos X se determina la simetría de la hidrotalcita, siendo la romboédrica la más común en estos compuestos. En la Tabla 1.2 se presentan algunas hidrotalcitas naturales (Trifiro y Vacari, 1996).

Tabla 1.2. Nombre, fórmula química, parámetros de red y simetría de algunas hidrotalcitas naturales.

Nombre	Fórmula química	Parámetro de celda unitaria a (Å)	Parámetro de celda unitaria c (Å)	Simetría
Hidrotalcita	$Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3{\cdot}4H_2O$	3.054	22.81	Romboédrica
Manacita	$Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3{\cdot}4H_2O$	3.100	15.60	Hexagonal
Piroaurita	$Mg_6Fe_2(OH)_{16}CO_3{\cdot}4H_2O$	3.109	23.41	Romboédrica
Siogrenita	$Mg_6Fe_2(OH)_{16}CO_3{\cdot}4.5H_2O$	3.113	15.61	Hexagonal
Tacovita	$Ni_6Al_2(OH)_{16}CO_3{\cdot}4H_2O$	3.325	22.59	Romboédrica
Meixnerita	$Mg_6Al_2(OH)_{16}(OH)_2{\cdot}4H_2O$	3.046	22.92	Romboédrica

1.7.1.2 Naturaleza del catión

Pueden formar hidrotalcitas los iones M^{II} y M^{III}, al acomodarse en los huecos de la configuración de los grupos OH en las láminas metálicas formando una capa octaédrica. Todos los iones trivalentes, exceptuando al V^{3+} y al Ti^{3+} (inestables en el aire), con radio iónico entre 0.5 y 0.8 Å forman hidrotalcitas. El Cu^{2+} forma hidrotalcitas sólo cuando está presente con otro catión divalente. En la Tabla 1.3 se indican los iones capaces de formarlas y sus correspondientes radios iónicos.

Tabla 1.3. Iones que forman HTs y sus radios iónicos.

M^{II}	Radio Iónico (Å)	M^{III}	Radio Iónico (Å)
Mg	0.65	**Al**	0.5
Cu	0.69	**Ga**	0.62
Ni	0.72	**Ni**	0.62
Co	0.74	**Co**	0.63
Zn	0.74	**Fe**	0.64
Fe	0.76	**Mn**	0.66
Mn	0.80	**Cr**	0.69

1.7.1.3 Naturaleza del anión

Podría decirse que no existe ninguna restricción para los aniones que pueden compensar el exceso de carga positiva que se genera al cambiar el catión divalente por un trivalente en las láminas; el único inconveniente para la preparación de hidrotalcitas puras sin carbonatos, es que son muy afines a este ion y en el momento de la preparación es difícil evitar la contaminación con el mismo, por ello para la preparación se debe usar agua desmineralizada y descarbonizada. Algunos de los aniones que pueden estar presentes en las hidrotalcitas son: F^-, Cl^-, Br^-, I^-, ClO_4^-, NO_3^-, ClO_3^-, IO_3^-, OH^-, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, $S_2O_3^{2-}$, WO_4^{2-}, CrO_4^{2-}, $Fe(CN)_6^{3-}$, $Fe(CN)_6^{4-}$, $SiO(OH)_3^-$, ADN, porfirinas, pigmentos naturales, etc. (Evans y Slade, 2006).

El número, el tamaño, la orientación y la fuerza de los enlaces entre los aniones y los grupos hidroxilos de las capas determinan la distancia interlaminar **d** trátese de aniones inorgánicos u orgánicos. El espacio interlaminar es igual a la diferencia entre el valor de **d** menos 4.8 Å que corresponde al espesor de la capa. En la Tabla 1.4 se comparan algunos valores de **d** obtenidos por la intercalación de ciertos aniones.

Tabla 1.4 Distancia interlaminar **d** (Å) en HTs intercaladas con diferentes aniones (Evans y Slade, 2006).

anión	**OH^-**	**$(CO_3)^{2-}$**	**F^-**	**Cl^-**	**Br^-**	**I^-**
d (Å)	7.55	7.65	7.66	7.86	7.96	8.16
anión	**$(SO_4)^{2-}$**	**$(ClO_4)^-$**	**Oxalato**	**Malonato**	**Succinato**	**$(NO_3)^-$**
d (Å)	8.58	9.20	9.40	10.4	12.0	8.79

1.7.2 Estabilidad de las hidrotalcitas

De manera general se ha encontrado mayor estabilidad para las hidrotalcitas con aniones divalentes, por lo cual si se requiere realizar un intercambio iónico en la estructura de los compuestos tipo hidrotalcita, se recomienda utilizar como precursores a aniones monovalentes como el NO_3^- para facilitar el intercambio ya que las HTs más estables son aquellas que tienen como anión interlaminar al ión carbonato. Se han realizado estudios acerca de las propiedades de retención aniónica de los compuestos tipo hidrotalcita y se ha comprobado que existe una fuerte dependencia entre la distancia interlaminar, el tamaño y la carga de los aniones intercalados. Los compuestos tipo hidrotalcita intercambian aniones selectivamente en el siguiente orden (Trifiro y Vaccari, 1996):

$$CO_3^{2-} > SO_4^{2-} > Cl^- > ClO_4^- > NO_3^- > CH_3COO^-$$

1.7.3 Estabilidad térmica de las hidrotalcitas

Se obtienen óxidos de la descomposición térmica de las hidrotalcitas. Estos óxidos presentan propiedades catalíticas (Gastuche y col., 1967). Con una rehidratación e incorporación de aniones a la estructura se recupera la estructura laminar original, este proceso es conocido como efecto memoria.

Los estados de transformación de las HTs (Mascolo y Marino, 1980) al someterse a calentamiento son los siguientes:

1. Se pierden moléculas de agua intersticiales cuando se calienta a 200 °C, quedando retenidos en la estructura los hidróxidos y el carbonato interlaminar.
2. En la calcinación de 275 a 450 °C se da una pérdida simultánea de los grupos hidroxilos en forma de agua y del ion carbonato como dióxido de carbono.
3. Si la temperatura no excede a los 600 °C, la estructura original del compuesto tipo hidrotalcita se puede regenerar por simple contacto con una disolución adecuada.
4. A temperaturas superiores a 600 °C se forman óxidos estables que ya no presentan la propiedad de reversibilidad estructural, por ejemplo óxidos de magnesio, de aluminio y de aluminato de magnesio ($MgAl_2O_4$). Los productos finales de las HTs, sean en atmósfera inerte o en aire, son mezclas de óxidos amorfos y algunos óxidos con estructura tipo espinela.

1.7.4 Procedimientos de preparación de hidrotalcitas

Existen diferentes métodos de preparación o síntesis de hidrotalcitas los cuales pueden clasificarse en: métodos de coprecipitación y de intercambio, método sol-gel, método de reconstrucción y método por microondas.

1.7.4.1 Métodos convencionales de coprecipitación

El método convencional de coprecipitación consiste, en forma general, en añadir un agente precipitante a disoluciones acuosas de los componentes deseados.

a) Coprecipitación a pH constante. Este método es el más utilizado en la preparación de HTs. Se disuelven las sales que proporcionarán los cationes a la hidrotalcita y por otro lado se disuelve el agente precipitante (preferentemente Na_2CO_3 o NaOH) ambos en agua. Posteriormente, el hidrotratamiento se efectúa de manera convencional, calentando ambas disoluciones (temperatura 60-80°C), las cuales se adicionan al mismo tiempo en un tercer recipiente controlando la adición, el pH de 7 a 13, y manteniendo una agitación constante. El precipitado se lava con agua y se recupera por decantación para posteriormente secarse a una temperatura no mayor de 120°C.

b) Coprecipitación a pH variable o coprecipitación a alta saturación. Las HTs que se obtienen con este método de coprecipitación son menos cristalinas que las obtenidas a pH constante. Este método difiere del anterior en que la disolución de las sales que contienen a los cationes se adiciona rápidamente a la disolución que contiene el agente precipitante, bajo una agitación vigorosa. El precipitado obtenido se lava, se filtra y se seca a una temperatura menor de 120°C.

1.7.4.2 Método sol-gel

Consiste básicamente en la formación de redes o cadenas de átomos que se forman por la dispersión de alcóxidos metálicos que contengan Al^{3+} y Mg^{2+} en un líquido, para formar una fase en la cual se tendrá un líquido disperso en un sólido. Este material se somete a un tratamiento térmico, obteniendo compuestos cristalinos con mayores áreas específicas que los que se pueden obtener por el método convencional de coprecipitación (Paredes y col., 2006).

1.7.4.3 Método de intercambio

Si se desean obtener hidrotalcitas que contengan aniones diferentes al carbonato, este método es el ideal. Algunos autores les llaman hidrotalcitas pilareadas o intercaladas. La selectividad de los aniones divalentes es mayor que la de los aniones monovalentes. Los iones pueden ser inorgánicos u orgánicos (Evans y Slade, 2006).

El pilareo de arcillas aniónicas se puede llevar a cabo por tres tipos de preparación:

I. Coprecipitación directa o simultánea
II. Intercambio directo
III. Intercambio por regeneración de compuestos calcinados

1.7.4.4 Método de regeneración

La calcinación de las hidrotalcitas a temperaturas de 400 °C a 600 °C originan óxidos mixtos, los cuales tienen la capacidad de reconstruir la estructura inicial laminar (efecto memoria) cuando se ponen en contacto con disoluciones acuosas que contengan al anión inicial (región interlaminar) u otro diferente (Rivera y col., 2007).

1.7.4.5 Método por microondas

La coprecipitación se efectúa a pH constante (etapa de precipitación) y el hidrotratamiento se efectúa por irradiación de microondas, obteniendo compuestos cuyo tamaño de cristal controlarse. Además se reduce considerablemente el tiempo de síntesis (Rivera y col., 2006).

1.7.5 Usos y aplicaciones de las hidrotalcitas

Los estudios de estos minerales y sus aplicaciones son muy recientes, la primera aplicación de estos compuestos fue descrita en 1971, al patentarse como catalizadores para procesos de hidrogenación (Bröker y Kainer, 1971). En la década de los ochenta encuentran su uso en las áreas industrial, médica (Li y Duan, 2006; Bégu y col., 2009), catalítica (Sels y col., 2001; Tichit y col., 2003; Abelló y col., 2005; Sommer y col., 2006) y como adsorbentes.

Actualmente se ha pensado en nuevas y numerosas aplicaciones debido a las propiedades que presentan, por ejemplo, en la sorción de compuestos radiactivos (Paredes y col., 2006) o bien, como agentes transportadores y liberadores de sustancias (Li y Duan, 2006).

La retención de pigmentos naturales en óxidos para utilizarlos en la industria alimenticia ha sido el origen de trabajos recientes. Lima y col., 2009 probaron la retención del color de la buganvilea en alúmina, zeolita X y óxidos de Mg y Al. En trabajos previos se ha logrado retener el ácido carmínico en sílice (Ibarra y col., 2005), se logró intercalar el naranja de metilo en hidrotalcitas de Mg/Al y Ni/Al (Mandal y col., 2009). Existe, sin embargo, un antecedente histórico que se remonta

al tiempo de los mayas y es la retención del índigo en los poros de la paligorsquita (Chiari y col., 2008).

Las arcillas aniónicas pueden presentar un sin fin de ventajas para su empleo en la agronomía (Choy y col., 2007), como liberadores de nutrientes para plantas (Sommer y col., 2009, Sommer y col., 2010) o bien, en la retención de sustancias de interés para el hombre y el ambiente, como lo son los pigmentos de las plantas superiores en especial, las clorofilas y sus derivados.

CAPÍTULO 2

DESARROLLO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 2. EXPERIMENTAL

Como ya se mencionó, las hidrotalcitas pueden ofrecer muchas ventajas en la inmovilización de clorofila ***a*** y en compuestos derivados de ella como la clorofilina de cobre (CC) por ejemplo, ofreciendo estabilidad de las moléculas de clorofila y/o clorofilina, teniendo una fuerte interacción entre las láminas que conforman a los soportes y las moléculas adsorbidas, una buena dispersión de las moléculas orgánicas en las matrices inorgánicas, etc.

En este trabajo se reporta por primera vez, la retención de clorofilina de cobre y/o de clorofila ***a***, en hidrotalcitas. Las muestras se obtuvieron por diferentes métodos, los cuales se describen a continuación.

2.1 Síntesis de las hidrotalcitas

La síntesis de las hidrotalcitas iniciales, de diferente composición M^{II}/Al (M^{II} = Mg, Ni o Zn) y de diferente relación metálica molar M^{II}/Al = X (X = 2, 3 o 4), se prepararon por coprecipitación (Cavani y col., 1991). Una disolución de nitratos de un par elegido de los metales Mg, Ni o Zn (Aldrich 99 %) se preparó con una relación molar M^{II}/Al = X. Esta disolución se agregó gota a gota en 50 mL de agua destilada en un reactor bajo agitación vigorosa, a pH constante obtenido por la adición controlada de una disolución 2 M de NaOH (Becker 99 %). El tratamiento hidrotérmico o cristalización del gel obtenido por la coprecipitación se efectuó de dos maneras: **1)** irradiación de microondas en un autoclave (MIC-I, Sistemas y Equipos de Vidrio S.A. de C.V.) 10 minutos a 80 ºC, operando a 2.45 GHz y a una potencia de 200 W y **2)** método convencional, es decir en un matraz de bola conectado a un recirculador y calentado en un baño de aceite a 80 °C por 24 h. Después del tratamiento hidrotérmico, los sólidos fueron recuperados por decantación y lavados varias veces (0.6 L/g de HT). Finalmente se secaron a 70 °C 24 h. Las claves de las muestras según el tratamiento hidrotérmico son: M^{II}/Al(X)-MW para las tratadas con microondas y M^{II}/Al(X) para las tratadas convencionalmente.

Tabla 2.1. Condiciones de síntesis de las HTs.

Clave	Composición	X=M^{II}/Al	pH de síntesis	Condiciones de tratamiento hidrotérmico				
				Microondas			Convencional	
				T (°C)	t (min)	Potencia (W)	T (°C)	t (h)
Mg/Al(2)-MW	Mg/Al	2	11	80	10	200		
Mg/Al(3)-MW		3						
Mg/Al(4)-MW		4						
Ni/Al(2)-MW	Ni/Al	2						
Ni/Al(3)-MW		3						
Ni/Al(4)-MW		4						
Zn/Al(2)-MW	Zn/Al	2						
Zn/Al(3)-MW		3						
Zn/Al(3)-MW		4						
Mg/Al(3)	Mg/Al	3	10				80	24
Ni/Al(3)	Ni/Al		8					
Zn/Al(3)	Zn/Al		8					

2.2 Síntesis de los híbridos clorofilina-hidrotalcita

2.2.1 Síntesis por efecto memoria

La hidrotalcita de composición Mg/Al = 3 (Mg/Al(3)-MW) sintetizada por microondas, se calcinó a 500 °C durante 4.5 h. Un gramo de los óxidos resultantes se dispersó en agua destilada bajo agitación vigorosa. Después se adicionaron 19.25 mL de NaOH (2 M). A la mezcla anterior se le adicionaron 3.65 mL de clorofilina (Natural Health) y se dejó la mezcla en agitación 10 minutos. La mezcla fue tratada hidrotérmicamente a 80 °C 12 h (método convencional) en un matraz de bola conectado a un recirculador y calentado con una manta de calentamiento. Los sólidos se recuperaron por decantación y se lavaron varias veces (0.6 L/g de HT) para eliminar impurezas. Como paso final, la muestra se secó a 70 °C durante 24 h, muestra R-

OHCV. Una segunda muestra se preparó bajo las mismas condiciones pero sin adicionar NaOH, muestra R-CV.

Se preparó otra serie de muestras en presencia de irradiación con microondas (después de haber sido adicionada la clorofilina) en la etapa de cristalización durante 10 min a una potencia de 200 W y 80°C. Se obtuvieron la muestra R-OHMW que corresponde a la muestra R-OHCV y la muestra R-MW que corresponde a la muestra R-CV.

2.2.2 Síntesis por coprecipitación simultánea

Se prepararon tres muestras, una por tratamiento hidrotérmico convencional y las otras dos en presencia de irradiación con microondas. La primera muestra se sintetizó de la siguiente manera: Disoluciones acuosas de nitratos de magnesio y aluminio (2.5 M) y de hidróxido de sodio (2 M) se adicionaron gota a gota a otra disolución acuosa de clorofilina inicialmente depositada en el reactor (coprecipitación realizada a pH constante). El gel se trató hidrotérmicamente a 80 °C durante 12 h en un reactor convencional. Los sólidos se recuperaron por decantación y fueron lavados varias veces (0.6 L/g de HT), para finalmente secarlos a 70 °C 24 h, muestra B-OHCV.

Una segunda muestra se sintetizó como la muestra anterior pero el proceso de cristalización (después de la adición de la clorofilina) se llevó a cabo en presencia de irradiación con microondas, en las mismas condiciones que las muestras anteriores tratadas con microondas, muestra B-OHMW.

Finalmente, la tercera muestra se sintetizó adicionando, gota a gota, los precursores de la hidrotalcita y la clorofilina simultáneamente y se coprecipitó a pH constante. Posteriormente el gel obtenido fue sometido a irradiación con microondas en las mismas condiciones, muestra S-OHMW. En la Tabla 2.2 se presenta un resumen de las condiciones de síntesis de las muestras anteriores.

Tabla 2.2. Condiciones de síntesis de las muestras con clorofilina de cobre.

Método de síntesis	Tratamiento hidrotérmico	Agente precipitante	Muestra
Efecto memoria	Convencional	NaOH	**R-OHCV**
		-	**R-CV**
	Microondas	NaOH	**R-OHMW**
		-	**R-MW**
Coprecipitación simultánea	Convencional	NaOH	**B-OHCV**
	Microondas	NaOH	**B-OHMW (precursores de HTs adicionados gota a gota sobre una disolución de clorofilina)**
			S-OHMW (disolución de clorofilina y precursores de HTs mezclados)

2.3 Síntesis de híbridos clorofila *a*-hidrotalcita

2.3.1 Obtención de clorofila *a* pura a partir de pigmentos fotosintéticos

2.3.1.1 Extracción de los pigmentos

Los pigmentos fotosintéticos se extrajeron de hojas frescas de espinaca o de achicoria usando dos procedimientos diferentes.

A) Se lavaron las hojas con agua destilada para remover la tierra o suciedad que pudieran presentar, se secaron, se quitaron los nervios de las hojas, éstas se pesaron y se trituraron en una licuadora con igual cantidad de $MgSO_4$ anhidro (Sigma Aldrich 99.9 %) hasta obtener un polvo verde. Posteriormente se adicionó acetona al 99.9 % (Sigma Aldrich) y se centrifugó a 3000 RPM 20 minutos repitiendo este procedimiento hasta que las hojas perdieran su color (se emplearon 20 mL, aproximadamente, por gramo de hojas pesadas). El sobrenadante (extracto) se recuperó cuidando de no mezclarlo con el precipitado formado en el fondo de los vasos, y se almacenó a 4 °C en recipientes de plástico protegidos contra la luz. Todo el procedimiento se llevó a cabo bajo luz tenue.

B) Las hojas se congelaron con nitrógeno líquido e inmediatamente después se trituraron en una licuadora industrial especial para bajas temperaturas. Las hojas trituradas se colocaron en etanol frío (Aldrich 95 %) en un baño ultrasónico por 15 minutos para extraer los pigmentos. El sobrenadante fue centrifugado y almacenado a 4 °C en recipientes protegidos contra la luz. Todos estos pasos y los que siguen a continuación, se realizaron bajo luz tenue. Se llevó a cabo una rotavaporación del etanol y los pigmentos fueron después redisueltos en acetona (99.9 %), puesto que la acetona provee un mejor medio para inhibir la degradación de la clorofila ***a***.

2.3.1.2 Separación de los pigmentos por cromatografía en capa fina

Para realizar el análisis de la muestra por cromatografía en capa fina se utilizó como adsorbente (fase estacionaria) sílica gel en placas de plástico. La muestra se aplicó en disolución con un capilar de vidrio sobre la placa. Se colocó un pedazo de papel filtro en un tanque o cámara de elución, se tapó y se esperó a que se saturara con el vapor de la fase móvil la cual fue una mezcla de disolventes: 60 % hexano (Carlo Erba 99.8 %), 16 % éter de petróleo (Carlo Erba 50-60°), 10 % acetato de etilo (Aldrich 99.5 %), 10 % acetona (Aldrich 99.5 %) y 4 % metanol (Aldrich 99.5 %). A continuación se introdujo la placa en el tanque de manera que la placa quedara apoyada sobre el fondo y el punto con la muestra sobre el nivel del líquido y cuando la fase móvil alcanzó ¾ partes de la placa ésta se sacó de la cámara, Figura 2.1.

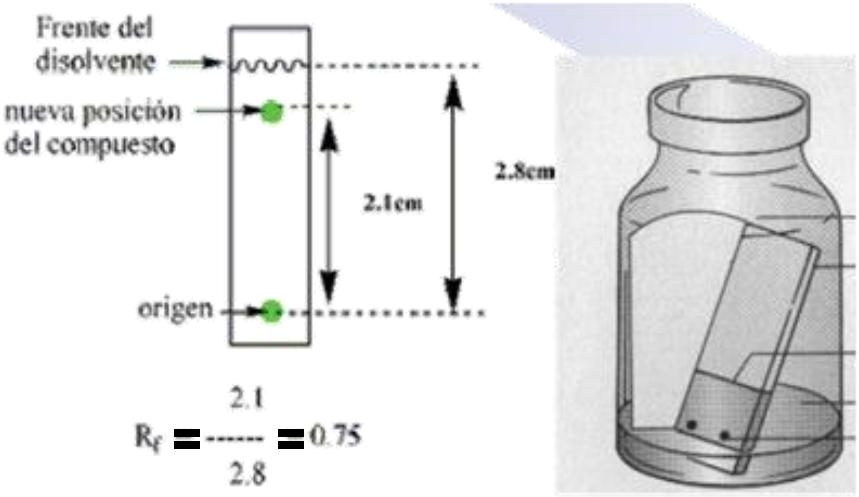


Figura 2.1. Procedimiento de separación de los pigmentos fotosintéticos por CCF.

2.3.1.3 Separación de los pigmentos por cromatografía en columna

Se realizó una separación por columna para obtener clorofila ***a*** pura en mayor cantidad, libre de chlorofila *b*, polienos y xantofilas. La columna se preparó con silica gel 60 (Fluka grado alta pureza) como fase estacionaria y una mezcla de disolventes como eluente: 60 % hexano (Carlo Erba 99.8 %), 16 % éter de petróleo (Carlo Erba 50-60°), 10 % acetato de etilo (Aldrich 99.5%), 10% acetona (Aldrich 99.5 %) y 4 % metanol (Aldrich 99.5 %).

Antes de introducir los pigmentos a la columna para proceder a la separación y obtención de clorofila ***a***, éstos se trataron de la siguiente manera: se tomaron 15 mL del extracto en acetona, se agregaron 15 mL de n-hexano y 15 mL de agua destilada, se agitó la mezcla y se dejó reposar hasta que se formaron dos capas. La capa de abajo fue desechada y la capa de arriba se volvió a tratar adicionando 15 mL más de agua destilada y se agitó otra vez. Una vez formadas las dos capas, nuevamente la capa de abajo se desechó y la capa de arriba se introdujo a la columna para llevar a cabo la separación, Figura 2.2. Este procedimiento previo, es necesario para llevar a cabo una primera separación entre las clorofilas ***a*** y ***b*** y algunos carotenos permitiendo, una mejor purificación de la clorofila ***a***.

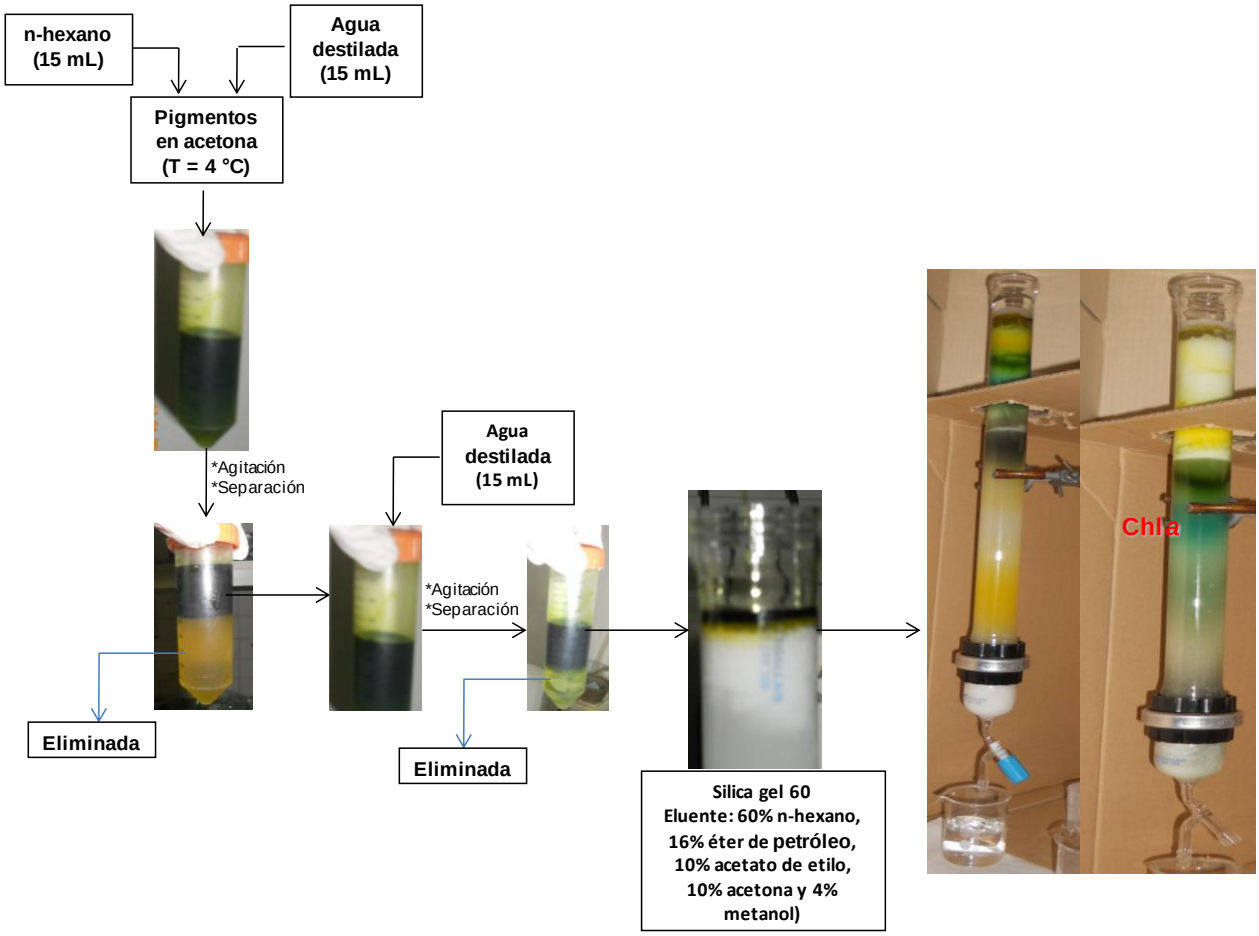


Figura 2.2. Procedimiento de separación de los pigmentos fotosintéticos por columna.

2.3.2 Preparación de los híbridos clorofila *a*-hidrotalcita (Chl *a*/HT)

Se espera retener 15 mg de clorofila ***a*** en 25 mL de acetona o de éter por gramo de hidrotalcita previamente secada durante 24 h a 150 °C. Dicha cantidad fue determinada suponiendo que la clorofila ***a*** se sorbiera en la superficie de las hidrotalcitas de manera plana y por el lado del macrociclo cuyo tamaño calculado (*Material Studio, DFF* para la parte orgánica y *UFF* alrededor del Mg) fue de ~14.5 Å de lado (considerando al macrociclo un cuadrado, Figura 2.3) y tomando en cuenta la superficie de área específica de los sólidos (alrededor de 20 m^2/g).

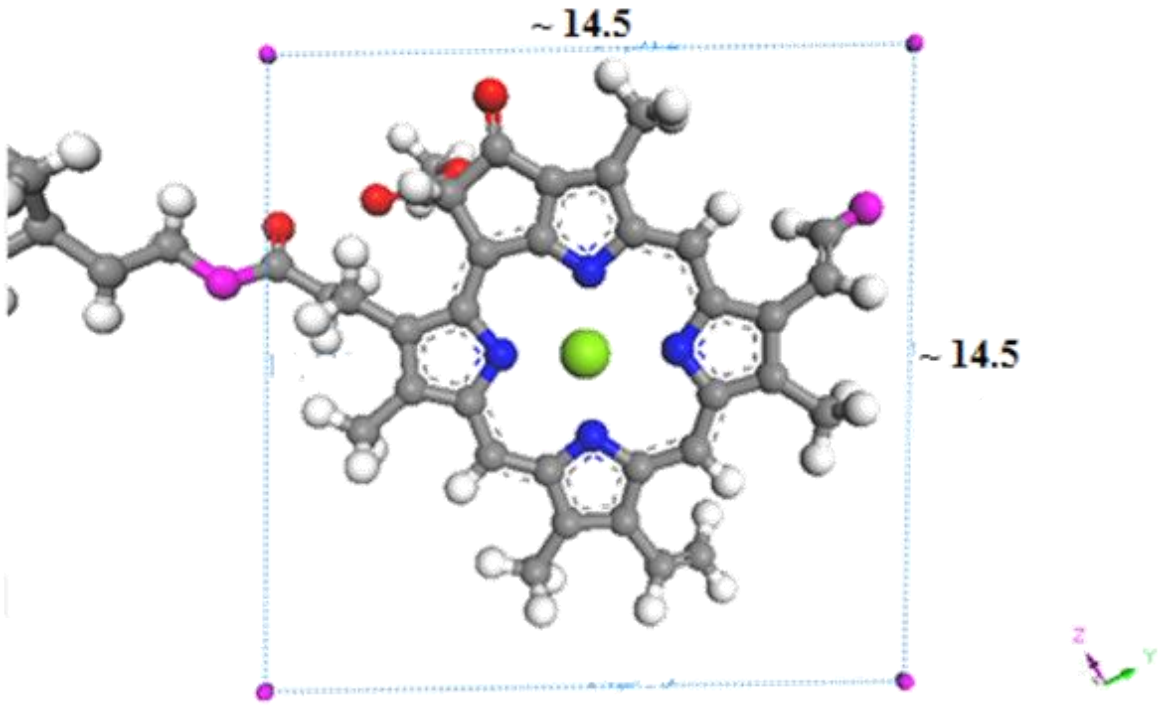


Figura 2.3. Dimensiones del macrociclo de la clorofila ***a*** calculado por Material Studio.

Para la adsorción de la clorofila ***a*** se utilizaron hidrotalcitas de diferente composición $M^{II}/Al(X)$ (M^{II} = Mg, Ni o Zn, X = 2, 3 o 4). La adsorción se llevó a cabo a temperatura ambiente y bajo luz tenue, Figura 2.4.

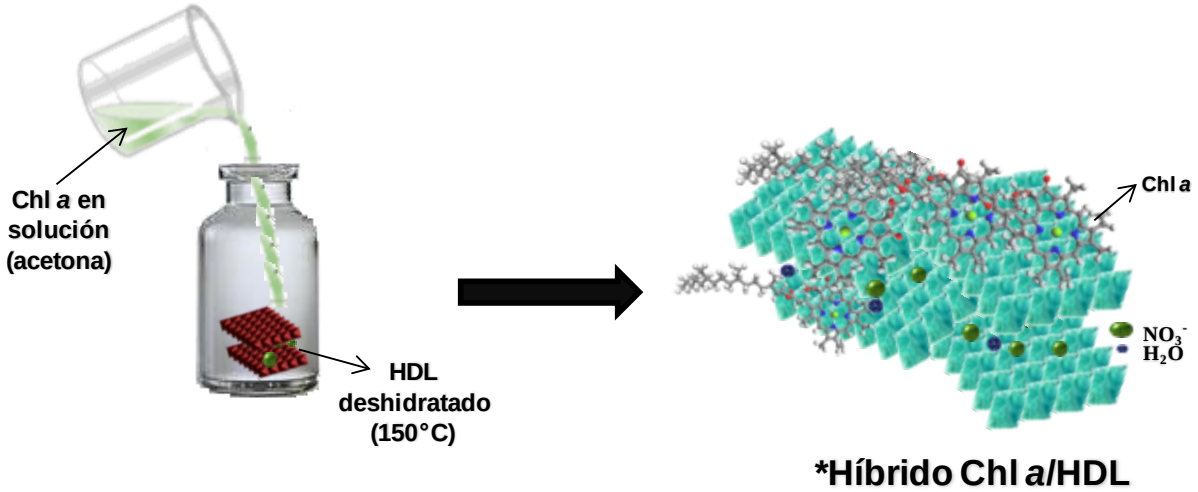


Figura 2.4. Esquema general de preparación de los híbridos Chl *a*/HT.

En la Tabla 2.3 se reporta la denominación asignada para las muestras obtenidas de la sorción de la clorofila ***a*** en las hidrotalcitas.

Tabla 2.3. Denominación de los híbridos.

Tratamiento hidrotérmico	Clave	Composición M^{II}
microondas	**Chl-M^{II}/Al(2)-MW**	**M^{II} = Mg, Ni o Zn**
	Chl-M^{II}/Al(3)-MW	
	Chl-M^{II}/Al(4)-MW	
convencional	**Chl-M^{II}/Al(2)**	
	Chl-M^{II}/Al(3)	
	Chl-M^{II}/Al(4)	

2.3.3 Desorción de la clorofila *a* de los híbridos Chl *a*/HT en acetona

Para estudiar la estabilidad de la clorofila ***a*** retenida en los sólidos se llevó a cabo la lixiviación de ésta en acetona y el sobrenadante fue analizado por espectroscopia UV-Vis. El procedimiento se realizó de la siguiente manera: se pesaron 25 mg de híbrido y se colocaron en pequeños viales de plástico y se adicionaron 2 mL de acetona a cada vial. Posteriormente, todas las muestras se centrifugaron a 5000 RPM a 20 °C 15 min. Finalmente se monitoreó dicha estabilidad a diferentes tiempos 1, 10 y 30 días después de haber sido incorporada la clorofila ***a*** en algunas de las hidrotalcitas analizando la cantidad lixiviada por UV-Vis. Cabe mencionar que los híbridos fueron almacenados a temperatura ambiente en un recipiente de plástico bajo luz tenue.

2.4 Métodos de caracterización

Las muestras sintetizadas en este trabajo se caracterizaron mediante diversas técnicas: análisis químico elemental CHNS-O (AE), espectroscopia de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES), difracción de rayos X (DRX), espectroscopia de infrarrojo (FTIR), adsorción-desorción de nitrógeno, análisis térmico gravimétrico y térmico diferencial (ATG-ATD), espectroscopias ultravioleta visible (UV-Vis), ultravioleta visible de reflectancia difusa (DRS-UV) y emisión de fluorescencia. A continuación se describen, de manera general, las técnicas utilizadas para la caracterización de los materiales. Algunas de ellas se describirán con mayor detalle.

2.4.1 Análisis elemental CHNS-O

Esta técnica sirve para determinar la composición elemental de las muestras. Es una técnica que proporciona el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presentes en un amplio abanico de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica, tanto sólidas como líquidas.

El análisis elemental se basa en la combustión en atmósfera de oxígeno puro, de la muestra a analizar, a una temperatura aproximada de 1000 ºC. Con esta combustión

se consigue convertir las moléculas orgánicas de la muestra en gases simples (CO_2, H_2O, N_2, etc). Una vez producidos, los gases se presurizan y se separan mediante una columna cromatográfica. Finalmente, se mide la cantidad de cada uno de ellos gracias a sus diferentes conductividades térmicas.

Para determinar la cantidad de N, C e H contenidos en las muestras, se utilizó un equipo Fisons EA-1108 CHNS-O elemental analyzer.

2.4.2 Espectroscopia de emisión de plasma de acoplamiento inductivo

Mediante la espectroscopia de emisión con plasma de acoplamiento inductivo es posible determinar de forma cuantitativa la mayoría de los elementos de la tabla periódica a niveles de traza y ultratraza, partiendo de muestras en disolución acuosa. La muestra, en forma líquida, es transportada por medio de una bomba peristáltica hasta el sistema nebulizador donde es transformada en aerosol gracias a la acción de gas argón. Dicho aerosol es conducido a la zona de ionización que consiste en un plasma generado al someter un flujo de gas argón a la acción de un campo magnético oscilante inducido por una corriente de alta frecuencia. En el interior del plasma se pueden llegar a alcanzar temperaturas de hasta 8000 K. En estas condiciones, los átomos presentes en la muestra son ionizados/excitados. Al volver a su estado fundamental, estos iones o átomos excitados emiten radiaciones de una longitud de onda que es característica de cada elemento. Esta radiación pasa a través de un sistema óptico que separa la radiación según su longitud onda. A continuación un detector mide la intensidad de cada una de las radiaciones relacionando ésta con la concentración de cada elemento en la muestra.

En este trabajo el contenido de Al, Mg y Cu en las muestras se midió por ICP-OES. Los sólidos previamente calcinados (*ca.* 10 mg) se disolvieron en HNO_3/HCl (1/3 vol.) antes de ser analizados en un equipo Varian 715-ES ICP-Optical Emission Spectrometer.

2.4.3 Difracción de rayos-X

2.4.3.1 Ley de Bragg

La Ley de Bragg indica la relación entre el ángulo de la radiación difractada Ɵ, el espacio reticular d y la longitud de onda (λ) de la radiación de rayos X: $n\lambda = 2d\,sen\theta$ siendo n un número entero. Utilizando la ley de Bragg y los parámetros de red es posible determinar los espacios interlaminares de los compuestos tipo hidrotalcita. El parámetro **a** depende de la naturaleza del catión, en tanto que el parámetro **c** depende del catión y del anión. El valor de **d**, la distancia interlaminar en el plano (hkl) para una red hexagonal puede encontrarse con la ecuación ya antes mencionada. Estos valores de **d** se compararon con los de las tarjetas clasificadas del Joint Committee of Powder Diffraction Standards (JCPDS) que es un archivo que contiene 16,000 difractogramas de rayos X clasificados y ordenados para identificar los compuestos cristalinos.

En este trabajo se utilizó un difractómetro Bruker-axs D8-advance acoplado a un tubo con ánodo de cobre para identificar los compuestos. Se utilizaron las tarjetas PDF para indexar los patrones de difracción obtenidos.

2.4.4 Espectroscopia de infrarrojo

El análisis de infrarrojo es considerado como una herramienta para la identificación de la estructura y los aniones presentes en la región interlaminar de los compuestos tipo hidrotalcita, por ejemplo, la absorción entre 3600-3450 cm^{-1}, presente en todas las hidrotalcitas, es atribuida a la vibración del hidrógeno del grupo OH que se encuentra en las capas tipo brucita. La banda a 1630 cm^{-1} corresponde a la vibración de deformación angular de las moléculas de agua. En la región de 1000 a 200 cm^{-1} se encuentran las bandas relacionadas con la vibración de los aniones presentes y con la vibración de catión-oxígeno. La principal banda de absorción de los aniones más comunes (carbonatos, nitratos, sulfatos, cloruros, etc.) se observa entre 1800 y 1000 cm^{-1} (Clifford y col., 1980).

Para el análisis de las muestras de este trabajo, los espectros se obtuvieron en la región 4000-400 cm^{-1} con un equipo Magna-IR Spectrometer 550 Nicolet. Las muestras fueron mezcladas con KBr para formar las pastillas.

2.4.5 Adsorción-desorción de nitrógeno

La adsorción-desorción física es una de las técnicas más importantes para conocer la estructura interna de los poros de un sólido (tamaño, forma y distribución de poros), también sirve para determinación del área específica. Las medidas de adsorción de gases se utilizan ampliamente para la caracterización de diferentes tipos de sólidos porosos, tales como óxidos, carbones, zeolitas, polímeros orgánicos o hidrotalcitas. El método más utilizado para la determinación del área específica es el de Brunauer, Emett y Teller conocido como BET.

En este trabajo se utilizó un equipo Micromeritics ASAP 2020 para el análisis de las muestras, las cuales fueron previamente desgasificadas a 150 °C por 12 horas en alto vacío.

2.4.6 Microscopia electrónica de barrido

El empleo de esta técnica proporciona información sobre la morfología de los cristales así como sobre su tamaño.

Para el análisis de las muestras en este trabajo, se empleó un microscopio electrónico de barrido Leica Stereoscan 440. Las muestras fueron previamente cubiertas con oro para evitar problemas de cargas.

2.4.7 Análisis térmico gravimétrico y térmico diferencial

El análisis térmico gravimétrico (ATG-DTG) proporciona una medición cuantitativa de cualquier cambio de masa con respecto a la temperatura, debida a deshidrataciones o descomposiciones.

El comportamiento térmico de las hidrotalcitas se caracteriza por dos transiciones endotérmicas:

1) A temperaturas entre 100-200 °C, corresponden a la pérdida de agua de la región interlaminar, sin presentar un colapsamiento de la estructura, siendo éste, un paso reversible.
2) A temperaturas entre 200-500 °C, ocasionado por la pérdida de grupos hidroxilos pertenecientes a la capa tipo brucita, así como la pérdida de los aniones presentes en el espacio interlaminar (Cavani y col., 1991).

Estas dos transiciones dependen cualitativa y cuantitativamente de factores como: la naturaleza de M^{II} y M^{III}, el tipo de aniones, la atmósfera en el tratamiento térmico, etc.

El análisis térmico gravimétrico y el análisis térmico diferencial se realizaron en atmósfera de aire (flujo: 50 cm^3/min). Se utilizó un equipo Mettler Toledo TGA/SDTA 851. El peso de las muestras fue aproximadamente de 10 mg. El análisis se llevó a cabo en un rango de temperatura entre 25-800 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

2.4.8 Espectroscopias de absorción y emisión de luz

La absorción de la luz le da a las sustancias sus colores característicos. La luz que no es absorbida por las sustancias da la sensación de ser absorbida por los pigmentos en el ojo humano. Entonces, cuando se observa el característico color verde de las plantas, se debe a que la luz verde no fue absorbida. La absorción de la luz, como se ha visto en el capítulo anterior, es el corazón de la fotosíntesis, por lo que se hablará un poco más a profundidad de este fenómeno.

Si un sistema cualquiera, por ejemplo una molécula, se irradia con luz con una energía fotónica igual a la energía de espaciamiento entre dos niveles cuánticos, entonces la molécula puede absorber esa luz y hacer una transición electrónica a un estado de mayor energía. La luz que cause este efecto, debe tener solamente la cantidad exacta de energía para hacerlo. Si es muy alta o muy baja, entonces dicha energía no será absorbida. Este efecto se conoce como absorción de resonancia y da como resultado un espectro de absorción, en el que se grafica la absorción de la luz contra la longitud de onda.

La luz interacciona con la materia en forma de “paquetes discretos de energía” denominados fotones y la energía de estos fotones depende de la frecuencia de manera

directamente proporcional:

$$E = h\nu \quad \textbf{Ec. 2.1}$$

donde *h* es la constante de Plank= 1,58 . 10^{-34} cal/s y v es la frecuencia que está relacionada con la longitud de onda de la luz mediante la siguiente ecuación:

$$\nu = c / \lambda \quad \textbf{Ec. 2.2}$$

siendo λ la longitud de onda de la luz. Entonces, se puede expresar dicha resonancia con una simple ecuación:

$$M + h\nu \rightarrow M^* \quad \textbf{Ec. 2.3}$$

donde M representa al estado basal y M* representa al estado excitado o de mayor energía. El cambio de energía en la molécula, está dado por:

$$\Delta E = h\nu \quad \textbf{Ec. 2.4}$$

Esta ecuación es muy similar a la ecuación 2.1, la única diferencia es que ΔE representa el cambio de energía de la molécula, la cual es inducida por la absorción de la luz. La conservación de energía requiere que la suma de la energía del fotón y del estado basal de la molécula iguale a la energía del estado de excitación de la molécula.

Además de la transición a un nivel de más alta energía, originada por la absorción, también es posible una transición a un nivel de más baja energía:

$$M^* \rightarrow M + h\nu \quad \textbf{Ec. 2.5}$$

Una molécula excitada electrónicamente puede perder su energía de excitación y volver al estado fundamental de varias maneras. Se puede decir que existen transiciones radiativas y no radiativas. En este caso, se hará referencia exclusivamente

a las radiativas, que son las que corresponden a los fenómenos de fluorescencia y fosforescencia.

Aunque la clorofila absorbe mucho en el rojo y en el azul, la fluorescencia ocurre esencialmente en la región roja, fenómeno conocido como desplazamiento de Stokes. La energía de los fotones absorbidos en la región roja, son emitidos como fluorescencia, cuando se produce una transición radiactiva. Cuando la transición es no radiactiva en esa zona (la roja), el electrón excitado entra en el centro de reacción y se emplea para reducir al NAHDP. Por lo tanto, el fenómeno de fluorescencia está asociado con una transición no radiactiva de un fotón absorbido en la zona del rojo, y se manifiesta como una luz emitida a una longitud de onda levemente mayor (energía por lo tanto, menor) que la de la banda de absorción de la clorofila. La longitud de onda para la fluorescencia ocurre entre 662 y 728 nm.

2.4.8.1 Espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis)

2.4.8.1.1 Ley de absorción de Lambert-Beer

Una de las más grandes ventajas y útiles propiedades de la absorción de la luz es que puede usarse para hacer determinaciones cuantitativas de la cantidad de material presente en una muestra. La relación entre la luz absorbida y la concentración de una muestra se conoce como Ley de Lambert-Beer. La ecuación que relaciona estas dos cantidades es:

$$A = \xi c l \qquad \textbf{Ec. 2.6}$$

Donde A es la absorbancia (una cantidad sin unidades, algunas veces también llamada densidad óptica), ξ es una constante de proporcionalidad llamada coeficiente de extinción molar, l es la longitud del paso de la luz, normalmente 1 cm, y c es la concentración de la sustancia absorbente en M. Las unidades para ξ son $M^{-1}cm^{-1}$. ξ tiene diferente valor a cada longitud de onda, entonces un gráfico de ξ contra λ, define el espectro de absorción de una muestra. El valor de ξ a una longitud de onda con el máximo valor de absorbancia,

λ_{max}, es lo que se grafica normalmente. Este coeficiente de extinción es una medida de la intensidad intrínseca de la absorción para una sustancia dada. Puede tener valores desde cerca del cero para transiciones prohibidas hasta más de 10^5 $M^{-1}cm^{-1}$ para una transición totalmente permitida en una molécula tal como la clorofila (Scheer, 1991; Stoll, 1912; Mackinney, 1941; Blankenship, 2002).

2.4.8.1.2 Mediciones de absorción

Los espectros de absorción se miden utilizando un espectrofotómetro. El tipo de mediciones de absorción más comunes son en las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético. Para realizarlas se utiliza un equipo que comúnmente se nombra espectrofotómetro UV-Vis. Este equipo cuenta con las siguientes partes:

- **Fuente de luz**: suele ser una lámpara que emite luz policromática, es decir que contiene distintas longitudes de onda con distintas intensidades, I_0.
- **Sistema óptico 1**: a través de los filtros, lentes y redes de difracción se focaliza el haz de luz y se selecciona una longitud de onda fija (monocromador).
- **Compartimiento para muestra**: es donde se coloca la muestra, con un espesor conocido, normalmente disuelta, en una cubeta de 1 cm de paso óptico, sobre la que se hace incidir el haz de luz monocromática.
- **Sistema óptico 2**: recibe la luz transmitida por la muestra, la focaliza y selecciona por longitudes de onda.
- **Detector**: recibe la señal de la intensidad de luz transmitida a cada longitud de onda y la transforma en señal eléctrica que un ordenador pueda procesar.

Para medir los espectros de absorción en disolución, en este trabajo, se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35, desde una región con λ = 800 nm hasta una región con λ = 350 nm. La velocidad de escaneo fue de 120 nm/min con un ancho de rendija de 2 nm. Se ocuparon celdas de cuarzo de 1 cm.

2.4.8.2 Espectroscopia de ultravioleta visible de reflectancia difusa (DRS-UV)

La reflectancia difusa tiene lugar en todas las direcciones como consecuencia de los procesos de absorción y dispersión. Predomina cuando los materiales de la superficie reflectante son débiles absorbentes a la longitud de onda incidente y cuando la penetración de la luz es grande en relación a la longitud de onda.

2.4.8.2.1 Ventajas

- Preparación mínima de la muestra.
- Posibilidad de analizar la mayoría de materiales no reflectores, incluyendo materiales muy opacos o poco absorbentes.
- Análisis de superficies irregulares y materiales duros.
- Alta sensibilidad.

2.4.8.2.2 Desventajas

Además de los problemas de la reflexión en la superficie se tienen otros problemas como:

- Está limitada principalmente a muestra en polvo.
- El llenado de la celda es poco reproducible sobre todo cuando se quiere trabajar en análisis cuantitativo.

Los espectros de ultravioleta de reflectancia difusa se midieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 40 equipado con una esfera de integración Labsphere de 150 nm de diámetro. Como referencia de reflectancia difusa se utilizó el estándar Spectralon-SRS-99-010 (Reflectancia del 99 %). Los espectros fueron tomados desde λ = 800 hasta 350 nm con una velocidad de escaneo de 60 nm/min. Se ocuparon cubetas de cuarzo desmontables de 5 mm y el ancho de rendija para el paso de luz fue de 2 nm. Los datos de reflectancia son presentados aplicando la función de Kubelka-Munk, ecuación 2.7. Los datos de Kubelka-Munk asumen que la luz que incide en un medio dispersante sufre simultánemente un proceso de absorción y dispersión, de forma que la radiación reflejada puede describirse en función de las constantes de absorción (k) y de dispersión (s) (Christy y Kvalheim, 1995). En el caso de las muestras opacas y de espesor

infinito se tiene que:

$$F(R_\infty) = (1- R_\infty)/(2R_\infty)= k/s \quad \textbf{Ec. 2.7}$$

donde R_∞ es la reflectancia relativa en el infinito de la muestra, que es la fracción de luz incidente que es reflejada, $R_{muestra}/ R_{estándar}$.

2.4.8.3 Espectroscopia de fluorescencia

Las mediciones de fluorescencia proveen una prueba importante de los estados excitados de un sistema. Una gran variedad de mediciones de fluorescencia puede ser posible, cada una da información diferente. Las mediciones en estado estacionario y tiempo real son ampliamente usadas en la investigación de la fotosíntesis. En la Figura 2.5 se muestra un diagrama de un espectrofotómetro de fluorescencia. Los elementos esenciales que lo componen son: una fuente de luz, monocromadores de excitación y emisión, un compartimiento para la muestra, un fotodetector y un procesador de señal. La mayoría de estos elementos son muy similares a los de un espectrofotómetro de absorción. La mayor diferencia radica en que, en un espectrofotómetro de absorción, la luz incidente y transmitida tienen la misma longitud de onda y en el de fluorescencia, la luz incidente tiene usualmente, una longitud de onda diferente a la de la luz emitida (Blankenship, 2002).

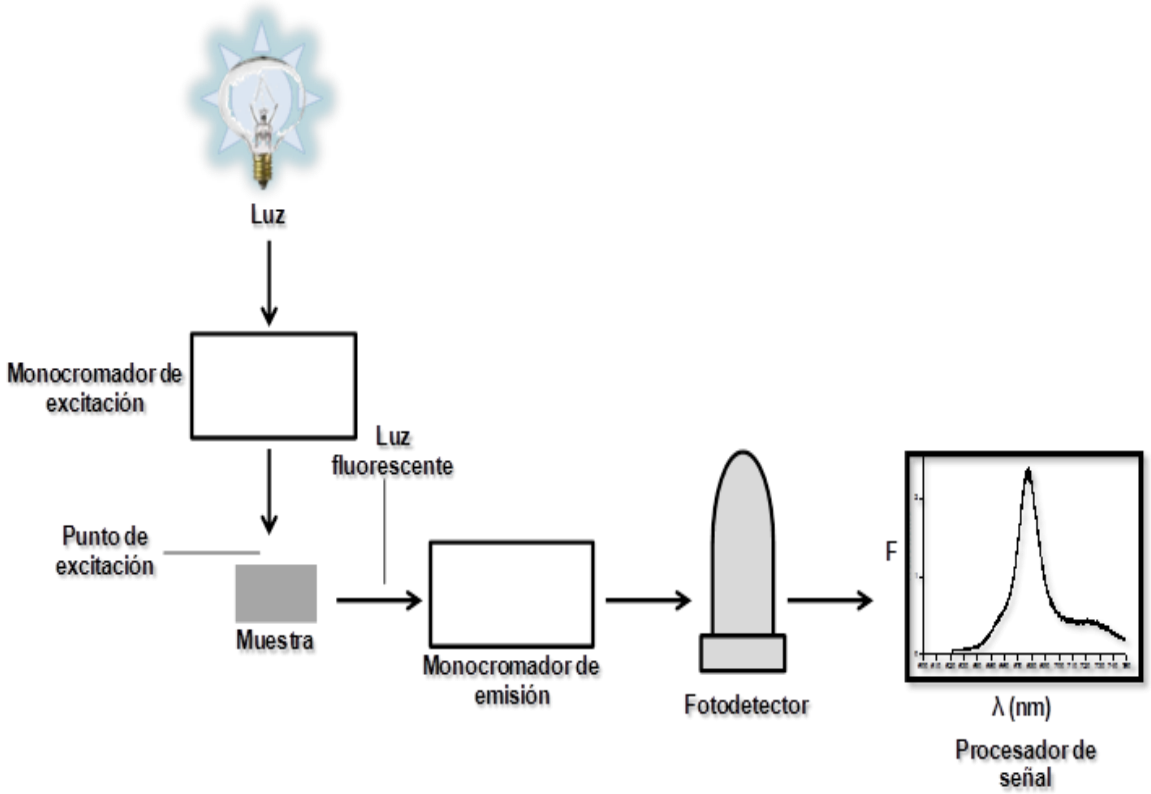


Figura 2.5. Diagrama de bloques de un espectrofotómetro de fluorescencia.

Dos tipos básicos de espectros de absorción se miden normalmente. El más común es el espectro de emisión, en el que el monocromador de excitación es ajustado a un longitud de onda que excita la molécula de interés y la emisión monocromática se escanea como función de la longitud de onda. El otro tipo de espectro es el espectro de excitación, en el que el monocromador de emisión se ajusta para detectar alguna emisión de la molécula de interés, y la excitación monocromática es escaneada en función de la longitud de onda. El espectro de fluorescencia de excitación es usualmente muy similar al espectro de absorción de la molécula emisora.

En este trabajo, los espectros de fluorescencia en estado de equilibrio se realizaron con un espectrofotómetro de fluorescencia en torno a dos monocromadores Jobin Yvon M25, cada uno provisto con rendijas variables y una rejilla de 1200 líneas/mm (dispersión lineal de 3 nm/mm). El detector fue un fotomultiplicador R928 (Hamatsu) con un bajo nivel de ruido. Los anchos de banda espectrales fueron de 3 nm para ambos monocromadores

y la velocidad de barrido fue de 0.83 nm/s. Todos los espectros se obtuvieron a una excitación λ_{ex} = 430 nm.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Hidrotalcitas

Como se mencionó, pueden emplearse diferentes técnicas de caracterización que puedan dar información de la composición y estructura de las láminas de las hidrotalcitas, del espacio interlaminar de éstas, así como de las interacciones entre las hidrotalcitas y las moléculas empleadas en la formación de los híbridos clorofilina-hidrotalcita y clorofila ***a***-hidrotalcita.

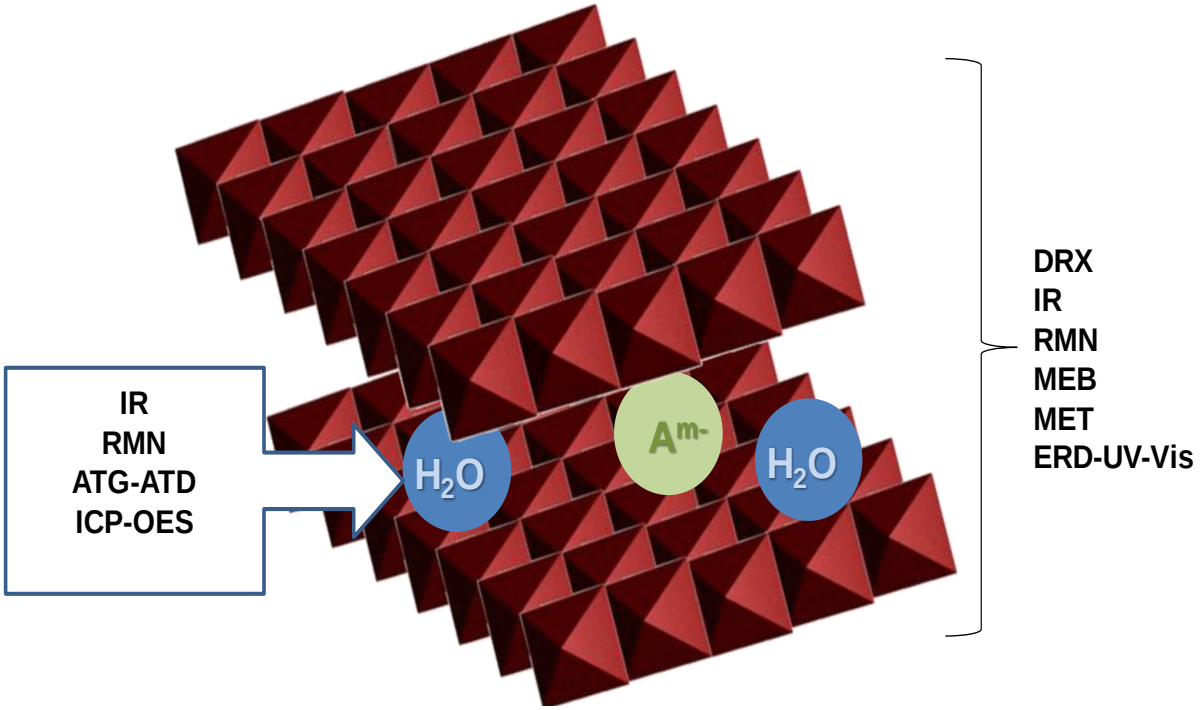


Figura 3.1. Técnicas utilizadas en la caracterización de las hidrotalcitas.

3.1.1 Hidrotalcitas sintetizadas por coprecipitación e irradiación con microondas en la etapa de tratamiento hidrotérmico

Las microondas pueden usarse como fuente de calentamiento durante el proceso de síntesis de las hidrotalcitas. Su interacción con estos materiales produce reorientaciones de dipolos dieléctricos (calentamiento dieléctrico) y la conducción de los iones puede ser llevada a cabo bajo este campo existente, siendo posible la obtención de un calentamiento más uniforme de los materiales en términos de volumen (Benito y col., 2006a). El uso de las microondas como tratamiento hidrotérmico en el proceso de cristalización del gel obtenido durante la coprecipitación permite incrementar la cristalinidad de los sólidos en periodos más cortos de tiempo (Rivera y col., 2006; Benito y col., 2006a,b). Las muestras cristalizadas por irradiación con microondas tienen una gran cantidad de agua y un tamaño de partícula más pequeño que las preparadas por hidrotratamiento convencional sobre todo para las muestras de composición Mg/Al. Las propiedades texturales de los sólidos se modifican debido al tratamiento con microondas (Fetter y Bosch, 2010).

3.1.1.1 Estructura

La difracción de rayos X es una de las principales técnicas de caracterización de materiales tipo hidrotalcita. En la Figura 3.2 se muestran los difractogramas de rayos X de las muestras iniciales de diferente composición M^{II}/Al (M^{II} = Mg, Ni o Zn) y de diferente relación metálica molar M^{II}/Al = X (X = 2, 3 o 4) sintetizadas por coprecipitación seguido por irradiación con microondas en la etapa de cristalización.

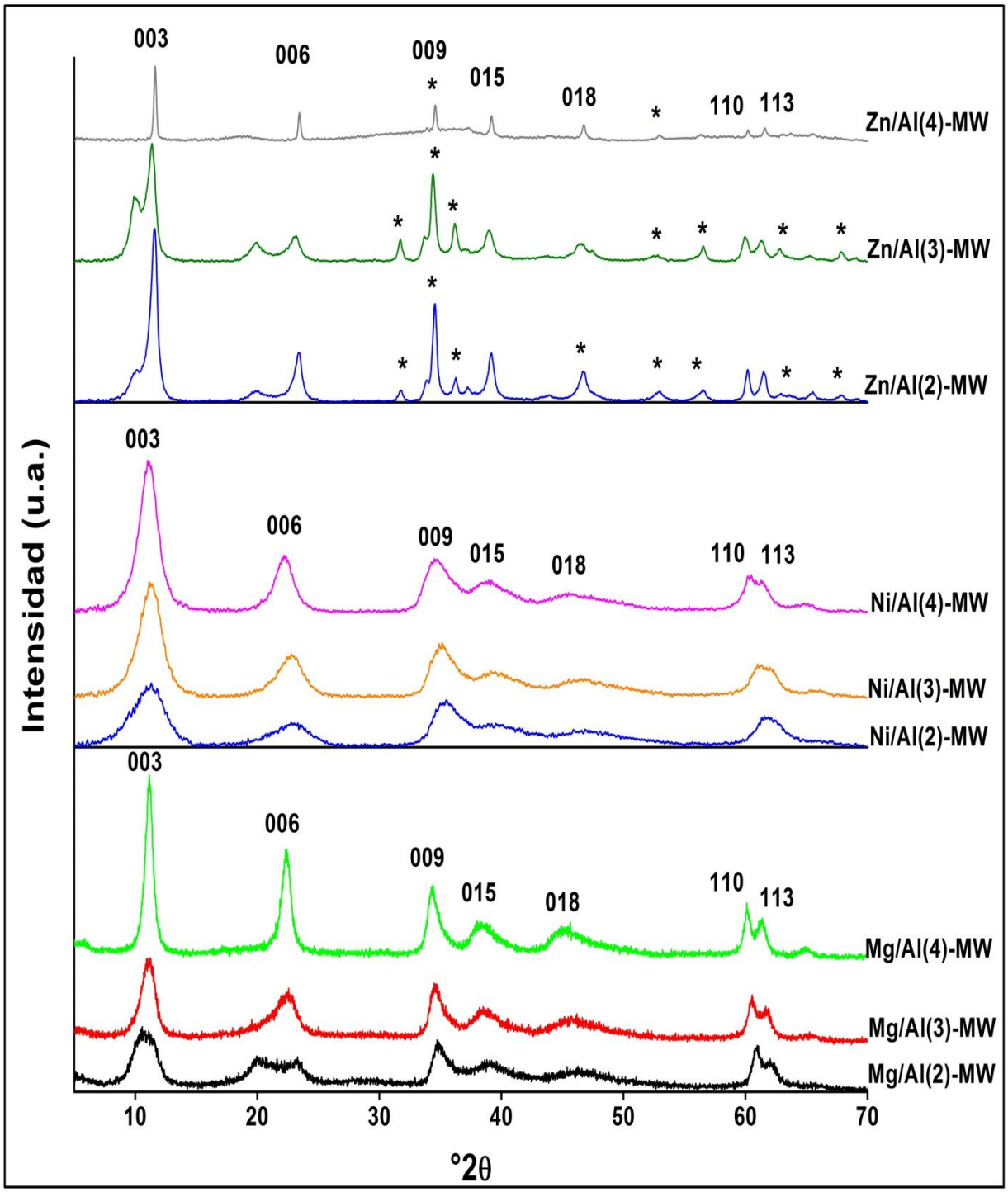


Figura 3.2. Difractogramas de rayos X de las muestras iniciales Mg/Al(2)-MW, Mg/Al(3)-MW y Mg/Al(4)-MW; Ni/Al(2)-MW, Ni/Al(3)-MW y Ni/Al(4)-MW; Zn/Al(2)-MW, Zn/Al(3)-MW y Zn/Al(4)-MW. *Zincita (ZnO).

Para las muestras de composición Mg/Al y Ni/Al se observa que todas presentan estructuras acorde a los picos de difracción de la hidrotalcita (JCPDS 41-1428). En todas estas muestras la distancia interlaminar d_{003} = 8 Å lo que indica que se tienen nitratos en mayor proporción como aniones de compensación en la región interlaminar (Cavani y col., 1991; Rives y Ulibarri, 1999). En las muestras de Mg/Al si la relación metálicas molar es igual a 4, el pico 003 es estrecho y bien definido, pero si la relación molar Mg/Al es igual a 3 aparece un hombro del lado izquierdo del pico. En la muestra Mg/Al(2)-MW, tal efecto se observa incluso en el pico 006 donde se ven dos picos, uno corresponde a una hidrotalcita hexagonal (JCPDS 51-1525) y el otro a una romboédrica (JCPDS 41-1428).

Las muestras de Ni/Al presentan las mismas características, es decir se formaron en las mismas condiciones. En la muestra Ni/Al = 2, los picos dobles se observan en 003 y 009. Es importante notar que en la muestra Mg/Al(2)-MW la intensidad de los picos de la hidrotalcita romboédrica es similar a la intensidad de los picos de la hidrotalcita hexagonal mientras que para la muestra de Ni/Al(2)-MW no es así. Por lo tanto, la cantidad de níquel incorporado en la red hexagonal es mayor.

Para las muestras de Zn/Al se puede observar que se obtuvieron dos diferentes fases: hidrotalcita (JCPDS 41-1428) y zincita (JCPDS 12-0627), siendo la zincita la fase que predominó en las muestras. La formación de impurezas se atribuye al pH que fue de 11 y al tratamiento hidrotérmico llevado a cabo por irradiación con microondas (Rivera y col., 2006). Para obtener una hidrotalcita de Zn/Al sin impurezas se debe tener un pH entre 7 y 8 (Cavani y col., 1991). Debido a que no se obtuvieron hidrotalcitas puras de composición Zn/Al al pH de síntesis empleado, tales muestras fueron eliminadas para posteriores caracterizaciones y aplicaciones.

3.1.1.2 Composición química elemental

La Tabla 3.1 muestra que la relación molar Mg/Al obtenida experimentalmente es 2.2, 3.1 y 4.2 de acuerdo con la composición nominal. Sin embargo para Ni/Al resulta ser de 2.2, 3.3 y 7.5. Este último valor indica que cierta cantidad de aluminio se perdió durante la síntesis debida a las microondas (Bergadà y col., 2007b). La cantidad de carbono disminuye con el aumento de la proporción molar de las muestras de composición Mg/Al mientras que el contenido de nitrógeno se mantiene constante. La cantidad de carbono presente en las muestras de níquel es independiente de la relación molar Ni/Al pero la cantidad de nitrógeno disminuye al incrementar la relación molar. La cantidad de hidrógeno incrementa como función de la relación molar Mg/Al y para las muestras de Ni/Al disminuye.

La cantidad de carbono y nitrógeno se atribuye a la presencia de carbonatos y nitratos, respectivamente, que son los aniones de compensación. Como se mencionó, los nitratos se encuentran en mayor cantidad, Tabla 3.1. Sin embargo, los carbonatos también pueden estar presentes en el agua y pueden ocupar los sitios libres de intercambio durante el proceso de lavado. El número de sitios de intercambio puede calcularse por el contenido de carbono y nitrógeno presentes en las hidrotalcitas. Los valores reportados de H (debido al contenido de agua y a los grupos OH de las láminas de la hidrotalcita) puede correlacionarse con la relación molar Mg/Al; de hecho el agua se asocia con una deficiencia de carga.

Las hidrotalcitas de níquel son menos hidrofílicas que las de magnesio; al aumentar el contenido de la fase romboédrica la retención de agua disminuye (Sampieri y col., 2007; Ran y col., 2012).

Tabla 3.1. Composición química de las hidrotalcitas de Mg/Al y Ni/Al determinadas por ICP-OES y análisis elemental.

Muestra	Composición elemental				Fórmula Química
	Relación metálica molar M^{II}/Al	C mol/g	N mol/g	H mol/g	
Mg/Al(2)-MW	2.2	0.085	0.20	3.60	$Mg_{0.69}Al_{0.31}(OH)_2\ (NO_3)_{0.15}(CO_3)_{0.064}\cdot 0.17H_2O$
Mg/Al(3)-MW	3.1	0.072	0.19	3.65	$Mg_{0.76}Al_{0.24}(OH)_2(NO_3)_{0.14}(CO_3)_{0.052}\cdot 0.17H_2O$
Mg/Al(4)-MW	4.2	0.050	0.20	3.73	$Mg_{0.81}Al_{0.19}(OH)_2(NO_3)_{0.14}(CO_3)_{0.035}\cdot 0.06H_2O$
Ni/Al(2)-MW	2.2	0.065	0.15	3.12	$Ni_{0.68}Al_{0.33}(OH)_2(NO_3)_{0.148}(CO_3)_{0.066}\cdot 0.06H_2O$
Ni/Al(3)-MW	3.3	0.058	0.13	2.97	$Ni_{0.77}Al_{0.23}(OH)_2(NO_3)_{0.13}(CO_3)_{0.056}\cdot 0.06H_2O$
Ni/Al(4)-MW	7.5	0.062	0.11	2.79	

El contenido de Mg, Ni y Al se determinó por ICP-OES mientras que el contenido de N, C e H se determinó con un equipo para análisis elemental.

3.1.1.3 Especies

Los espectros de infrarrojo de las hidrotalcitas han sido discutidos ampliamente en la literatura (Di Cosimo y col., 1998; Kloprogge y Frost, 1999; Prinetto y col., 2000; Pérez y col., 2001; Yang y col., 2002) encontrándose tres tipos generales de vibraciones en el infrarrojo: vibraciones moleculares de los grupos hidroxilo, vibraciones de las láminas octaédricas y vibraciones de los aniones interlaminares. En la Figura 3.3 se observan los espectros de infrarrojo de las muestras iniciales Mg/Al(2)-MW, Mg/Al(3)-MW, Mg/Al(4)-MW, Ni/Al(2)-MW, Ni/Al(3)-MW y Ni/Al(4)-MW.

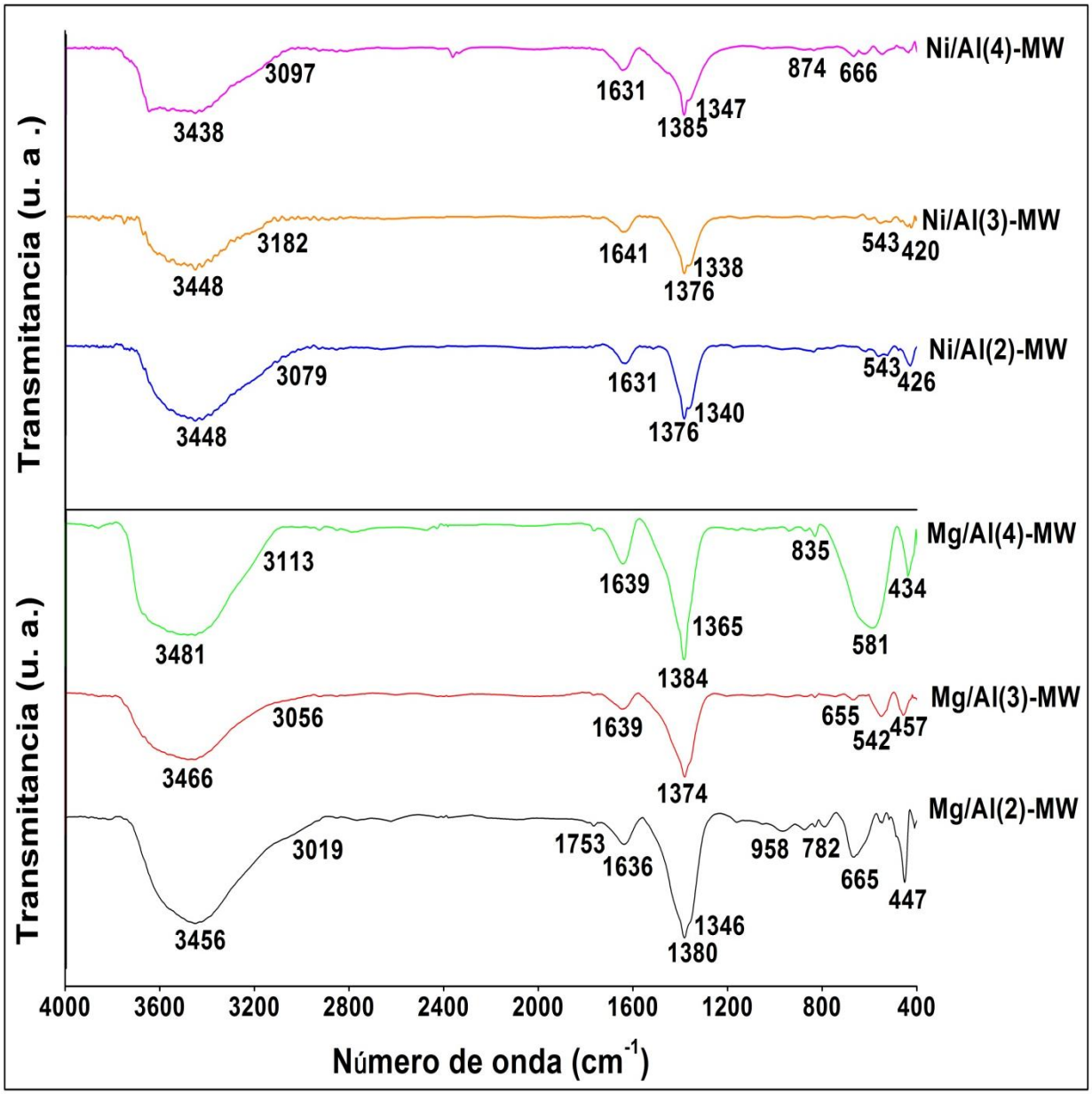


Figura 3.3. Espectros de infrarrojo de las muestras iniciales de Mg/Al y de Ni/Al de diferentes relaciones molares.

Se observa que todos los espectros de las muestras presentan las bandas características de una hidrotalcita. La banda ancha típica a ~3480-3450 cm^{-1} se atribuye al modo de vibraciones de estiramiento o tensión de los grupos hidroxilos de las láminas tipo brucita y del agua fisisorbida (vibración de grupos OH-estructurales, vibraciones

OH···OH y vibraciones M-OH). El hombro observado a ~3100-3000 cm^{-1} se asigna a un enlace por puentes de hidrógeno entre el agua y los aniones de la región interlaminar mientras que la banda a ~1640-1630 cm^{-1} es debida al modo de vibración de deformación del agua. Hacia 1384 cm^{-1} se tienen las vibraciones de los aniones intercalados en la región interlaminar, a 1384 cm^{-1} corresponde a nitratos y a 1374 cm^{-1} a carbonatos. En las muestras tanto de Mg/Al como de Ni/Al se observan ligeros desplazamientos debido a que en la región interlaminar no se tienen únicamente nitratos sino también carbonatos y al traslaparse estas bandas se observa una señal más ancha (comparada con la banda de nitratos que es muy estrecha) y más larga (comparada con la banda de carbonatos que es más corta) (Cavani y col., 1991; Rivera y col., 2006). Las bandas a ~870-830 cm^{-1}, ~650-550 cm^{-1} y a ~450-420 cm^{-1} se atribuyen a los modos vibracionales de tensión de M-O-H y de flexión de M-O (Cavani y col., 1991). El contenido del metal M^{II} en la estructura de la hidrotalcita así como el contenido de otras fases influye en la posición exacta de estas bandas.

3.1.1.4 Textura

En la Figura 3.4 se presentan las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno de las muestras de Mg/Al y Ni/Al de diferentes relaciones molares M^{II}/Al = X (X= 2, 3 o 4) sintetizadas por irradiación con microondas. Todas las isotermas son del tipo IV según la clasificación IUPAC. Las muestras de Mg/Al presentan lazos de histéresis del tipo H3 (IUPAC) que corresponden a formas de poro tipo rendija (Rouquerol y col., 1999). Su tamaño es de 30 a 75 Å como lo muestran las distribuciones de tamaño de poro, Figura 3.5. Los valores de área específica son 9, 20 y 79 m^2/g para Mg/Al(2)-MW, Mg/Al(3)-MW y Mg/Al(4)-MW, respectivamente corresponden al área externa de la partícula puesto que el nitrógeno no es capaz de entrar en el espacio interlaminar ocupado por los nitratos y carbonatos. Para la muestra Mg/Al(4)-MW, aunque el tamaño de partícula sea muy grande de acuerdo con lo observado por difracción de rayos X en donde se ven picos estrechos, y por microscopia electrónica de barrido, Figura 3.6, la relación molar propicia que la concentración de nitratos y mayormente de carbonatos (debida a la poca cantidad de cargas positivas) sea menor que en las muestras de

Mg/Al =2 y 3 (Fetter y col., 2000), Tabla 3.1. En efecto el nitrógeno se difunde fácilmente y la cantidad medida de superficie específica es grande.

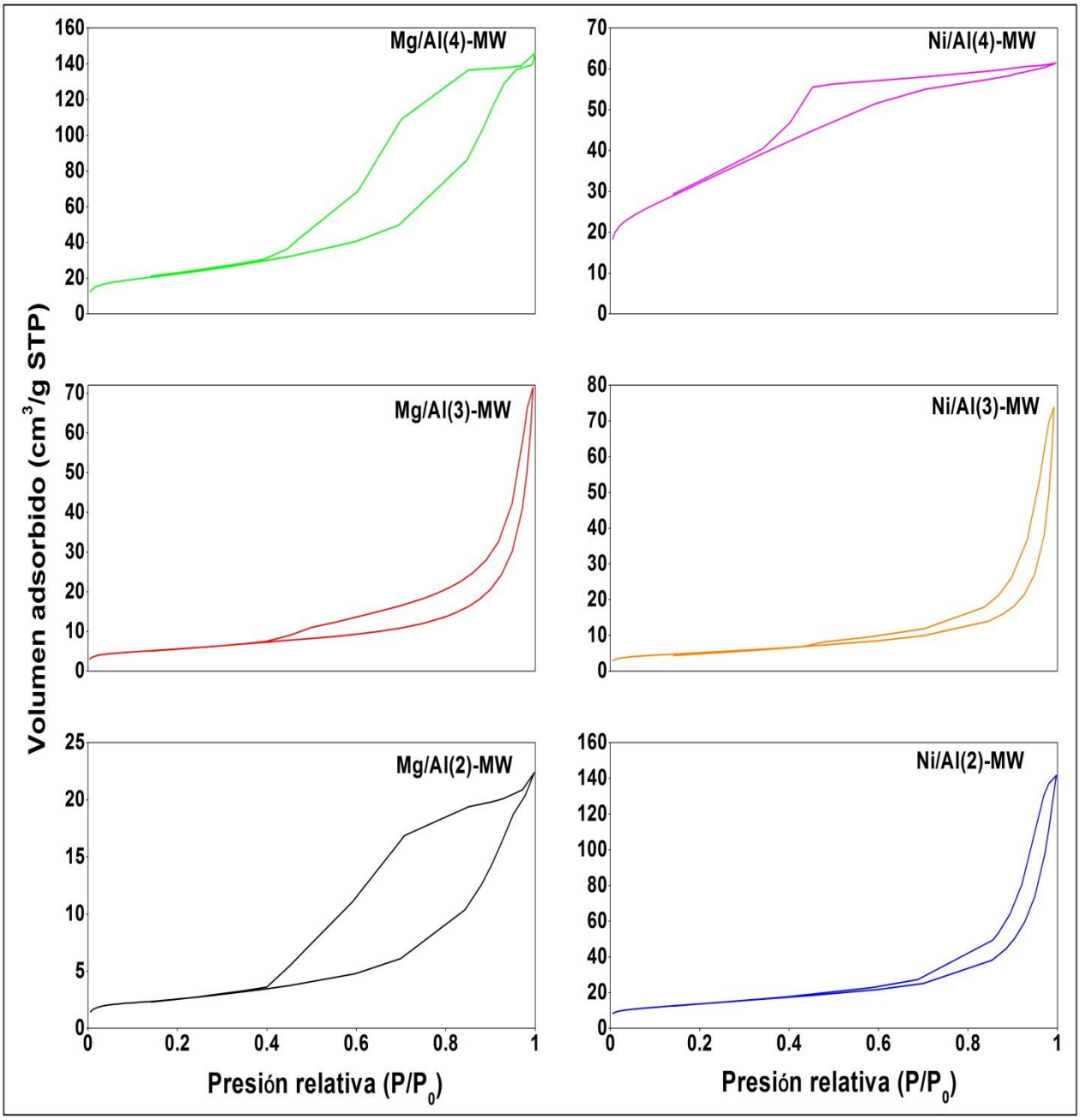


Figura 3.4. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno de las muestras de Mg/Al y Ni/Al sintetizadas con irradiación de microondas.

Las muestras Ni/Al = 2 y 3 presentan lazos de histéresis entre los del tipo H1 y del tipo H2 (IUPAC). El lazo de histéresis tipo H1 se asocia con materiales porosos que tienen una distribución de poros relativamente uniforme, mientras que los materiales que presentan lazos de histéresis del tipo H2 contienen redes de poros más complejas que consisten de poros de forma no definida y una amplia distribución de tamaños (Gregg y Sing, 1982; Valencia y col., 2003; Gil y col., 2008). El valor de área específica de la muestra de Ni/Al(4)-MW (113 m^2/g) es más grande que el valor de área específica de la muestra Mg/Al(4)-MW puesto que en Ni/Al = 4 el número de nitratos es menor, Figura 3.2. Dicho hecho puede verse claramente en los espectros de infrarrojo, Figura 3.3 y concuerda también con la composición elemental reportada en la Tabla 3.1. El valor de área específica de las muestras Ni/Al = 2 y Ni/Al = 3 es 48 y 18 m^2/g, respectivamente. Además, tales valores de área específica se atribuyen a la morfología de los materiales, Figuras 3.6 y 3.7. Se observa que las muestras Mg/Al(2)-MW, Mg/Al(3)-MW y Ni/Al(3)-MW presentan partículas más lisas y grandes que las muestras Mg/Al(4)-MW, Ni/Al(2)-MW y Ni/Al(4)-MW las cuales presentan pequeñas partículas así como una mayor rugosidad. No obstante el tamaño de bloque para la muestra Mg/Al(4)-MW es muy grande (~ 4.5 μm).

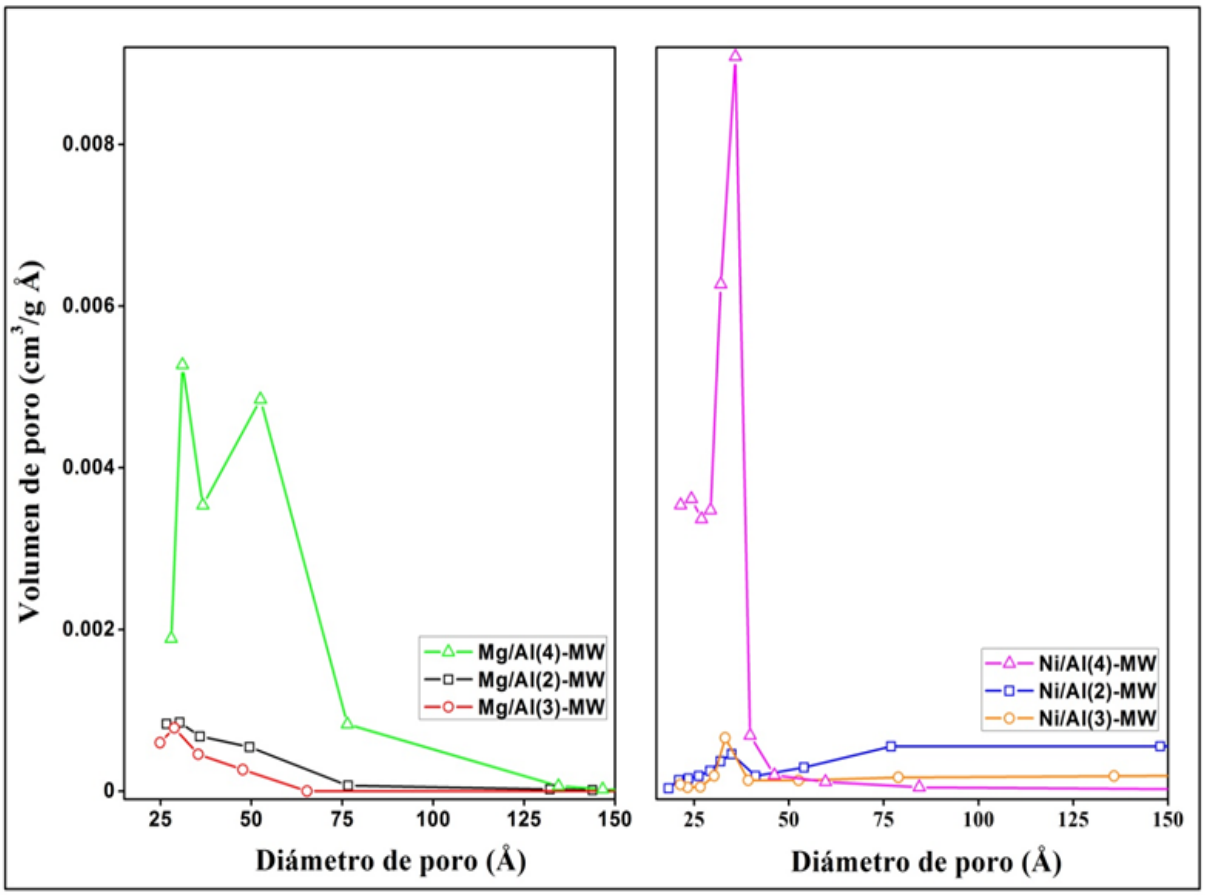


Figura 3.5. Distribuciones de tamaño de poro de las muestras de Mg/Al y Ni/Al con diferentes relaciones molares sintetizadas con microondas.

3.1.1.5 Morfología

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido se registraron para investigar la morfología de las muestras iniciales, Figuras 3.6 y 3.7. Las muestras Mg/Al(2)-MW y Mg/Al(3)-MW están constituidas por bloques grandes, compactos e irregulares de 2 µm aproximadamente, en donde se aprecia la superposición de paquetes de láminas con superficies casi lisas, morfología típica de las hidrotalcitas. Además se observan una mayor rugosidad y pequeñas partículas (~60 nm) distribuidas al interior de los bloques para la muestra Mg/Al(4)-MW, lo cual explica el que tenga una mayor área superficial.

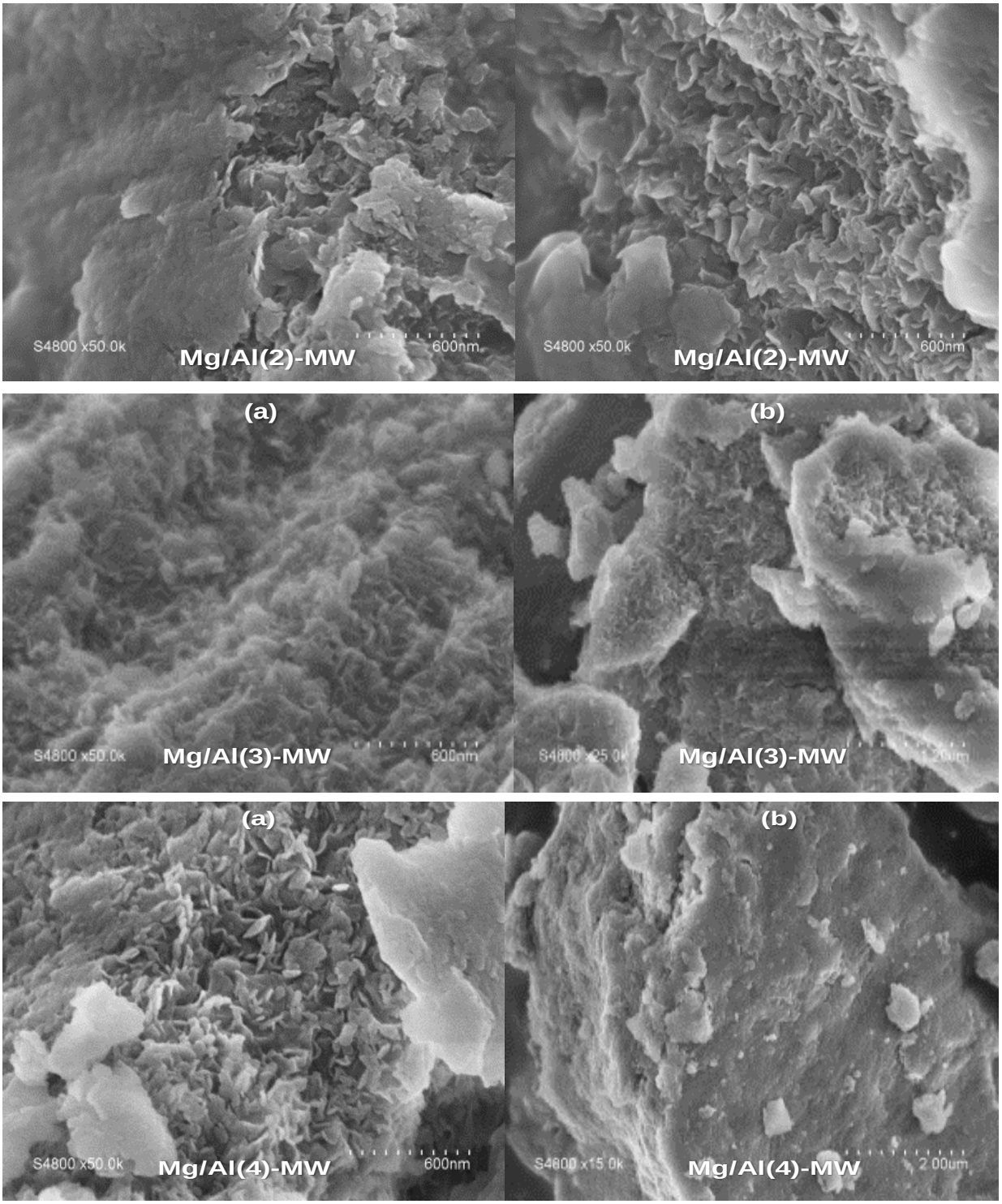


Figura 3.6. Micrografías de barrido de las muestras Mg/Al(2)-MW x50.0k (a) y (b); Mg/Al(3)-MW x50.0k (a) y x25.0k (b) y Mg/Al(4)-MW x50.0k (a) y x15.0k (b).

En las muestras de Ni/Al de relaciones metálicas molares 2 y 4, se observan pequeñas partículas, de 60 nm aproximadamente, formando aglomerados lo que se traduce en un incremento en el valor del área superficial específica. Para la muestra Ni/Al(3)-MW presenta una morfología muy similar a las de Mg/Al 2 y 3 y, por lo tanto el área superficial de la muestra Ni/Al = 3 es también similar a las de Mg/Al.

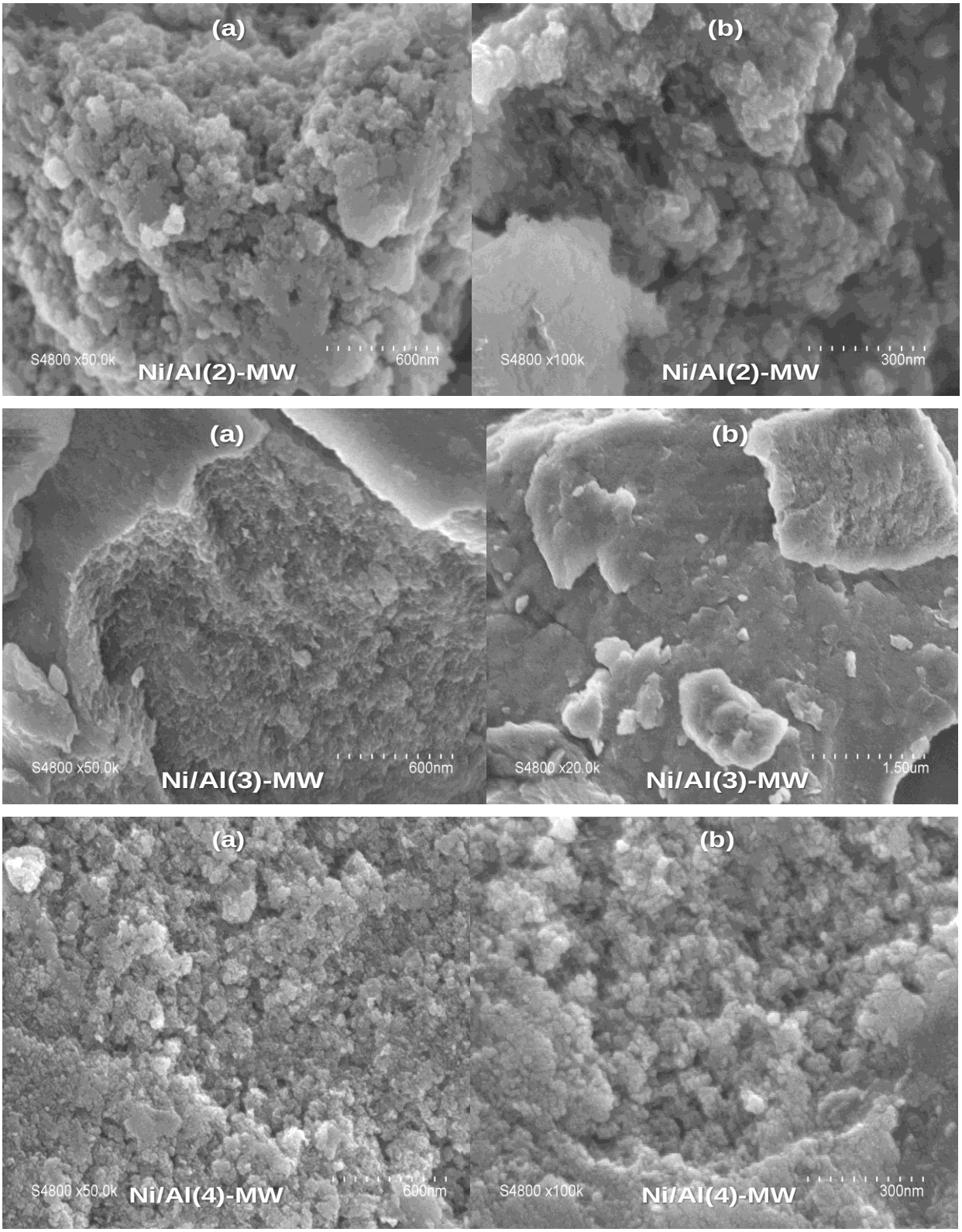


Figura 3.7. Micrografías electrónicas de barrido de las muestras Ni/Al(2)-MW x50.0k (a) y x25k (b); Ni/Al(3)-MW x50.0k (a) y x20.0k (b) y Ni/Al(4)-MW x50.0k (a) y x100.0k (b).

3.1.1.6 Comportamiento térmico

Las curvas correspondientes al análisis térmico gravimétrico de las muestras Mg/Al = 2, 3 y 4 son muy similares y se reportan en la Figura 3.8. Las curvas pueden dividirse en tres etapas: la primera (pérdida de masa de 13 %) de 25 a 240 °C corresponde a una pérdida de agua, la segunda 21 %) de 240 a 450 °C se atribuye a la descomposición de hidroxilos, nitratos y carbonatos, la tercera etapa termina aproximadamente a 800 °C a una velocidad más lenta y se tiene una pérdida de masa de 10 % y corresponde al colapso progresivo de la estructura de la hidrotalcita (Cavani y col., 1991; Ishiwatari y col., 1995; Aramendía y col., 1999). La pérdida de agua parece ser independiente de la relación molar Mg/Al de acuerdo, dentro del margen de error, con el análisis elemental en donde la cantidad de H fue de aproximadamente 3.6 mol/100 g de hidrotalcita. Esas moléculas de agua están unidas por puentes de hidrógeno a los iones Mg y por lo tanto no se eliminan a bajas temperaturas.

En los termogramas correspondientes a las muestras de Ni/Al, Figura 3.8, la primer etapa, debida a la pérdida de agua corresponde a 20, 17.5 y 17.5 %, relaciones molares de 2, 3 y 4, respectivamente. En este caso, la cantidad de pérdida de agua reproduce los resultados obtenidos para la cantidad de hidrógeno determinada por análisis elemental. En la segunda etapa, de 200 a 350 °C, atribuida a la descomposición de los hidroxilos, nitratos y carbonatos, la pérdida de peso es de 16 % para todas las muestras de Ni/Al. De 350 a 800 °C, las muestras Ni/Al(2)-MW y Ni/Al(3)-MW pierden el 8 % mientras que la muestra Ni/Al(4)-MW sólo pierde el 6 %, Tabla 3.2. La pérdida de masa es independiente de la relación molar en cada grupo de muestras. Las muestras de Mg/Al contienen agua menos débilmente unida (13 %) que aquellas constituidas por Ni y Al (17.5-20 %). Por el contrario, la cantidad de iones nitratos y carbonatos es mayor (5 %) en las muestras de Mg/Al. Por lo tanto, las muestras de Ni/Al están más hidratadas ya que contienen menos aniones de compensación aunque el número de cargas a ser compensadas es la misma en ambas series.

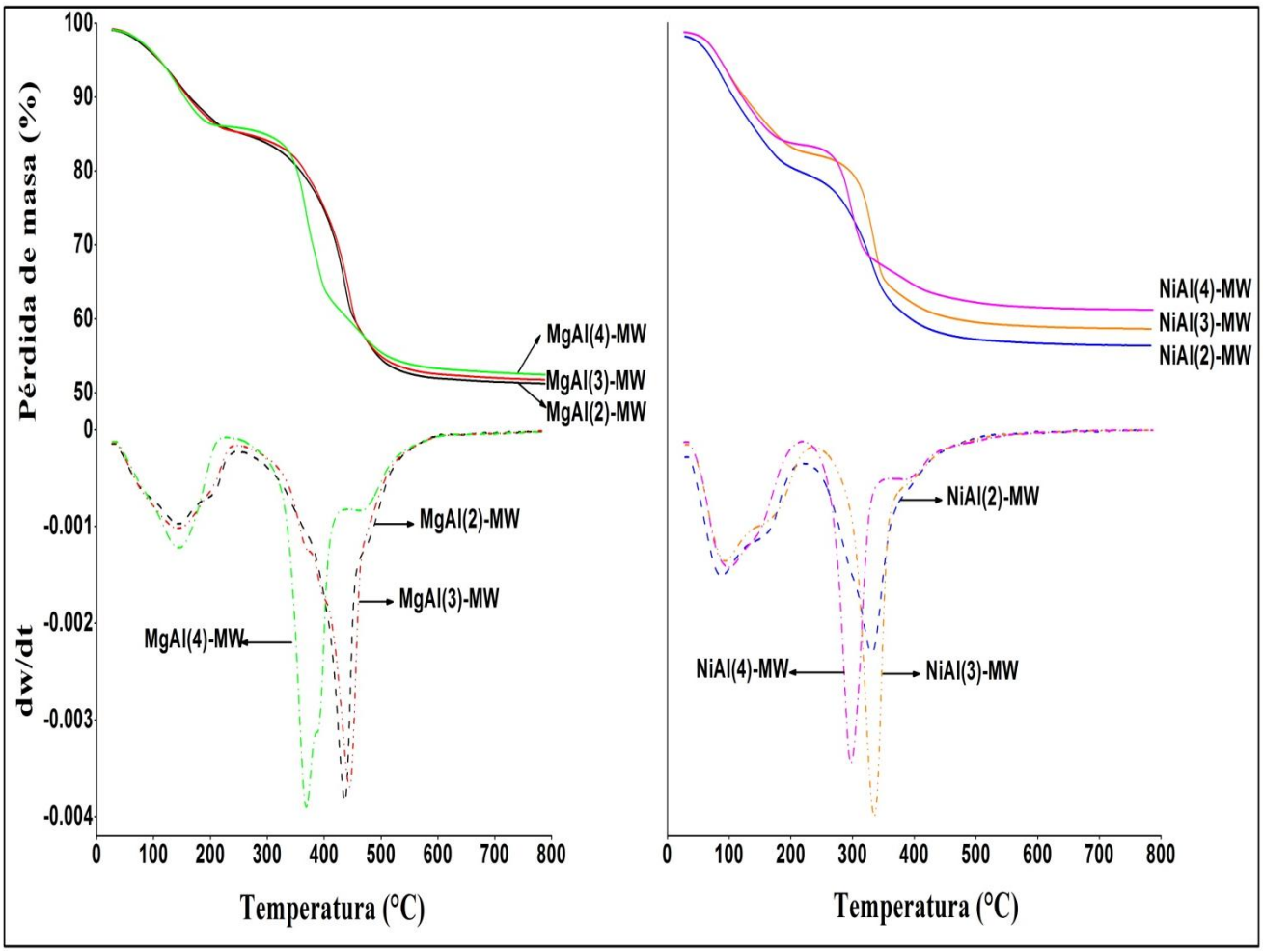


Figura 3.8. Análisis termogravimétricos de las hidrotalcitas de Mg/Al y Ni/Al de diferentes relaciones molares sintetizadas con irradiación de microondas.

Tales diferencias pueden explicarse en términos de basicidad (Sampieri y col., 2007). Las hidrotalcitas de Ni/Al comparadas con las de Mg/Al son conocidas por presentar un menor carácter básico. Por lo tanto, en las hidrotalcitas nitradas de Mg/Al los enlaces entre los aniones de compensación y las láminas de la arcilla son más fuertes. Por lo tanto, en las muestras de Ni/Al, la sustitución de los nitratos por carbonatos puede lograrse fácilmente y no en las muestras de Mg/Al. Los aniones carbonato compensan dos cargas mientras que los nitratos sólo una, el número de nitratos por gramo de hidrotalcita de Mg/Al debe, entonces, ser un tanto mayor que en

las muestras de Ni/Al. Como los iones nitrato y carbonato tienen un peso molecular muy similar, la pérdida de masa en las hidrotalcitas de Mg/Al es más grande.

Tabla 3.2. Pérdida de masa de las muestras de Mg/Al y Ni/Al.

Muestra	**Pérdida de agua ΔT(°C) y pérdida de masa (%)**	**Deshidroxilación, descomposición de nitratos y carbonatos ΔT(°C) y pérdida de masa (%)**	**Colapso de la estructura ΔT(°C) y pérdida de masa (%)**
Mg/Al(2)-MW	25-200 13.0	200-480 21.0	480-800 10.0
Mg/Al(3)-MW	25-200 13.0	200-480 21.0	480-800 10.0
Mg/Al(4)-MW	25-200 13.0	200-480 21.0	480-800 10.0
Ni/Al(2)-MW	25-200 20.0	200-350 16.0	350-800 8.0
Ni/Al(3)-MW	25-200 17.5	200-350 16.0	350-800 8.0
Ni/Al(4)-MW	25-200 17.5	200-350 16.0	350-800 6.0

3.1.1.7 Comportamiento óptico

En la Figura 3.9 se muestran los espectros de absorción de las muestras Mg/Al y Ni/Al de diferentes relaciones metálicas molares (2, 3 o 4) obtenidos por reflectancia difusa de ultravioleta visible donde las bandas de absorción características de las especies Ni^{II} hexacoordinadas aparecen. Este es el número máximo de coordinación que puede tener el ion Ni^{II}. Estos compuestos presentan geometría octaédrica y presentan coloraciones verde o azul púrpura (Cotton y Wilkinson, 1986). Para este tipo de compuestos octaédricos se esperarían tres transiciones permitidas por las reglas de espín (Curtis y Curtis, 1965; Bailar y col., 1973; Sutton, 1975; Dalponte y col., 1984; Cotton y Wilkinson, 1986), Tabla 3.3. Además de las bandas mencionadas también aparecen otras dos bandas en la región UV-Vis debidas a transiciones prohibidas $^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^1E_g(D)$ y $^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^1T_{2g}(D)$ (Rosen y Busch, 1970).

Tabla 3.3. Transiciones permitidas de espín del ion Ni^{II}.

$^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{2g}(F)$	$^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{1g}(F)$	$^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{1g}(P)$
1200-900 nm	720-540 nm	500-330 nm

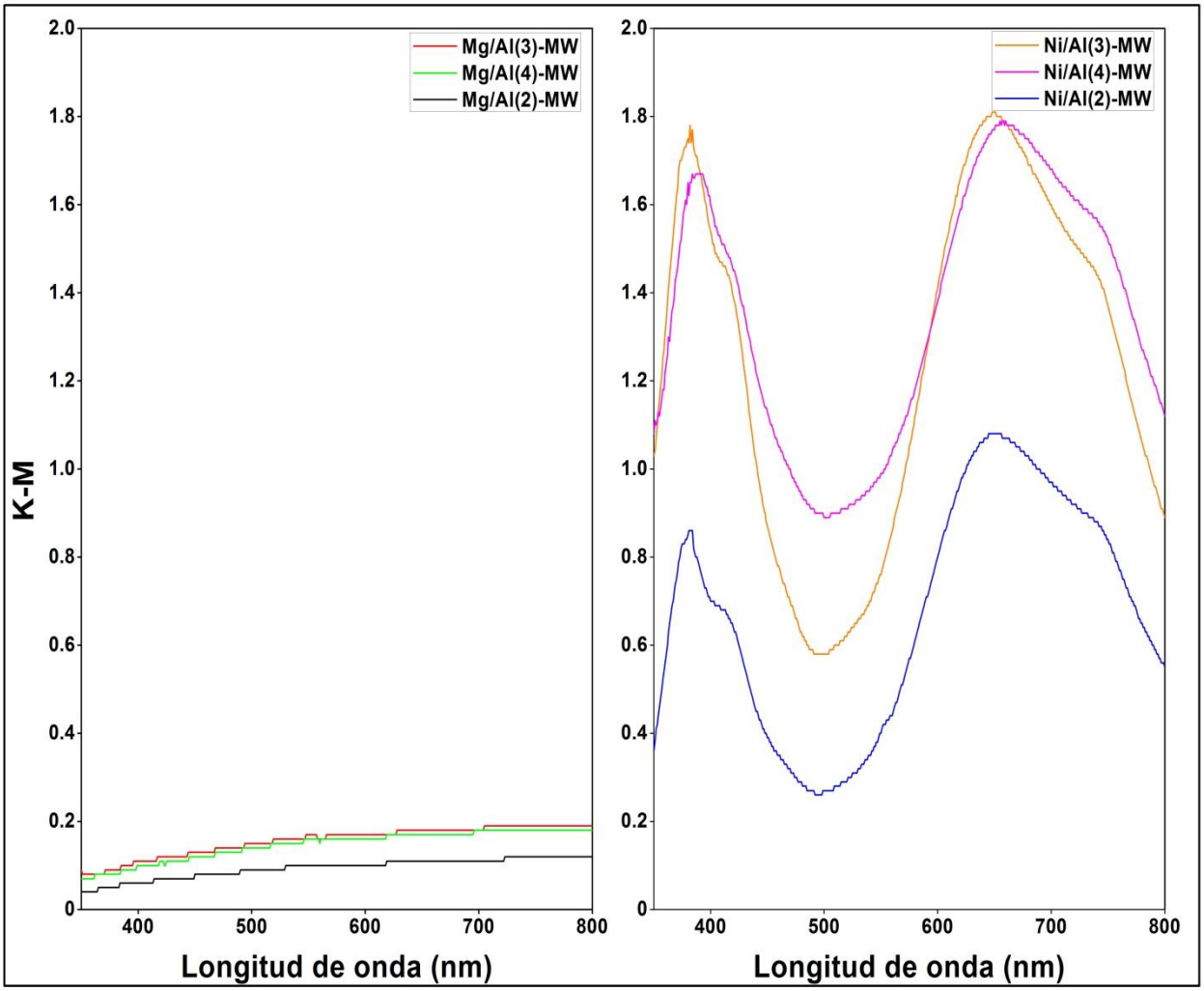


Figura 3.9. Espectros de absorción de las muestras de Mg/Al y Ni/Al de diferentes relaciones molares obtenidos por espectroscopia ultravioleta visible de reflectancia difusa.

De la Figura anterior, puede verse que para las muestras de Ni/Al se tiene un máximo de absorción a 650, 648 y 661 nm para las muestras 2, 3 y 4, respectivamente. Esta banda corresponde a la transición $^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{1g}(F)$. La transición $^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{1g}(P)$ origina una banda a 380, 382 y 390 nm. Estos resultados indican que la coordinación de los iones Ni^{II} debe ser hexaédrica confirmando que deben encontrarse en los sitios octaédricos de las láminas tipo brucita (Rives y Kannan, 2000). Para las muestras de Mg/Al no se observa ninguna banda de absorción en el rango de longitud de onda elegido. Ninguna muestra presenta fluorescencia, Figura 3.10. La banda observada a

772 nm aproximadamente podría corresponder mucho más a simple relajación por vibración o bien al harmónico de la excitación.

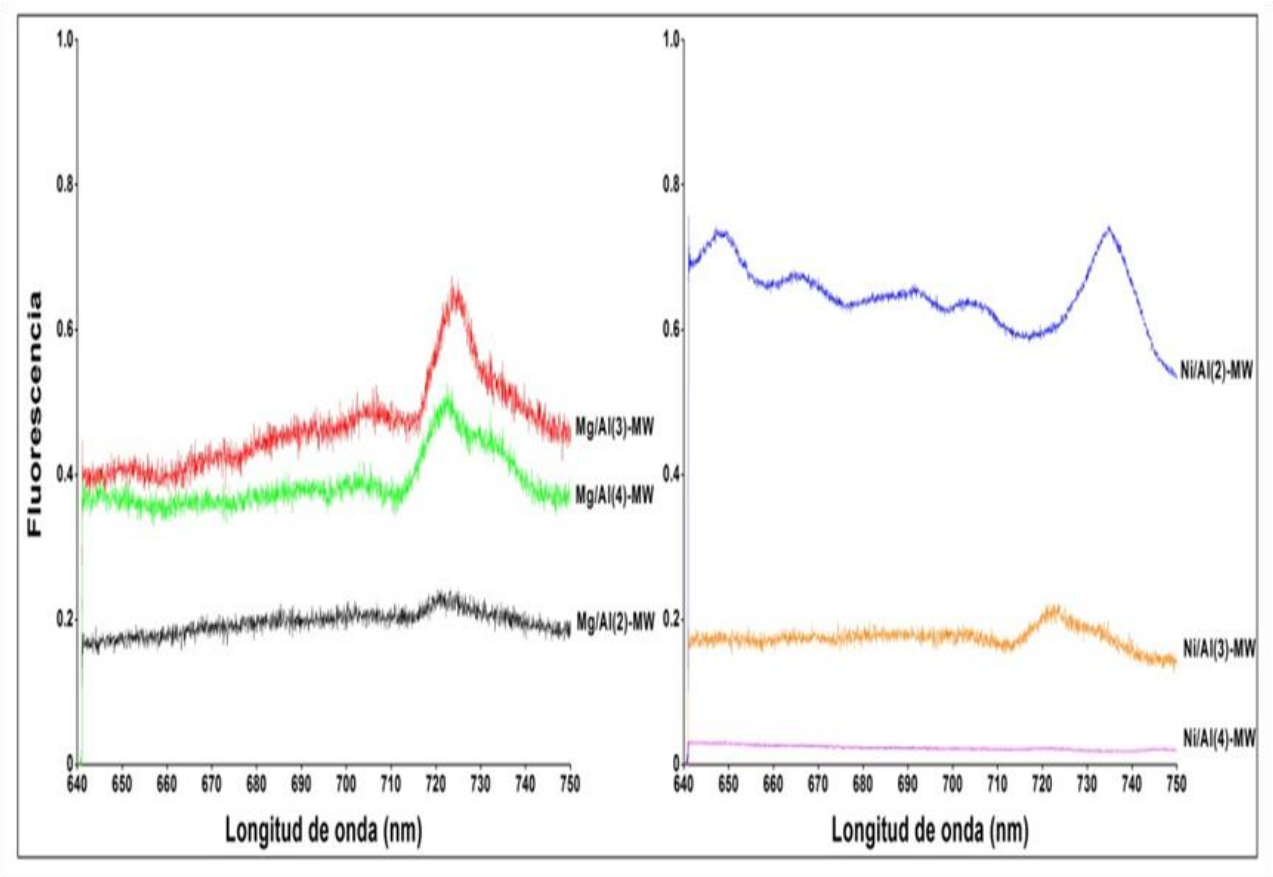


Figura 3.10. Espectros de emisión de fluorescencia de las muestras de Mg/Al y Ni/Al de diferentes relaciones molares.

3.1.2 Hidrotalcitas sintetizadas por coprecipitación utilizando el método convencional

La síntesis de materiales tipo hidrotalcita ha sido motivo de diversas monografias que han sido revisadas y en donde se puede consultar en detalle los métodos para su obtención (Reichle, 1986; Cavani y col., 1991). Se sintetizaron tres hidrotalcitas de diferente composición (Mg/Al, Ni/Al y Zn/Al) con una relación molar de 3. Las condiciones de síntesis se describieron en el capítulo dos.

3.1.2.1 Estructura

En la Figura 3.11 se muestran los difractogramas de rayos X de las muestras iniciales de diferente composición M^{II}/Al (M^{II} = Mg, Ni o Zn) y de relación metálica molar M^{II}/Al = 3 sintetizadas por el método convencional. Se puede observar que todas las muestras son cristalinas y que son hidrotalcitas (JCPDS 41-1428). En comparación con las muestras correspondientes sintetizadas por irradiación con microondas como tratamiento hidrotérmico estas muestras presentan intensidades más grandes, probablemente debido a que este tipo de tratamiento produce hidrotalcitas con tamaños de partícula más grandes que los que se pueden obtener por microondas (Fetter y col., 2000; Fetter y Bosch, 2010). La posición de los picos no es la misma estando los de estas muestras más hacia la izquierda. Las distancias interlaminares obtenidas a partir de d_{003} son aproximadamente de 8.5 Å lo que indica que se tiene la presencia de nitratos como aniones de compensación en la región interlaminar (Cavani y col., 1991; Rives y Ulibarri, 1999). En general puede decirse que las diferencias son muy pocas a excepción de la muestra de zinc. La muestra Zn/Al sigue presentando contaminación por óxidos (JCPDS 12-0627), pero la fase que predomina es la hidrotalcita.

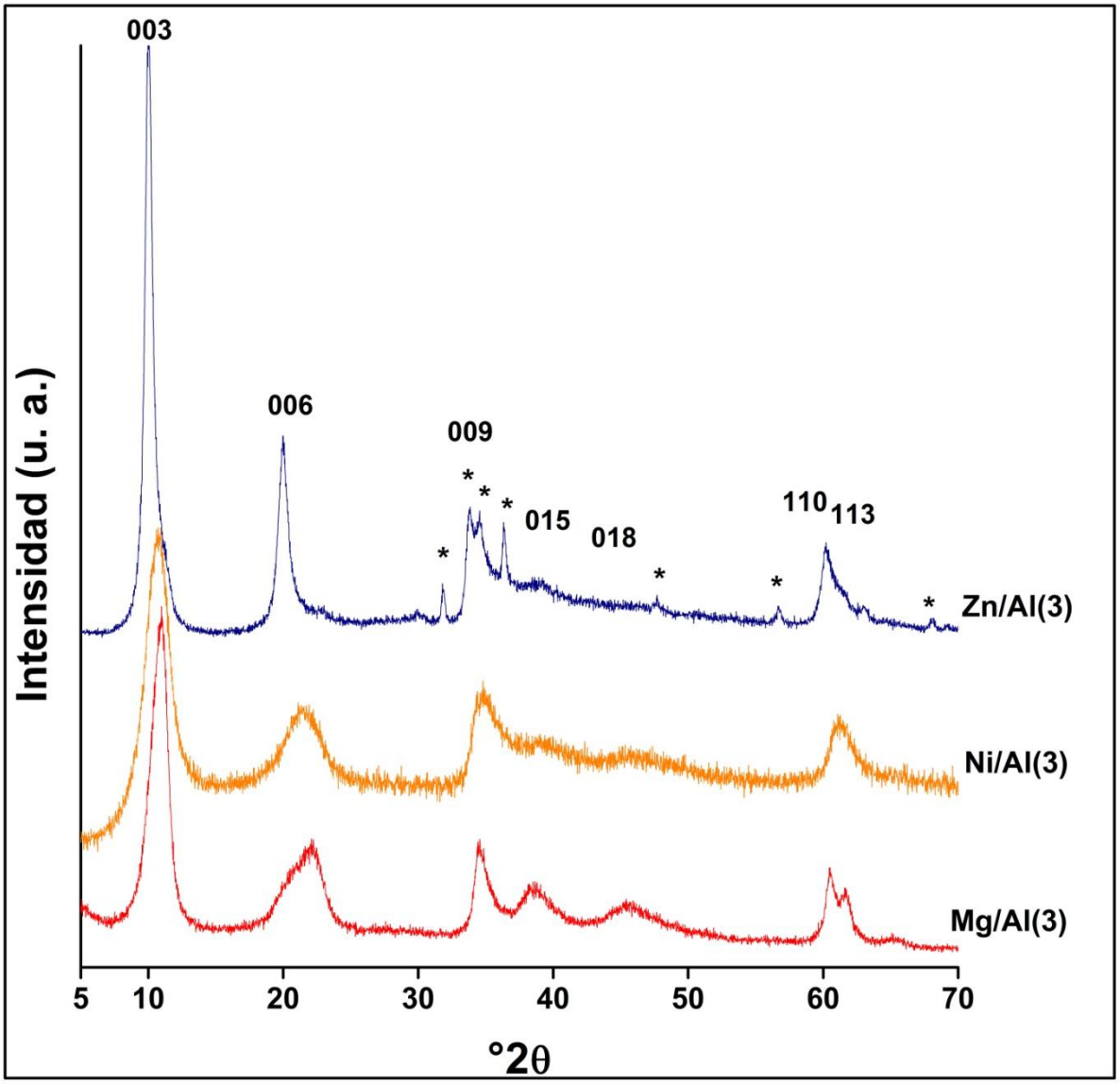


Figura 3.11. Difractogramas de rayos X de las muestras Mg/Al(3), Ni/Al(3) y Zn/Al(3). * ZnO.

3.1.2.2 Comportamiento óptico

Los espectros de absorción obtenidos por espectroscopia ultravioleta visible de reflectancia difusa de las muestras Mg/Al(3), Ni/Al(3) y Zn/Al(3) se muestran en la Figura 3.12.

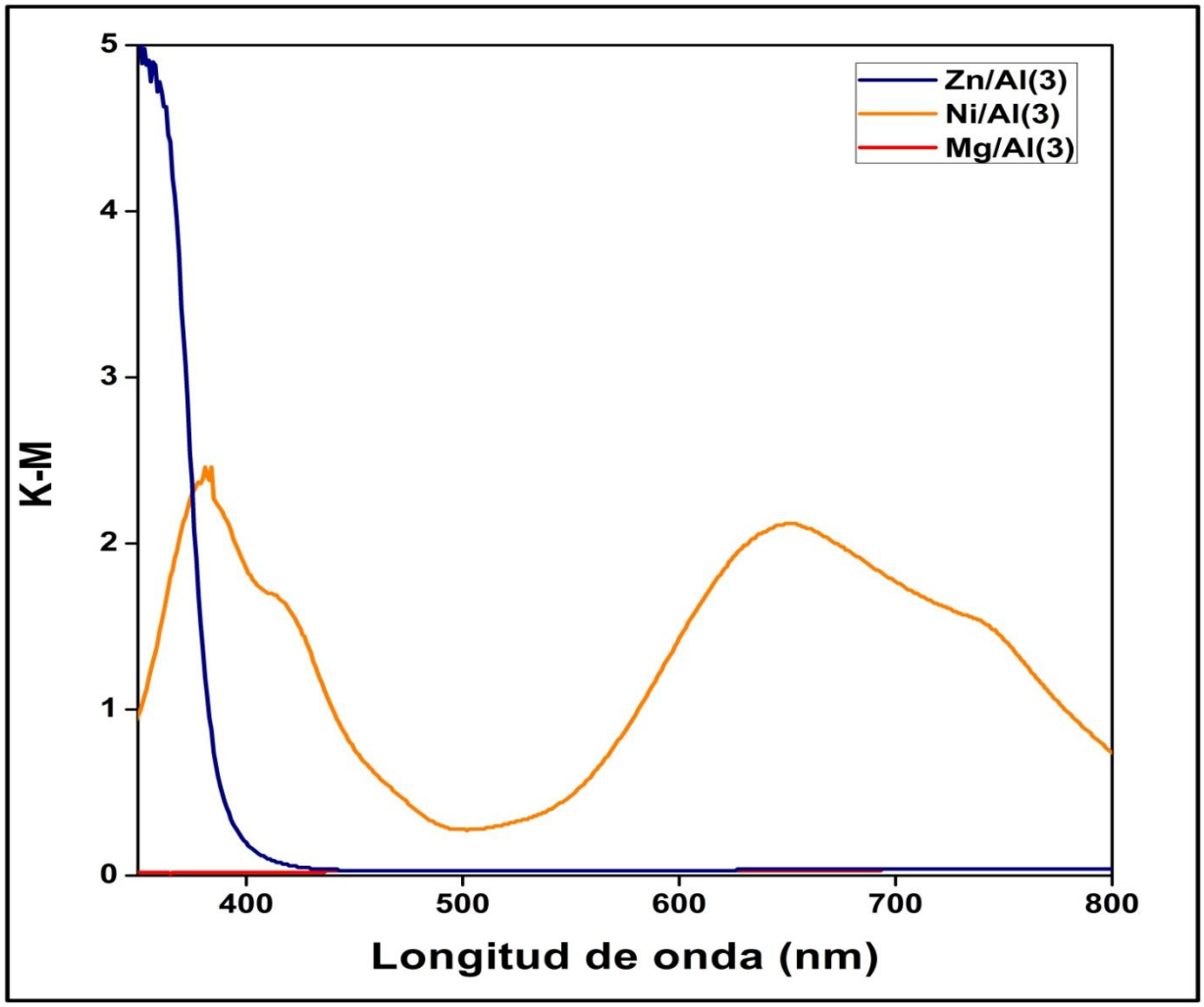


Figura 3.12. Espectros de absorción de las muestras Mg/Al(3), Ni/Al(3) y Zn/Al(3) obtenidos por espectroscopia ultravioleta visible de reflectancia difusa.

Se puede observar que las muestras de Ni/Al y Zn/Al presentan absorción mientras que la muestra de Mg/Al no presenta ninguna absorción en la región de 800 a 350 nm que fue el rango seleccionado para hacer la medición. Al igual que la muestra

correspondiente sintetizada con microondas, los máximos de absorción para Ni/Al se mantienen a las mismas longitudes de onda $^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{1g}(F)$ en 648 nm. La transición $^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{1g}(P)$ origina una banda en 382 nm. Sin embargo, se nota una mayor absorción en la muestra tratada hidrotérmicamente por el método convencional siendo resultado del tamaño de partícula. La muestra de Zn/Al puede absorber fuertemente en la región de 250 a 400 nm. Ninguna muestra presenta fluorescencia, Figura 3.13. La banda observada a 772 nm aproximadamente podría corresponder mucho más a simple relajación por vibración o bien al harmónico de la excitación.

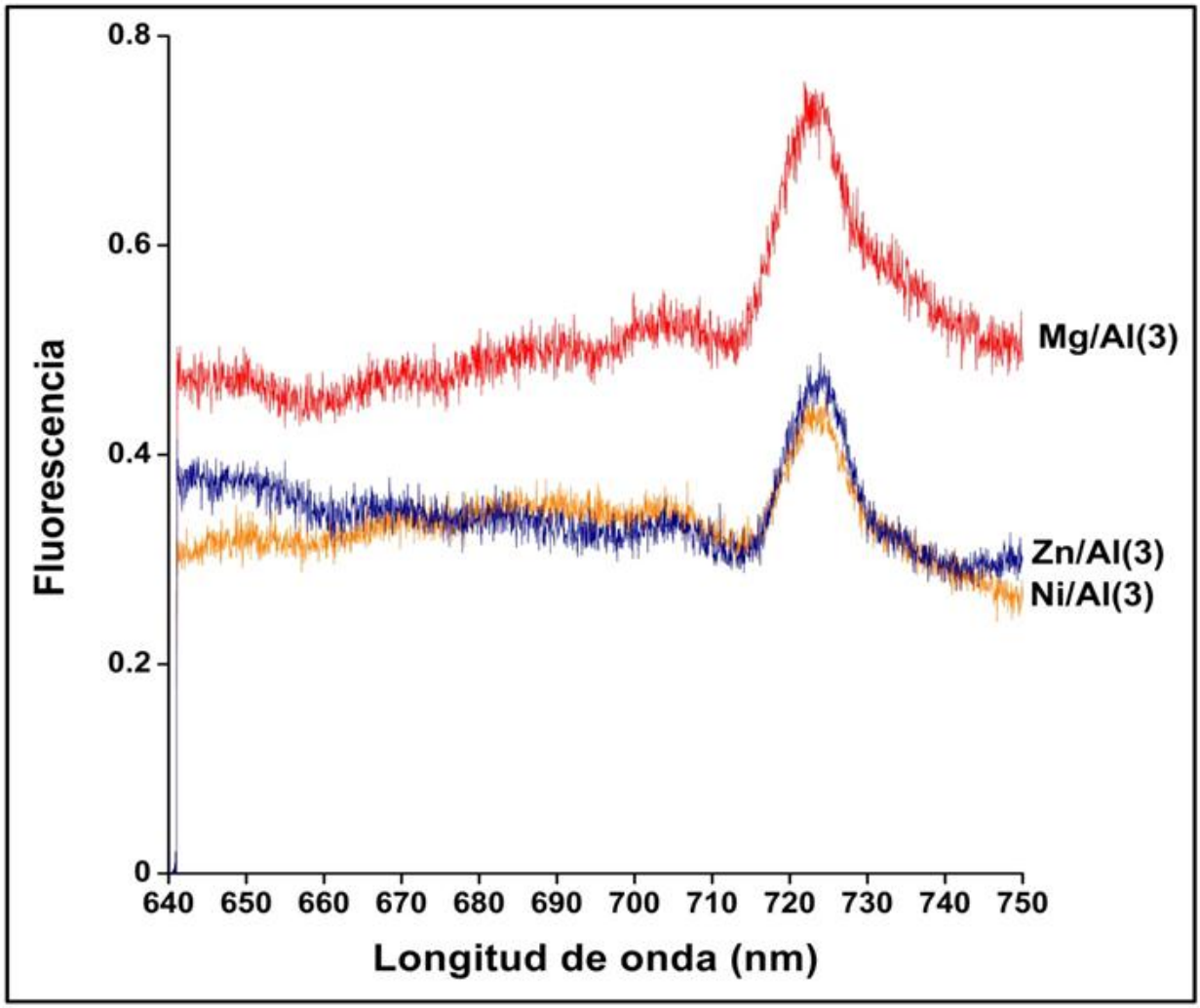


Figura 3.13. Espectros de emisión de fluorescencia de las muestras Mg/Al(3), Ni/Al(3) y Zn/Al(3).

3.2 Híbridos clorofilina-hidrotalcita

3.2.1. Estructura

Los difractogramas de las muestras R-OHMW, R-MW, ROH-CV, R-CV, B-OHCV, B-OHCV, B-OHMW, S-OHMW se comparan en la Figura 3.14.

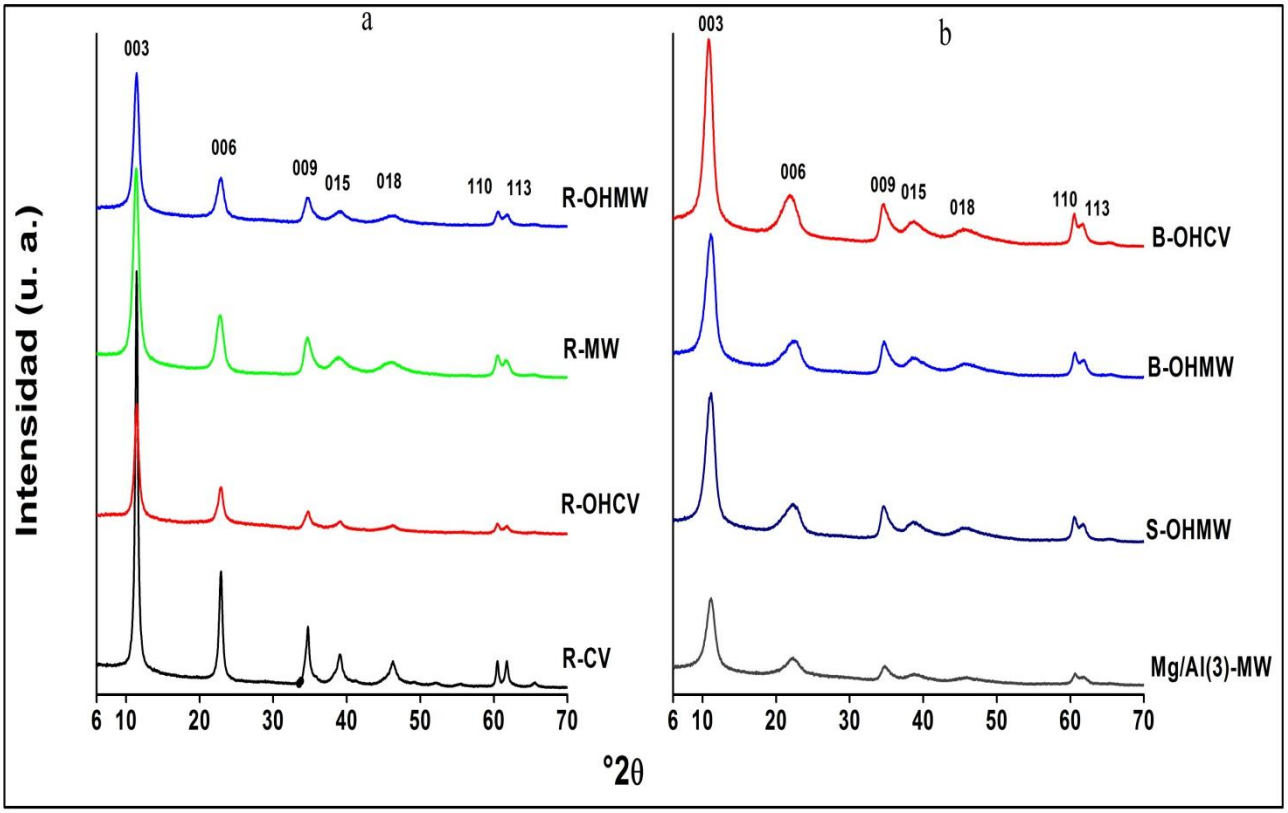


Figura 3.14. Patrones de difracción de rayos X de los híbridos clorofilina-hidrotalcita (a) sintetizadas por efecto memoria y (b) por el método de coprecipitación simultánea. Para comparación también se presenta el difractograma de la muestra inicial Mg/Al(3)-MW.

La distancia interlaminar para los híbridos sintetizados por regeneración es d_{003} = 7.7 Å. Para las muestras sintetizadas por coprecipitación simultánea se obtiene una distancia d_{003} = 8.1 Å. Cuando d_{003} = 7.7 Å, el espacio interlaminar es igual a 2.9 Å considerando un espesor de lámina de 4.8 Å. Este valor corresponde a hidrotalcitas que contienen carbonatos en la región interlaminar cuyo tamaño es aproximadamente 3.0 Å. Además se considera que la clorofilina está intercalada de forma paralela a las láminas

de la hidrotalcita ya que el tamaño molecular estimado por las distancias de enlace de la clorofilina es 2.7 Å x 7.1 Å x 10.3 Å.

Cuando la distancia d_{003} = 8.1 Å, el espacio interlaminar es igual a 3.3 Å, entonces el espacio interlaminar está determinado principalmente por nitratos y carbonatos. En este caso se considera nuevamente que la clorofilina está intercalada. Cabe mencionar que los híbridos resultantes son todos de color verde y en los difractogramas no se identifican otros compuestos cristalinos además de la hidrotalcita.

3.2.2 Composición química elemental

El contenido de cobre de las muestras regeneradas es de 12.1 x 10^{-4}, 2.39 x 10^{-4}, 2.30 x 10^{-4}, y 2.04 x 10^{-4} mol/g, muestras R-OHCV, R-CV, R-OHMW, y R-MW, respectivamente. El contenido de cobre revela la presencia de la clorofilina. El contenido de clorofilina de la muestra R-OHCV es casi seis veces más grande que en el resto, se retuvieron aproximadamente 2.4 x 10^{-4} mol/g. En la Tabla 3.4, puede comprobarse que la cantidad relativa de los sitios de intercambio debidos a la sustitución del magnesio por el aluminio varía entre 3.1 a 3.4, relación metálica molar Mg/Al. Estos valores experimentales son muy cercanos al valor nominal de 3 en las muestras irradiadas con microondas. En la muestra inicial Mg/Al(3)-MW las cantidades de nitrógeno (0.19 mol/g) y de carbón (0.07 mol/g), Tablas 3.1 y 3.4, se deben a la presencia de los aniones de compensación (nitratos y carbonatos). La cantidad de nitrógeno en las muestras que contienen clorofilina (de 0.02 a 0.09 mol/g) se atribuye al contenido de nitrógeno de la clorofilina la cual se espera que bloquee los sitios de intercambio de las láminas de la hidrotalcita. La composición elemental de las muestras R-OHMW y R-MW es similar sin embargo se observa que la presencia de los iones hidróxido promueven la retención de la clorofilina. En las muestras R-OHCV y R-CV, se observa lo mismo. Aunque, la irradiación con microondas favorece la difusión de iones más pequeños (carbonatos e hidroxilos) (Fetter y Bosch, 2010) inhibiendo la intercalación de la clorofilina.

Tabla 3.4. Comparación de la composición elemental de las muestras. Las cantidades de Mg, Al y Cu se determinaron por ICP-OES y el contenido de N, C e H por análisis elemental.

Muestra	Relación metálica molar Mg/Al	Relación metálica molar Cu/Al ($x10^{-4}$)	C mol/g	N mol/g
R-OHCV	3.4	36.4	0.23	0.02
R-CV	3.3	6.95	0.22	0.04
R-OHMW	3.2	6.99	0.18	0.07
R-MW	3.1	5.93	0.17	0.09
B-OHCV	3.1	23.9	0.12	0.21
B-OHMW	3.0	24.9	0.14	0.18
S-OHMW	3.0	23.6	0.13	0.19
Mg/Al(3)-MW	3.1		0.072	0.19

Cuando los promotores de la hidrotalcita (disoluciones acuosas de NaOH y nitratos de Mg y de Al) se añaden gota a gota a una disolución de clorofilina, o se mezclan simultáneamente gota a gota, el compuesto que resulta es una hidrotalcita (muestras B-OHCV, B-OHMW and S-OHMW) con una cantidad de nitrógeno de 0.21, 0.18, 0.19 mol/g, valores cercanos a 0.19 mol/g que es el valor encontrado en la muestra inicial (Mg/Al(3)-MW). De hecho una diferencia importante entre estas muestras y las muestras regeneradas es la presencia de nitratos en la mezcla de reacción. Por lo tanto no es sorprendente que los aniones intercalados sean en su mayoría nitratos. La clorofilina se retiene tanto en los sitios cargados de la periferia de las hidrotalcitas como en las bocas de los poros. El valor de la relación metálica molar Cu/Al está comprendido entre 23.6 x 10^{-4} and 24.9 x 10^{-4}, Tabla 3.4. Como los nitratos son iones pequeños y de gran movilidad pueden competir ventajosamente con la

clorofilina y ocupar la mayoría de los sitios internos de intercambio. El contenido de nitrógeno y carbono de la muestra sintetizada por coprecipitación simultánea en presencia de microondas, S-OHMW, se encuentra entre el de las muestras B-OHCV y B-OHMW. Cabe mencionar que el contenido de nitrógeno de las muestras R-OHCV y B-OHCV difiere notoriamente, siendo 0.02 g/mol para R-OHCV y 0.21 g/mol para B-OHCV, por lo que la primera muestra ha incorporado a la clorofilina entre las láminas para compensar las cargas y la segunda tiene clorofilina distribuida en la periferia de la hidrotalcita.

3.2.3 Especies

En el espectro de infrarrojo de la clorofilina, Figura 3.15, las bandas a 2800-3450 cm^{-1} y 1350-1450 cm^{-1} se atribuyen a las bandas de vibración de grupos CH_2-CH_2. Las bandas que aparecen a 1500-1700 cm^{-1} se deben a los grupos C=N-C. Las bandas más pequeñas y anchas a 1650-1750 cm^{-1} revelan la presencia de los radicales éster (H-CO-O-R) (Pretsch, 2000).

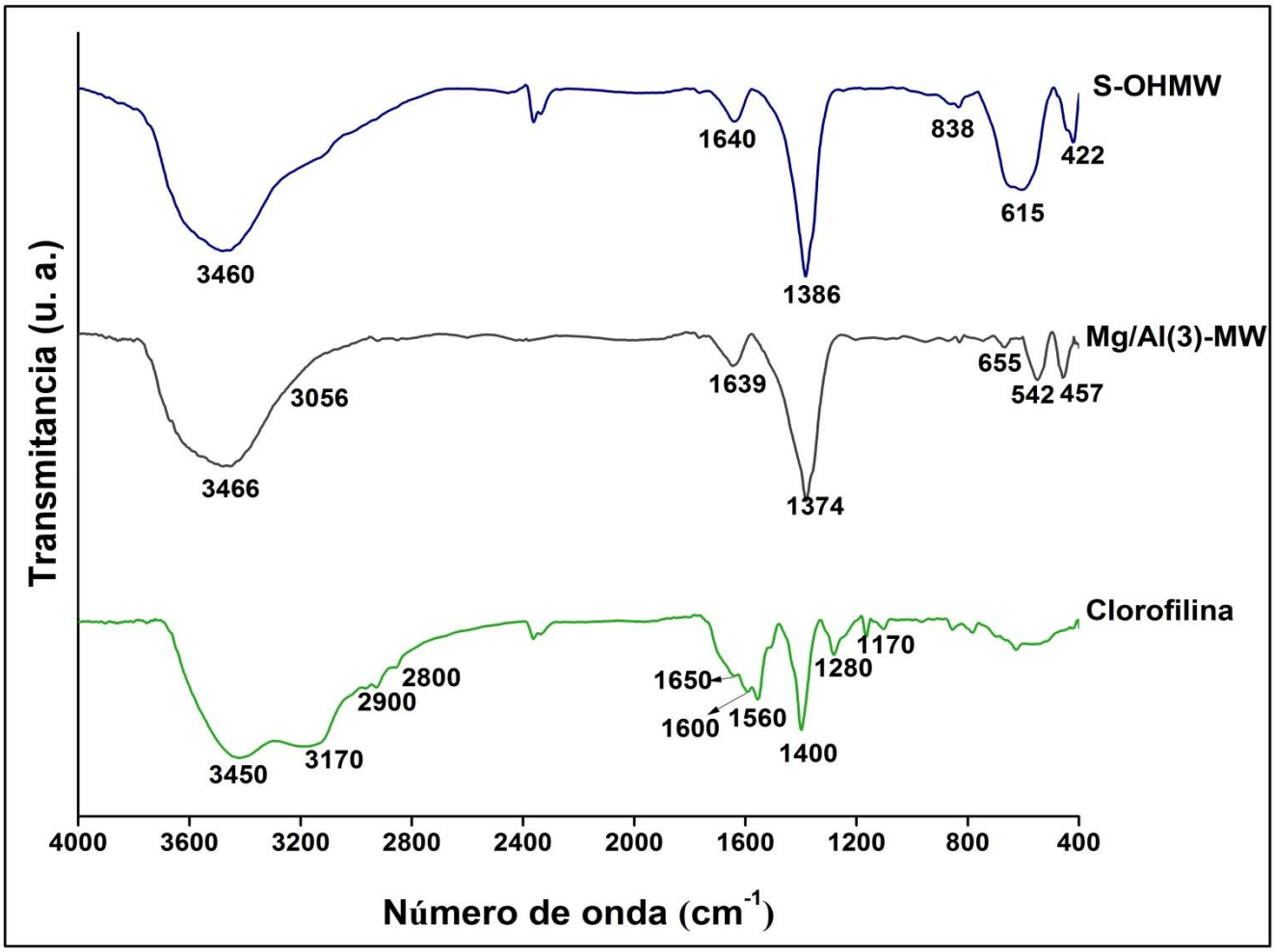


Figura 3.15. Espectros de infrarrojo de la clorofilina, de la muestra inicial Mg/Al(3)-MW y de la muestra S-OHMW.

Los espectros de la muestra inicial y de las muestras que contienen clorofilina son muy similares por lo que sólo se muestra el espectro de la muestra S-OHMW en la Figura 3.15. Debido a que las bandas de la clorofilina se traslapan con las bandas de la hidrotalcita sin clorofilina (muestra inicial) no es posible determinar con certeza la presencia de la clorofilina por espectroscopia IR. Sin embargo se confirma la intercalación parcial de los nitratos y carbonatos en la región interlaminar (~1380 cm^{-1}).

3.2.4 Textura

Las isotermas de todas las muestras son del tipo IV según la clasificación IUPAC, Figura 3.16. Las muestras R-OHCV y R-CV presentan perfiles de histéresis del tipo H1 (IUPAC) característicos de materiales con poros tubulares o empaquetamientos de esferas uniformes dispuestos de forma regular. La distribución de mesoporos es estrecha y uniforme como ya se había dicho y es típica de los materiales laminares (Gregg y Sing, 1982; Valencia y col., 2003; Gil y col., 2008). La distribución de tamaño de poro presenta un pico en 30 Å y un segundo pico en 95 Å en la muestra R-OHCV y 50 Å en la muestra R-CV, Figura 3.17. Las áreas superficiales correspondientes son 76 y 61 m^2/g. La distribución de tamaño de poro de la muestra inicial también tiene un máximo en 30 Å y esta muestra tiene un lazo de histéresis tipo H3, Tabla 3.5.

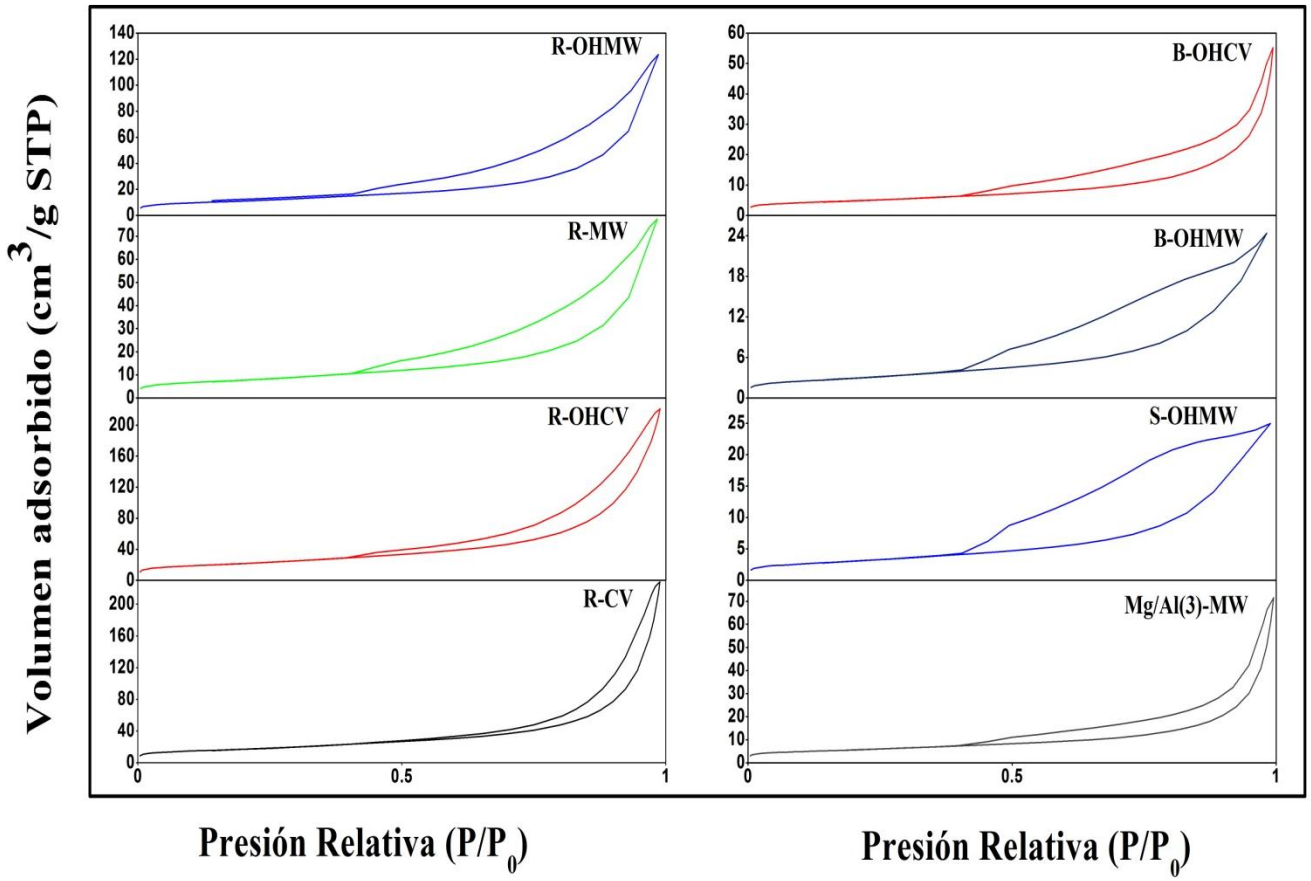


Figura 3.16. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno de los híbridos clorofilina-hidrotalcita.

En cambio, las muestras regeneradas en presencia de microondas (R-OHMW y R-MW) presentan lazos de histéresis tipo H3, típicos de poros tipo rendija presentes en materiales laminares (Rouquerol y col., 1999). La distribución de tamaño de poro de la muestra R-OHMW presenta dos picos, uno a 30 Å y el otro a 60 Å, mientras que la distribución de tamaño de poro para la muestra R-MW tiene un pico a 30 Å y un pico muy ancho desde 50 hasta 300 Å. Tal comportamiento, en esta última muestra, tiene que interpretarse como si fuera un material estructurado en forma de castillo de naipes. Las áreas superficiales correspondientes son 39 y 27 m^2/g. La adición de hidróxido durante el proceso de regeneración promueve un incremento en el área superficial de 20 a 30 %.

La muestra B-OHCV tiene poros que se asocian con materiales porosos que tienen una distribución muy estrecha de poros, relativamente uniforme, dado que presentan un lazo de histéresis tipo H1. En cambio, los poros de las otras dos muestras son poros en tipo rendija (lazo de histéresis tipo H3). La distribución de tamaño de poro en estas tres muestras es similar teniendo un máximo entre 30 y 50 Å, pero en las muestras S-OHMW y B-OHMW las distribuciones presentan picos muy anchos. Las áreas específicas son 17 m^2/g (B-OHCV), 10 m^2/g (B-OHMW) y 11 m^2/g (S-OHMW). La irradiación con microondas produce materiales con un área específica pequeña y un intenso color verde.

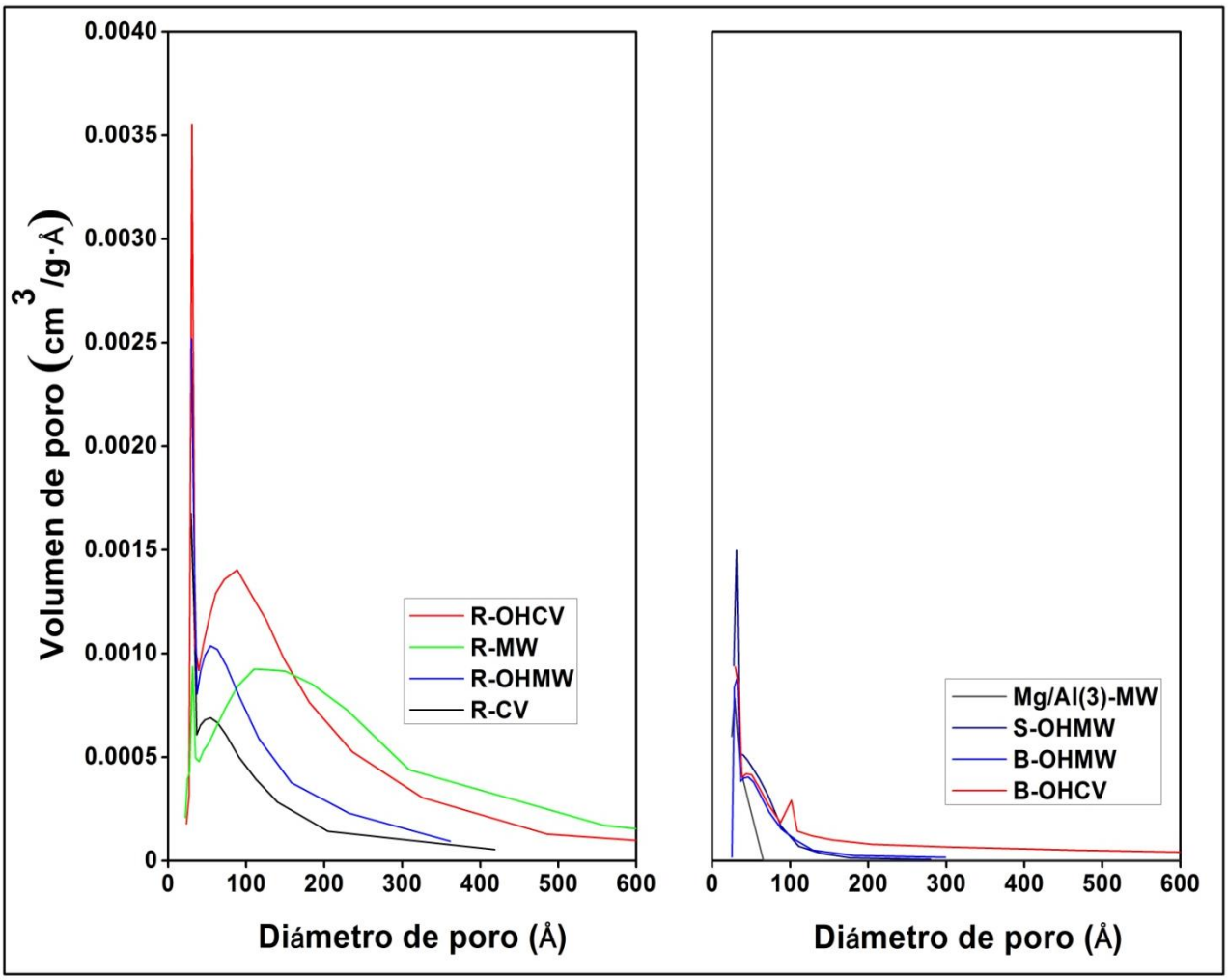


Figura 3.17. Distribución de tamaño de poro de los híbridos clorofilina-hidrotalcita.

3.2.1.5 Comportamiento térmico

Las curvas obtenidas por análisis termogravimétrico de las muestras R-OHCV y R-CV son similares, Figura 3.18. Las curvas pueden dividirse en tres etapas: la primera (pérdida de peso 14 %) desde 25 hasta 240 °C que corresponde a la pérdida de agua (Cavani y col., 1991; Sampieri y col., 2007); la segunda (25 %) de 240 a 450 °C puede atribuirse a la descomposición de los carbonatos y de la clorofilina (Ishiwatari y col., 1995; Farag y col., 2012), la tercera etapa termina en 800 °C con una velocidad más lenta (pérdida de peso 4 %). Las muestras R-MW y R-OHMW son nuevamente similares, las únicas diferencias de las anteriores son que durante la primera etapa se

tiene una pérdida de peso de solamente 9 % y que la segunda etapa comienza a 220 °C y termina en 400 °C.

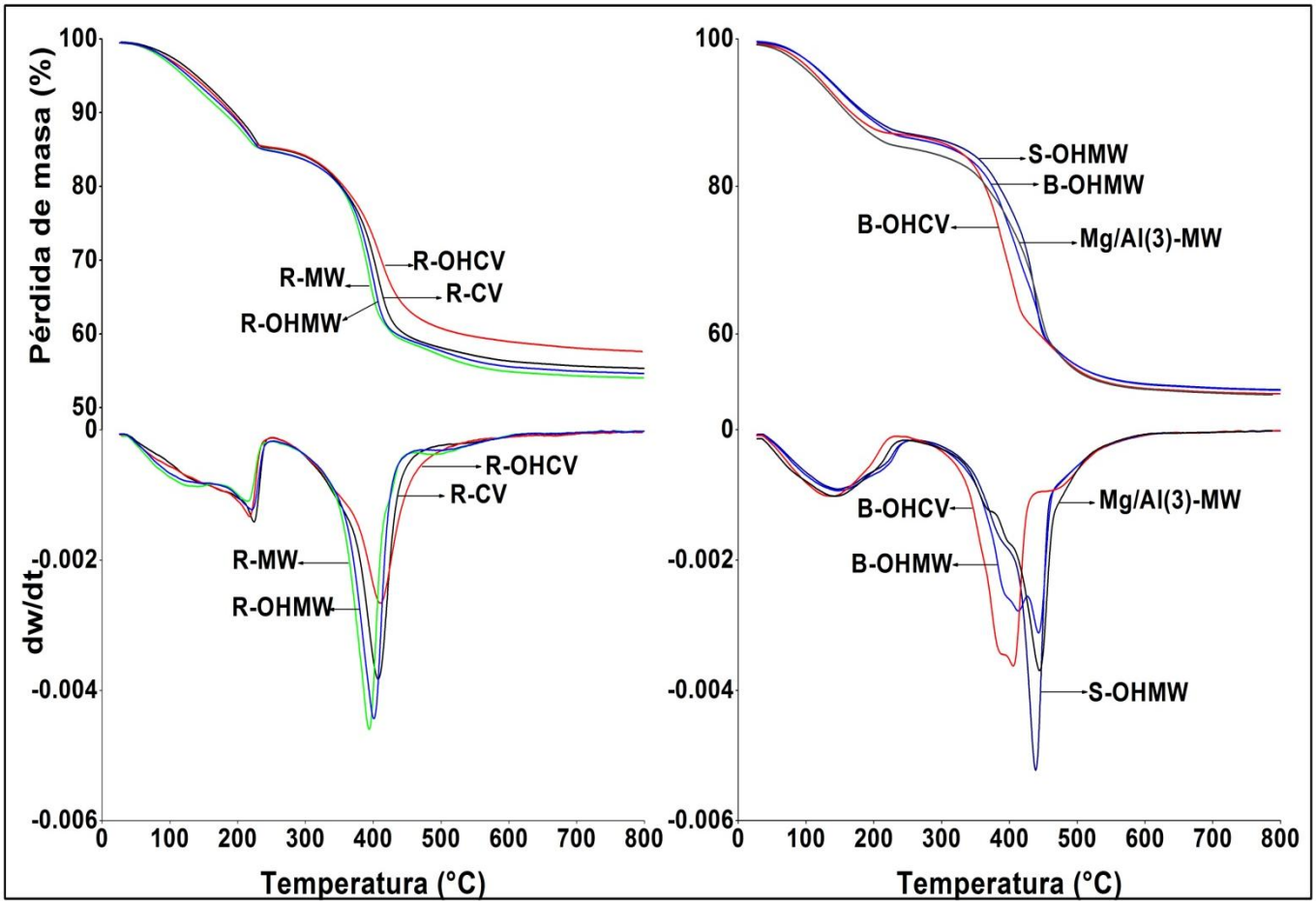


Figura 3.18. Curvas ATG/ATD de los híbridos clorofilina-hidrotalcita y de la muestra Mg/Al(3)-MW.

Cuando se compara el comportamiento térmico de las muestras B-OHCV, B-OHMW y S-OHMW en la primera etapa (de 25 a 140 °C), la pérdida de peso es de 25 %, pero el pico ancho (ATD) centrado a 390 °C y 384 °C, muestras B-OHCV y B-OHMW, respectivamente puede distinguirse ahora. Un segundo a 410 °C y 406 °C, muestras B-OHCV y B-OHMW, respectivamente y un tercero a 440 °C, muestra B-OHMW cuyas intensidades relativas son variables. Estas diferencias pueden atribuirse a la interacción soporte-clorofilina. La eliminación de agua, nitratos y carbonatos son procesos endotérmicos claramente observables en los termogramas, Figs. 3.8 y 3.18.

En cambio, la clorofilina presenta dos picos endotérmicos alrededor de 170 °C y 280 °C, seguido de un pico exotérmico alrededor de 440 °C, los cuales corresponden, respectivamente a la evaporación de agua, a la eliminación del cobre de la estructura de la clorofilina y a la degradación de la estructura de la clorofilina (Thanpitcha, 2008). Las curvas de ATD deben ser una composición de ambos procesos, Figura 3.18.

Tabla 3.5. Características principales de los híbridos. A título comparativo se incluyen los valores de la muestra inicial Mg/Al(3)-MW.

Muestra	d_{003} (Å)	Máximos en distribución de tamaño de poro (Å)	Forma de poro	Área específica (m^2/g)	Color verde	Comportamiento Térmico
R-OHCV	7.7	30, 95	tubular o tintero	76	Muy ligero	**Clorofilina estabilizada**
R-CV	7.7	30, 50	tubular o tintero	61	Muy ligero	**Clorofilina estabilizada**
R-OHMW	7.7	30, 60	rendija	39	Medio	**Clorofilina estabilizada**
R-MW	7.7	30, pico ancho 50-300	rendija	27	Medio	**Clorofilina estabilizada**
B-OHCV	8.1	30, 50	tubular o tintero	17	Ligero	**Eliminación de Cu a 410 °C**
B-OHMW	8.1	30, 50	rendija	10	Intenso	**Eliminación de Cu a 445 °C**
S-OHMW	8.1	30, 50	rendija	11	Intenso	**Eliminación de Cu a 440 °C**
Mg/Al(3)-MW	7.9	30, 50	rendija	20	Blanca	

3.2.1.6 Comportamiento óptico

Puede confirmarse la existencia de la clorofilina en los materiales híbridos por los espectros de absorción de ultravioleta visible de la Figura 3.19. Se comparan los espectros de la clorofilina pura y de los híbridos clorofilina-hidrotalcita. Todas las muestras reproducen las características de la clorofilina pura mostrando que la molécula se conserva en ellas. En las muestras regeneradas, la banda a 625 nm es más intensa, mientras que en las muestras obtenidas por coprecipitación simultánea esta banda se ve desvanecida. La reducción en absorbancia a 627 nm puede monitorear la pérdida de cobre de la estructura de clorofilina (Ferruzzi y Schwartz, 2005). Por lo tanto la clorofilina no se conserva tan bien en las muestras sintetizadas por coprecipitación simultánea como en las muestras preparadas por efecto memoria o regeneración.

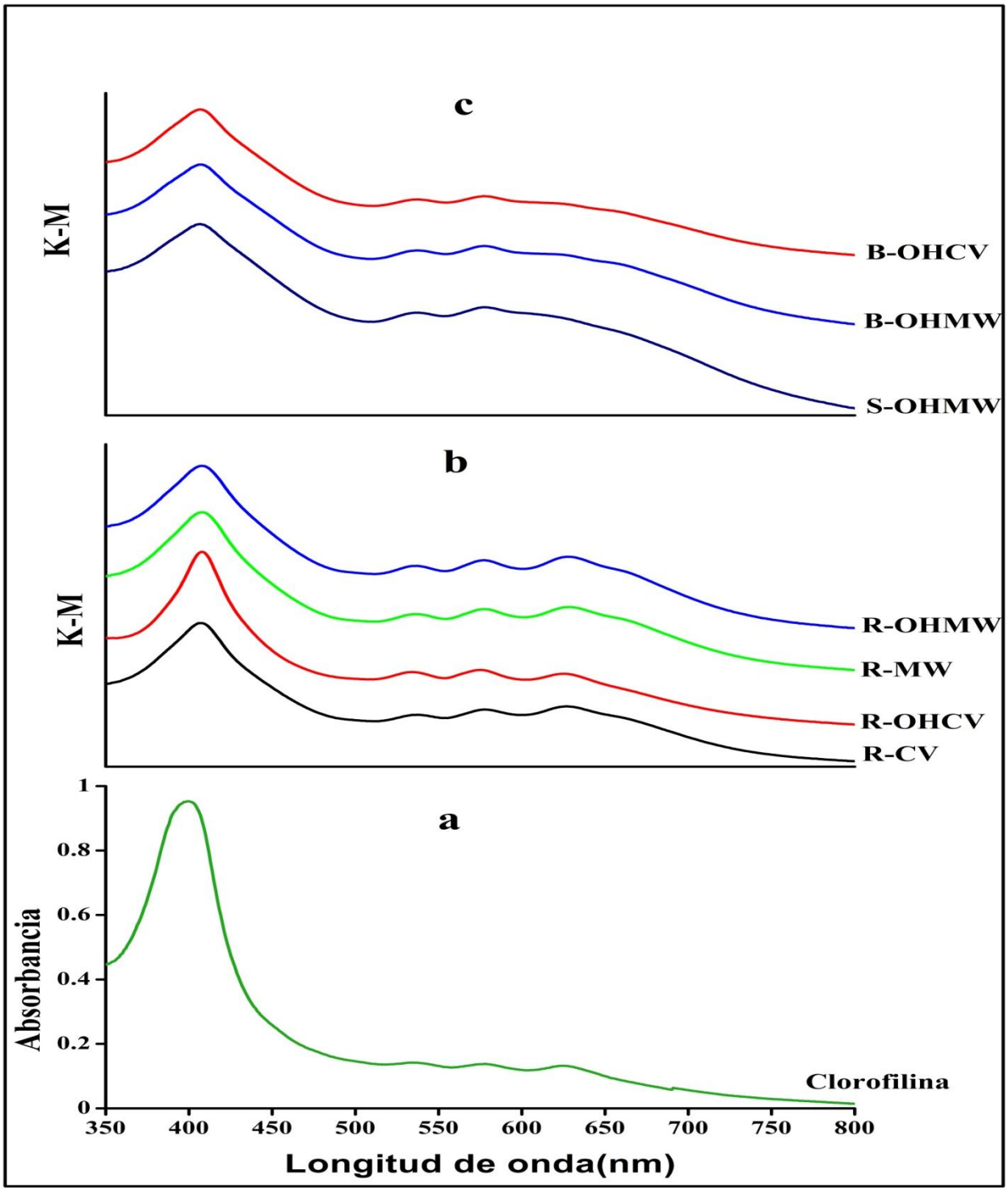


Figura 3.19. Espectros de absorción de UV-Vis a) clorofilina, b) híbridos preparados por efecto memoria y c) híbridos preparados por coprecipitación simultánea.

3.2.7 Discusión

En la muestra regenerada en presencia de NaOH el área superficial es de 76 m^2/g y tiene una distribución de tamaño de poro con máximos en 30 y 95 Å. En cambio, si no se utiliza NaOH el área es menor (61 m^2/g) y los máximos encontrados por la distribución de tamaño de poro son 30 y 50 Å. La clorofilina podría estar anclada en las muestras de una de las tres formas descritas a continuación. La clorofilina puede estar en la boca de los poros, puede estar en forma de pequeños aglomerados en la superficie externa de la hidrotalcita o puede estar intercalada entre las láminas. Si se encontrara en la boca de los poros, el área superficial sería muy pequeña, puesto que el N_2 no puede alcanzar el espacio interlaminar. La clorofilina no puede quedar retenida en la superficie externa formando cúmulos y aglomerados puesto que la clorofilina es un ion que no puede formar micelas. La síntesis por efecto memoria propicia la intercalación de la clorofilina entre las láminas de la hidrotalcita como lo demuestran la relación metálica molar Cu/Al, los patrones de difracción de rayos X y las curvas de análisis térmico. Esta propuesta está reforzada por el efecto del hidróxido ya que el área específica disminuye a 61 m^2/g (muestra R-CV comparada con R-OHCV) cuando no se utiliza NaOH. Los iones OH son centros de nucleación por lo que el número de núcleos de hidrotalcita aumenta significativamente al agregar NaOH. Las partículas de hidrotalcita obtenidas son entonces más pequeñas. Cuando estas muestras se preparan en presencia de microondas, muestras R-OHMW y R-MW, las áreas superficiales disminuyen drásticamente a 39 y 27 m^2/g, respectivamente. Nuevamente el efecto del NaOH es claro. La distancia interplanar obtenida por difracción de rayos X en ambas es 7.7 Å. Usualmente la irradiación con microondas incrementa el área superficial (Fetter y col, 2000; Benito y col., 2009). Bergadà y col., 2007a, reportan que una hidrotalcita cristalizada por microondas en un autoclave a 453 K 120 minutos muestra un área BET y una basicidad mucho mayores. Además, el tratamiento con microondas induce una mejor cristalización de las hidrotalcitas con propiedades térmicas diferentes (Benito y col., 2006b). En este caso, como la irradiación con microondas produce un calentamiento homogéneo entonces la clorofilina puede moverse y difundirse libremente mientras que cuando existen gradientes térmicos

(calentamiento convencional) las fuerzas entre la hidrotalcita y la clorofilina se debilitan de forma heterogénea evitando la difusión.

En las muestras regeneradas en presencia de microondas, la distribución de tamaño de poro presenta un pico ancho de 50 a 300 Å. Dicho comportamiento puede entenderse si la energía provista por la irradiación con microondas es excesiva y perturba el proceso de ordenamiento, la muestra se vuelve ahora más desordenada y forma poros inter-partícula en forma de tintero.

Una gran diferencia entre la muestra sintetizada por coprecipitación simultánea B-OHCV y las muestras correspondientes preparadas por efecto memoria es la distancia interplanar d_{003}, la cual en esta muestra tiene un valor de 8.1 Å. Tal diferencia se debe a la presencia de los nitratos en la mezcla de reacción. Los híbridos resultantes contienen carbonatos y nitratos entre las láminas. Estos aniones son los más comunes y los más afines a las hidrotalcitas. Cuando las muestras se irradian con microondas, ya sea mezclando los precursores de hidrotalcita y la clorofilina, adicionándolos gota a gota de manera simultánea, o adicionando gota a gota los precursores de hidrotalcita a la clorofilina, el color verde es más fuerte, la distancia interplanar d_{003} es 8.1 Å y el área superficial es 10-11 m^2/g. La relación Cu/Al muestra que la cantidad de clorofilina retenida es tan alta como en la muestra B-OHCV, pero bloquea totalmente el acceso del nitrógeno al espacio interlaminar.

Todas las muestras mantienen su color verde mostrando que la clorofilina no se oxida o descompone a temperatura ambiente. Este punto fue confirmado por espectroscopia ultravioleta visible. De hecho, la hidrotalcita es un sólido básico y cuenta con muchos grupos funcionales OH que pueden enlazarse o coordinarse con la clorofilina. La hidrotalcita actúa como un medio inmovilizador o medio de confinamiento similar a los encontrados en sistemas biológicos. Este híbrido clorofilina-hidrotalcita podría compararse con el híbrido preparado por Murata y col., 2001, en el que la clorofila ***a*** se estabiliza con sílica tratada con dioles. El presente método de estabilización es igual de eficiente, pero mucho más simple. Además ofrece la posibilidad de aislar y retener la clorofilina distribuyéndole de modo diferente en la hidrotalcita.

3.3 Clorofila *a*

3.3.1 Separación por cromatografía en capa fina

Puede verse en la Figura 3.20 que la separación de los pigmentos sobre todo de la clorofila ***a*** es independiente del método de extracción (Capítulo 2).

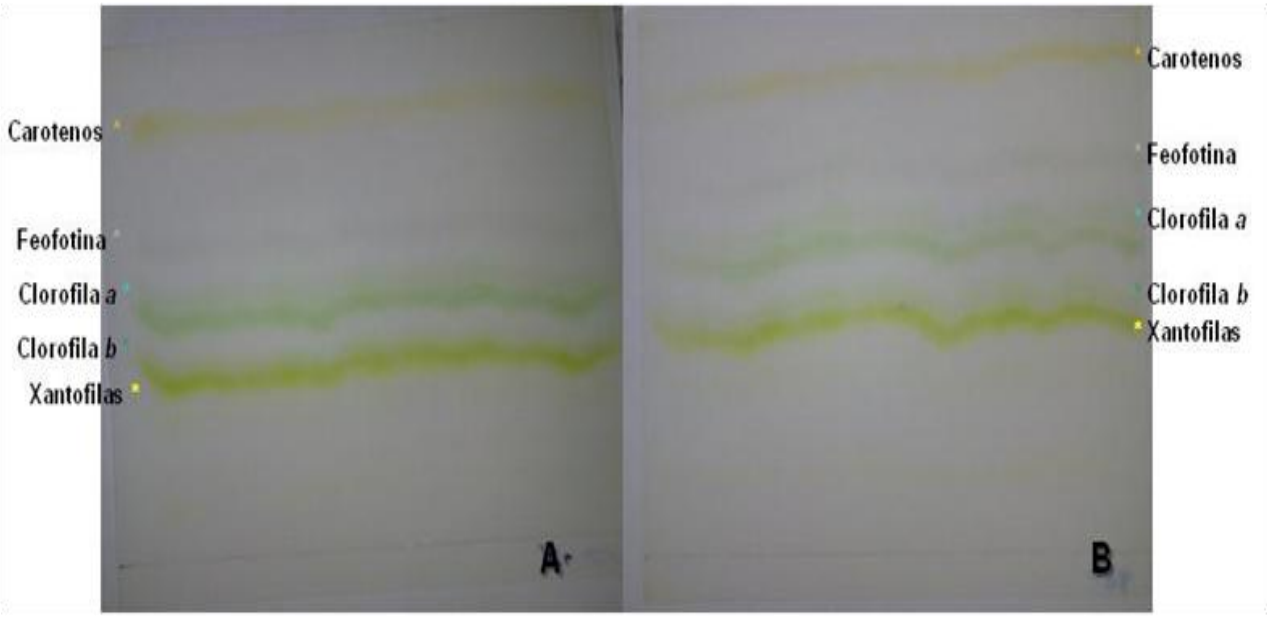


Figura 3.20. Placas para cromatografía en capa fina con los pigmentos separados, extraídos por el método A y por el método B.

3.3.1.1 Espectro de ultravioleta visible de los pigmentos obtenidos de la separación

Los pigmentos obtenidos de la separación por cromatografía en capa fina son β-carotenos, feofitina ***a***, clorofila ***a***, clorofila ***b*** y xantofilas como puede verse por sus espectros de absorción en el visible, Figura 3.21.

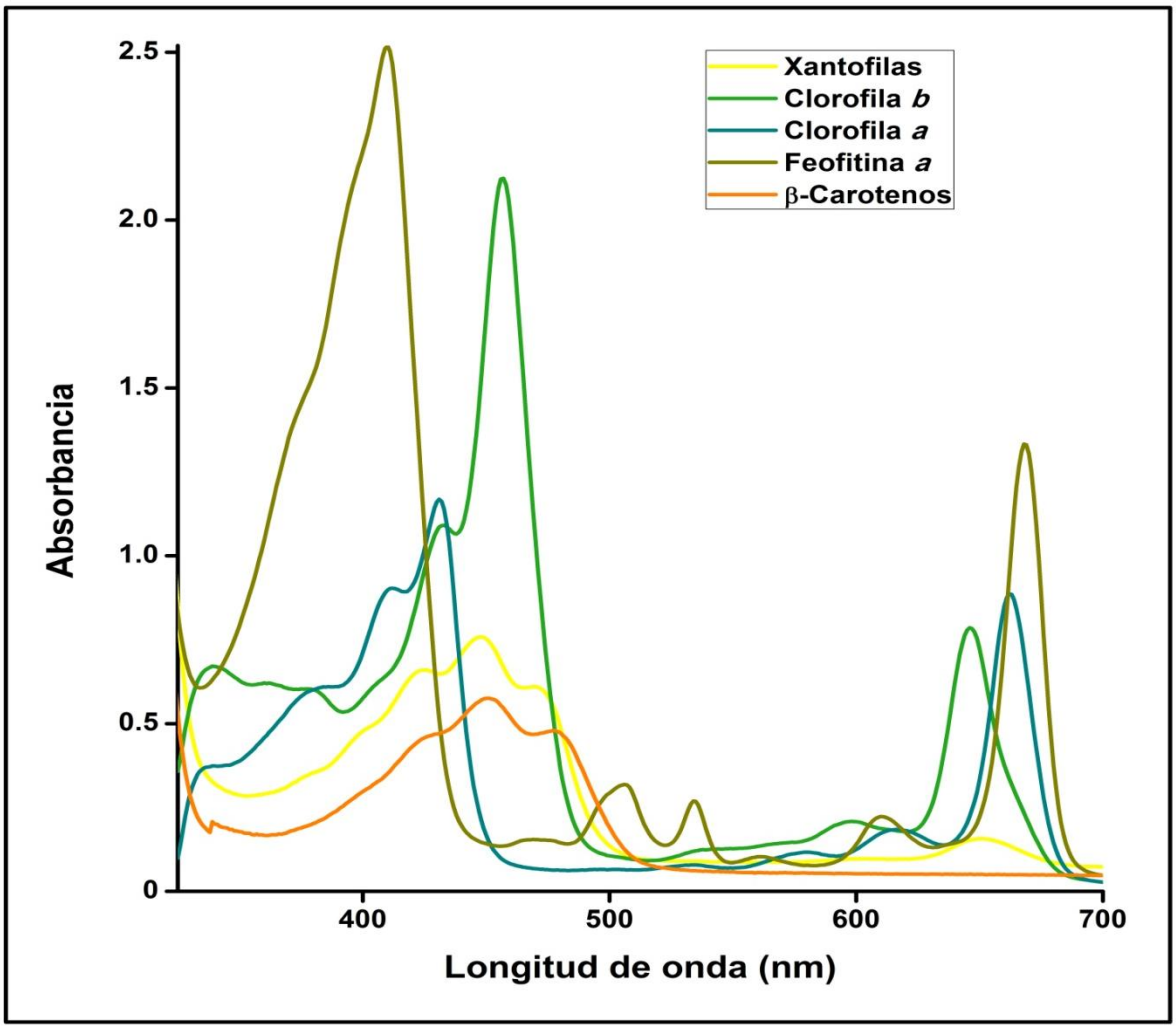


Figura 3.21. Espectros de absorción UV-Vis de los pigmentos obtenidos por cromatografía de capa fina.

3.3.2 Separación por cromatografía en columna

La cantidad obtenida de clorofila ***a*** por cromatografía en capa fina es muy pequeña puesto que la técnica permite colocar de 20 a 100 mg de muestra para llevar a cabo una buena separación. Por lo tanto, se llevó a cabo una separación por columna para obtener clorofila ***a*** en mayor cantidad (Capítulo 2). Puede verse que la separación es tan efectiva como lo que se logra por cromatografía en capa fina al utilizar la misma fase estacionaria (sílica gel) y el mismo eluente, Figura 3.22.

Figura 3.22. Columna de separación de los pigmentos fotosintéticos.

Es claro también que la cantidad obtenida de cada uno de los pigmentos se incrementa y por ello es que se trabaja con las columnas para la obtención de la clorofila ***a*** pura en mayor cantidad.

3.3.2.1 Clorofila *a* pura obtenida por separación en columna

En la Figura 3.23 se muestran los espectros de absorción de ultravioleta-visible de la clorofila ***a*** en acetona o en éter obtenida por separación por columna. Al comparar tales espectros con el espectro de la clorofila ***a*** reportado en la literarura (Mackinney 1941; Scheer 1991; Blankeship 2002) se verifica que la clorofila ***a*** obtenida es pura. Las bandas Q_y, Q_x y de Soret características que se obtienen, corresponden a la clorofila ***a*** disuelta en los disolventes empleados.

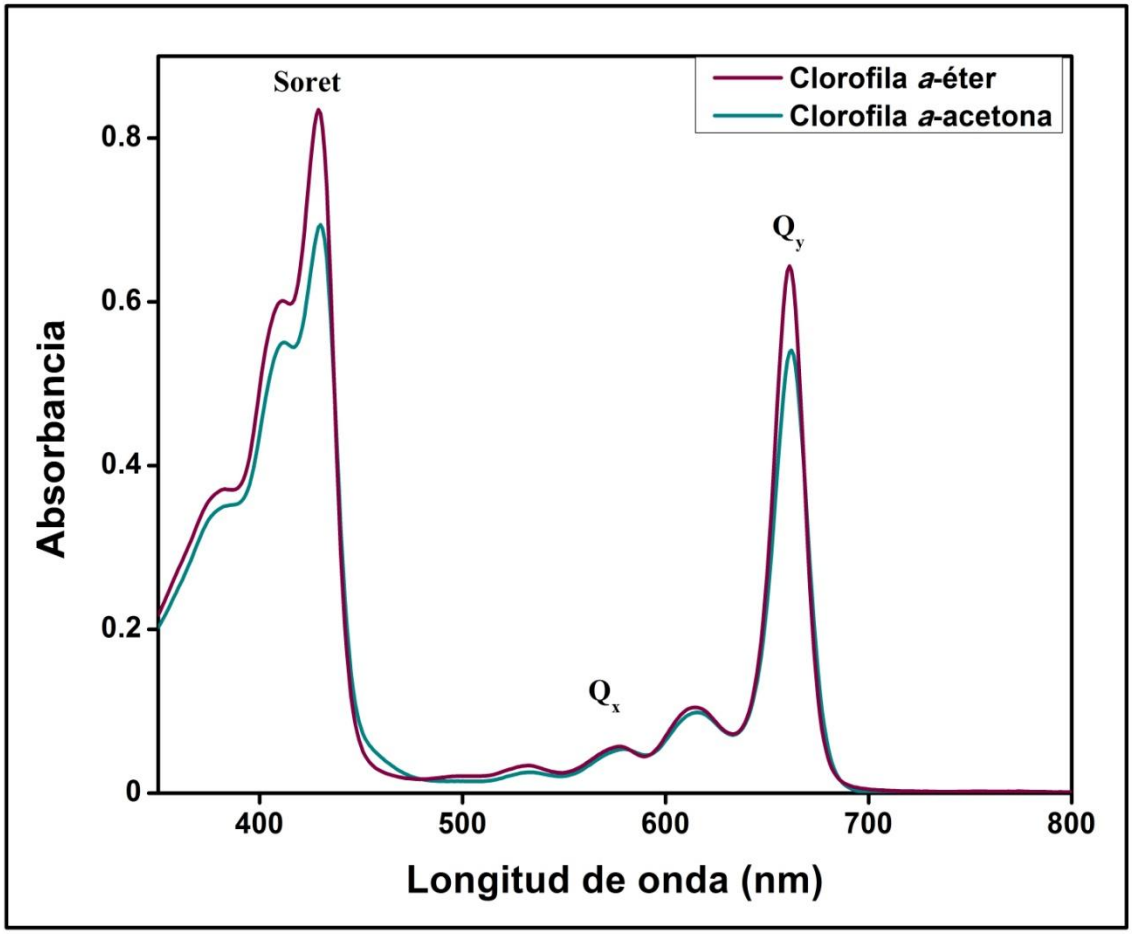


Figura 3.23. Espectros de absorción UV-Vis de la clorofila ***a*** en acetona y en éter.

Al comparar ambos espectros (en acetona y en éter) se comprueba un ligero cambio de los máximos que se corren a menores longitudes de onda para la muestra en éter comparada con la de acetona. Siendo tales valores de longitud de onda de Q_y = 662, Q_x = 579 y Soret 430 nm para la clorofila ***a*** en acetona y Q_y = 661, Q_x = 578 y Soret 429 nm para éter. Estos cambios se deben principalmente a la interacción de la molécula con las moléculas del disolvente (Mackinney 1941). Igualmente, en absorción, cambian los valores de las longitudes de onda de un disolvente a otro. Los valores de las longitudes de onda al máximo de emisión obtenido por fluorescencia también presentan diferencias, Figura 3.24.

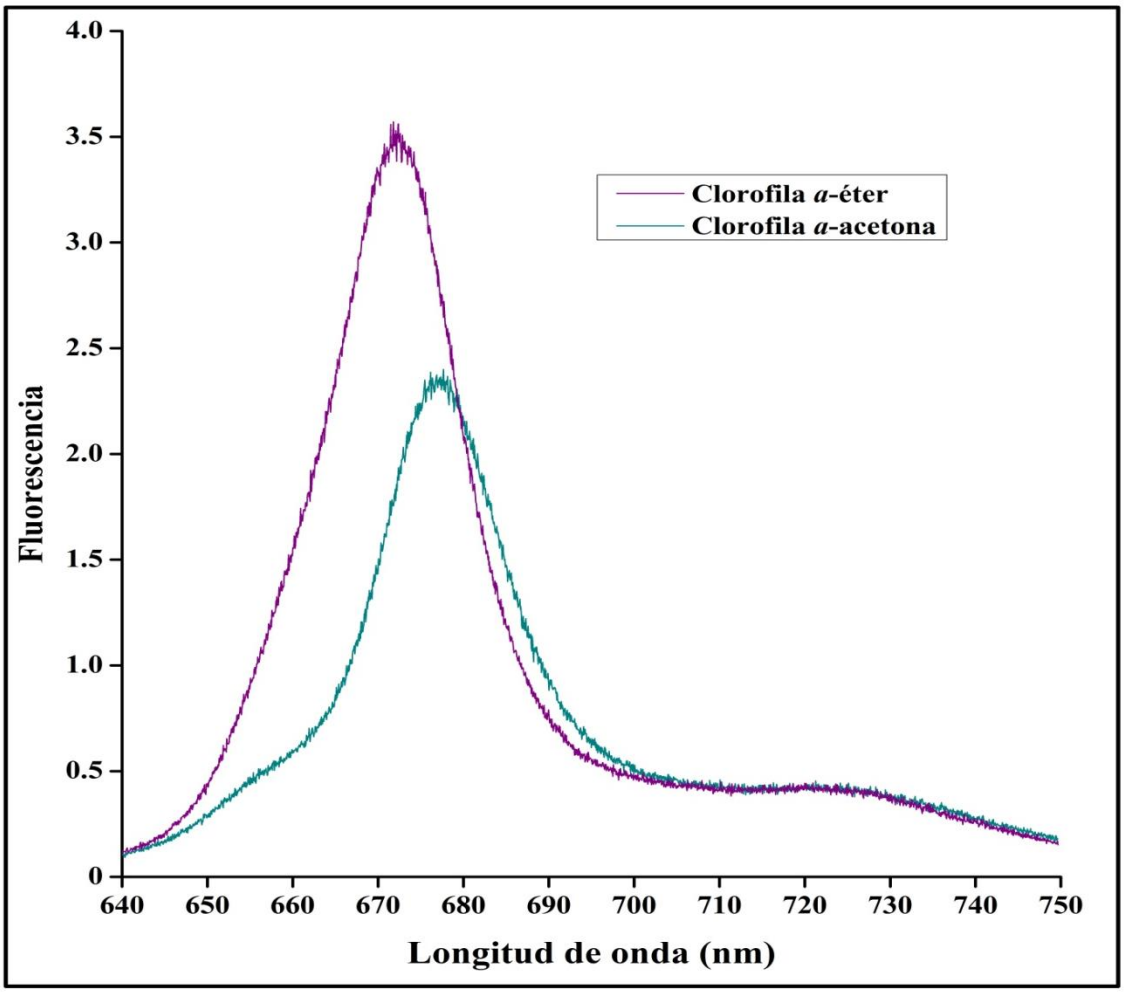


Figura 3.24. Espectros de emisión de fluorescencia de la clorofila ***a*** en acetona y en éter.

La Tabla 3.6 compara las longitudes de onda obtenidas por absorción de ultravioleta visible y por emisión de fluorescencia de la clorofila ***a*** en éter y en acetona así como de la feofitina ***a***.

Tabla 3.6. Longitudes de onda de la clorofila ***a*** en acetona y éter y de la feofitina ***a*** en acetona.

	Disolvente	λ_{max} (nm)			Excitación (nm)	Emisión (nm)
		Soret	**Q_x**	**Q_y**		
Clorofila *a*	Acetona	430	579	662	430	678
	Éter	429	578	661		672
Feofitina *a*	Acetona	409	-	666		689

Cuando el magnesio de la clorofila ***a*** del macrociclo se pierde se obtiene como producto la feofitina; a este proceso se le llama feofitinización como ya se discutió en capítulos anteriores y los espectros de absorción y emisión cambian notablemente, Figura 3.25.

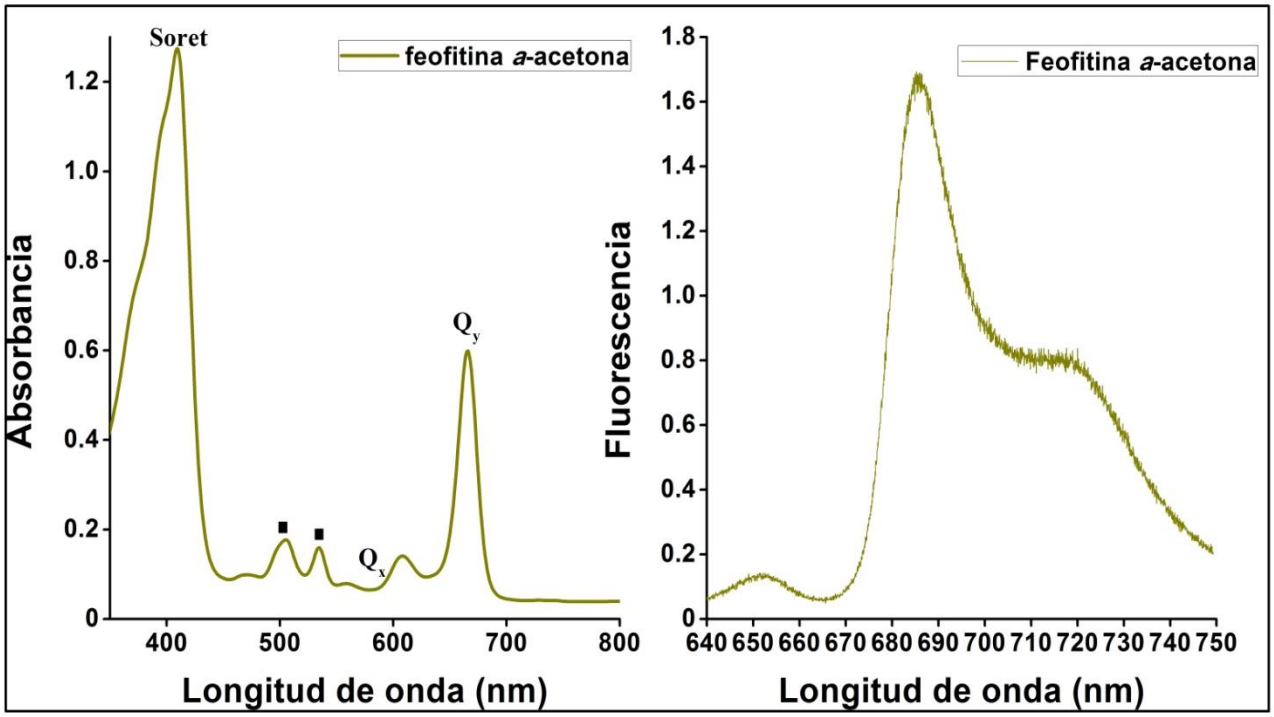


Figura 3.25. Espectros de absorción (UV-Vis) y emisión (fluorescencia) de la feofitina ***a*** en acetona.

Cuando la clorofila ***a*** se descompone en feofitina ***a*** se observa cómo la banda Q_x desaparece y aparecen dos bandas de absorción a 535 y 503 nm, típicas de la feofitina ***a*** (Mackiney, 1941; Murata y col., 2001; Blankenship, 2002).

3.4 Híbridos clorofila *a*-hidrotalcita

La estabilización de la clorofila ***a*** retenida en las hidrotalcitas tiene diferentes comportamientos dependiendo de factores como la composición metálica de las hidrotalcitas (Mg/Al, Ni/Al o Zn/Al), la relación metálica molar M^{II}/Al = X (X = 2, 3 o 4) y el disolvente utilizado para disolver la clorofila ***a***.

3.4.1 Efecto de la naturaleza del catión M^{II} de los soportes en la adsorción y estabilización de la clorofila *a*

3.4.1.1 Estructura

Los patrones de difracción de rayos X de los materiales híbridos, resultantes del contacto de las hidrotalcitas con la clorofila ***a*** disuelta en acetona o en éter, se comparan en la Figura 3.26. Todas las muestras son cristalinas y fueron identificadas como hidrotalcitas cuya estructura se mantiene. La distancia intelaminar no cambia con la adición de la clorofila.

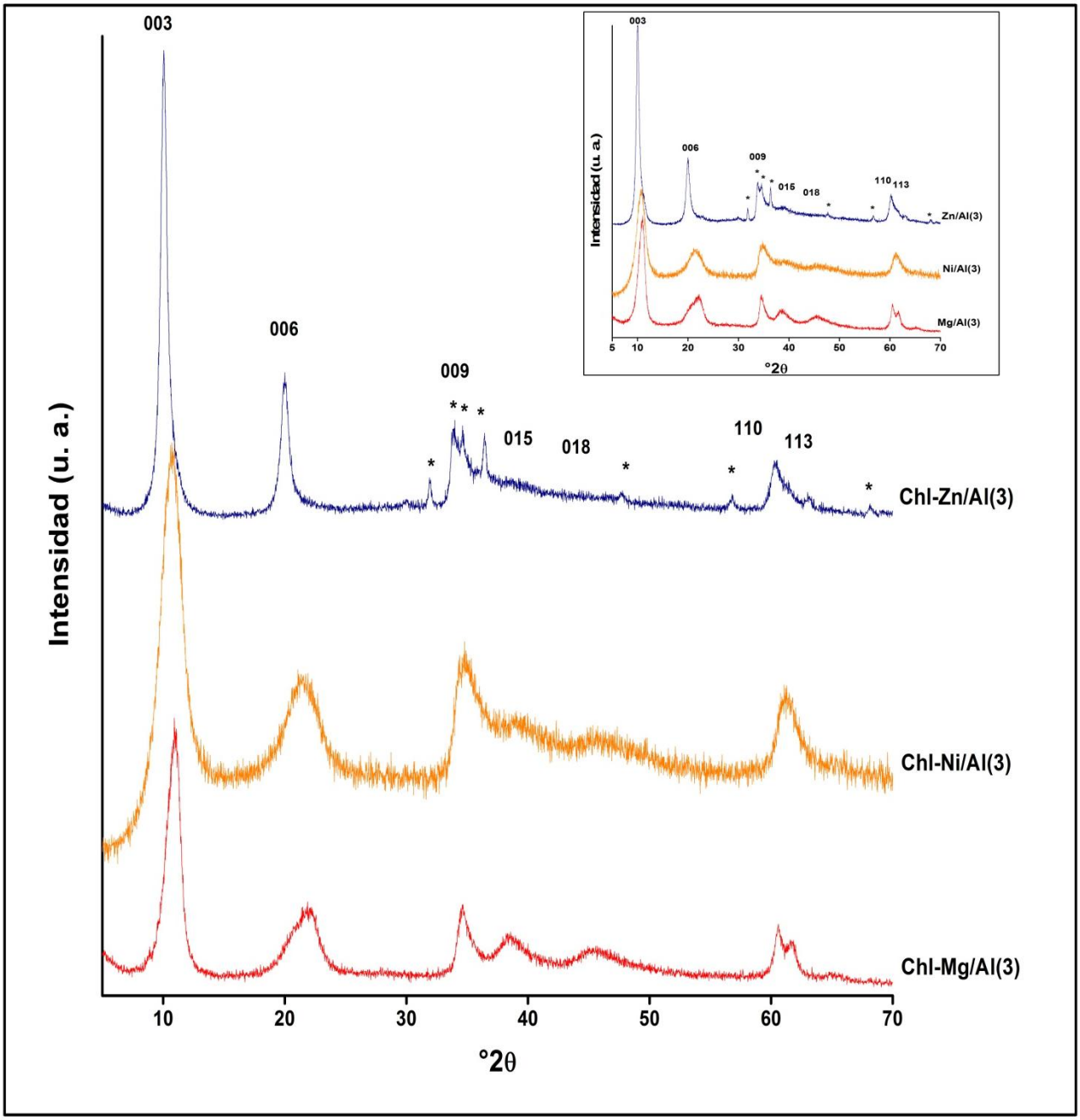


Figura 3.26. Patrones de difracción de rayos X de los híbridos clorofila ***a***-hidrotalcita de diferente composición metálica (Mg, Ni o Zn) de relación 3. La gráfica en la esquina superior derecha es la correspondiente a las muestras iniciales sin clorofila. *ZnO.

Dado que la distancia interlaminar, determinada por la posición del pico 003, no se modifica con la adición de clorofila se concluye que la clorofila no se intercaló en el espacio interlaminar pero sí se adsorbió en la superficie externa de los soportes.

3.4.1.2 Comportamiento óptico

Los espectros de absorción (UV-Vis de reflectancia difusa) y de emisión (fluorescencia) de las muestras Chl-Mg/Al(3), Chl-Ni/Al(3) y Chl-Zn/Al(3) y de sus correspondientes muestras iniciales se muestran en la Figura 3.27.

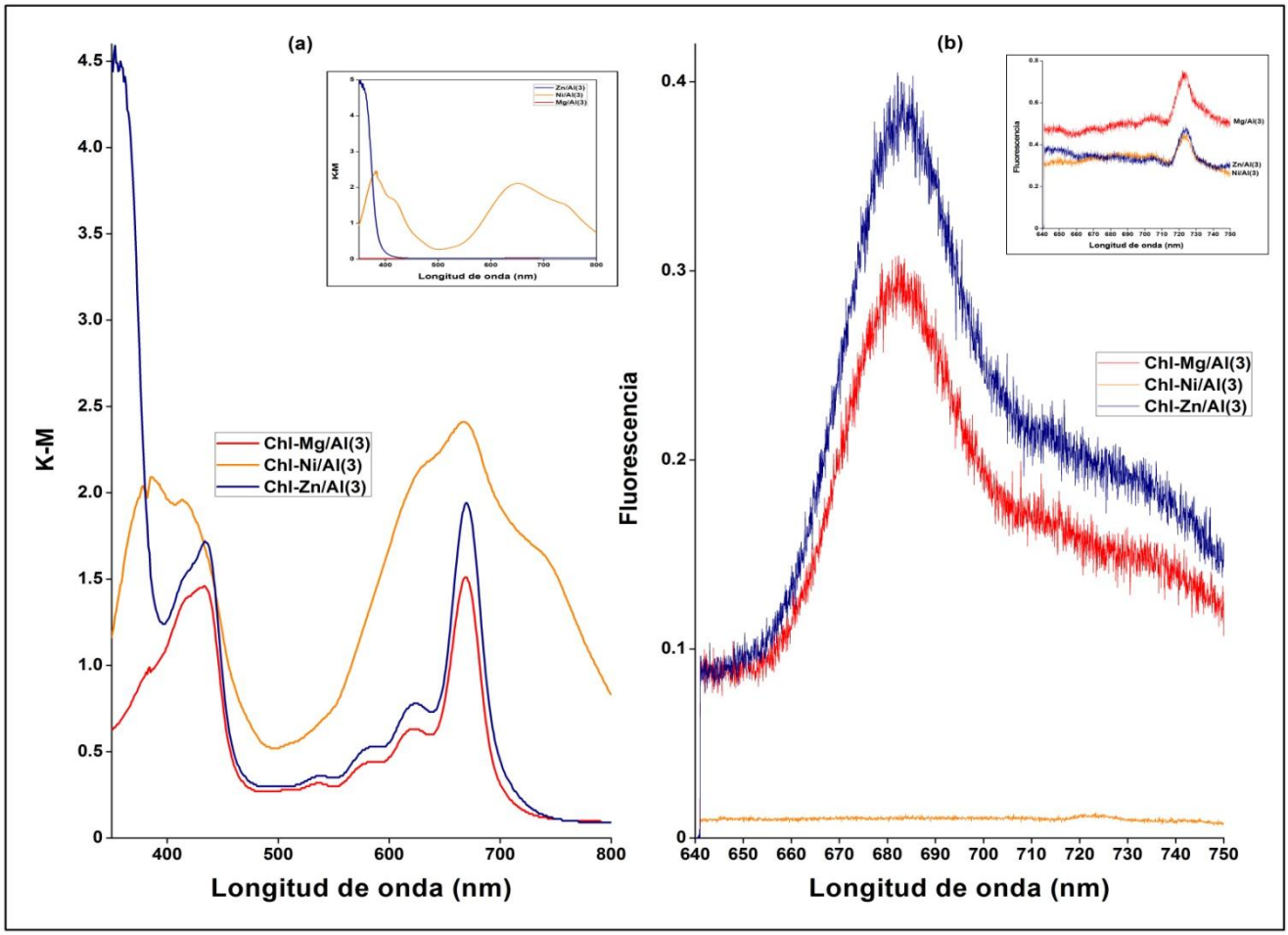


Figura 3.27. Espectros de absorción (a) (UV-Vis de reflectancia difusa) y emisión (b) (fluorescencia) de las muestras Chl-Mg/Al(3), Chl-Ni/Al(3) y Chl-Zn/Al(3). Las gráficas de UV-Vis de reflectancia difusa (a) y de emisión de fluorescencia (b) de las muestras iniciales se presentan por efectos de comparación.

Las diferencias entre los espectros de absorción (a) y de emisión (b) de las hidrotalcitas antes y después de la adsorción de la clorofila ***a*** es notable. Demuestran claramente que la clorofila ***a*** se adsorbió en todas las hidrotalcitas. La banda debida a la transición Q_y de la molécula de clorofila ***a*** en acetona se encuentra en λ = 662 nm y en éter en λ = 661 nm, además en este caso la banda es más estrecha. Las bandas Q_y de la clorofila ***a*** en la superficie de las hidrotalcitas son más anchas comparadas con las de la clorofila monomérica. Se han reportado tendencias similares para sistemas arcilla/clorofila y FSM/clorofila (Ishii y col., 1995; Itoh y col., 1998; Murata y col., 2001). Para los nano-híbridos Chl-Mg/Al(3), Chl-Ni/Al(3) y Chl-Zn/Al(3) la absorción de la transición Q_y se observa para λ = 669, 669 y 670 nm, respectivamente, Tabla 3.7. Tales cambios en la longitud de onda, comparados con la longitud de onda de la transición Q_y de la clorofila ***a*** en acetona, se deben a una interacción entre el sólido y la clorofila. Se observa que existe una feofitinización parcial de la clorofila ***a*** en la muestra Chl-Ni/Al(3) mientras que para las otras muestras la clorofila se mantiene estable. La estabilidad de la clorofila ***a*** adsorbida en las hidrotalcitas se ve afectada por la naturaleza del catión M^{II}. Lleva el siguiente orden de estabilidad: Zn/Al(3) >> Mg/Al(3) > Ni/Al(3).

Tabla 3.7. Longitudes de onda de absorción y emisión asociadas a la clorofila ***a*** adsorbida en las hidrotalcitas de Zn/Al, Mg/Al y Ni/Al.

Muestra	λ_{max} (nm)			Excitación (nm)	Emisión (nm)
	Soret	Q_x	Q_y		
Chl-Zn/Al(3)	**436**	**577**	**670**		**682**
Chl-Mg/Al(3)	435	577	669	430	682
Chl-Ni/Al(3)	**418**	**-**	**669**		-

En la Figura 3.27 (b) se presentan los espectros de fluorescencia de los híbridos, que se obtuvieron excitando con una radiación de λ = 430 nm. Las bandas correspondientes de la clorofila ***a*** adsorbida en las hidrotalcitas obtenidas por fluorescencia son similares al espectro de la clorofila ***a*** en acetona o en éter. Presentan un ligero cambio hacia el rojo debido a la interacción de la clorofila ***a*** con los soportes. La emisión máxima en las muestras Chl-Mg/Al(3) y Chl-Zn/Al(3) se observa a 682 nm. El material híbrido Chl-Ni/Al(3) no presenta ninguna emisión que pueda atribuirse a las moléculas de clorofila ***a***, quizás porque los iones níquel la absorben (Cotton y Wilkinson, 1986). De hecho la clorofila ***a*** adsorbida en las hidrotalcitas se extrajo con acetona. Los espectros de absorción UV-Vis de la disolución de acetona y clorofila ***a*** extraída también muestran el comportamiento descrito anteriormente, Figura 3.28.

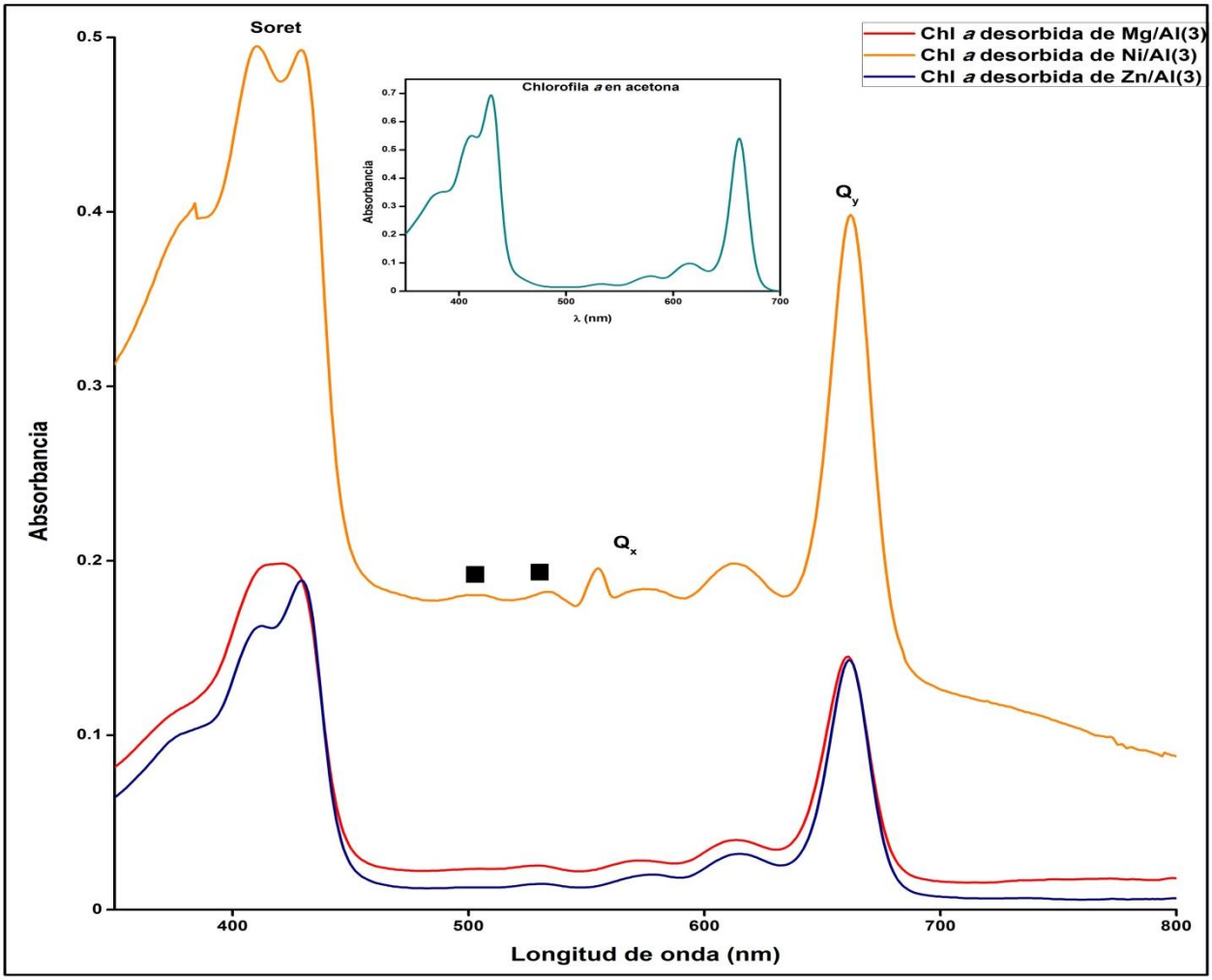


Figura 3.28. Espectros de absorción UV-Vis de la clorofila ***a*** extraída con acetona de los híbridos Chl-Mg/Al(3), Chl-Ni/Al(3) y Chl-Zn/Al(3).

La clorofila ***a*** extraída de las hidrotalcitas de Mg/Al y de Zn/Al no muestran feofitinización, pero la posibilidad de otros tipos de variedad de clorofila ***a*** no pueden descartarse para la muestra Chl-Mg/Al(3) (Scheer, 1991). Se confirma para la clorofila extraída de la muestra de Ni que existe una feofitinización parcial ya que empiezan a aparecer las bandas en λ = 533 y 502 nm, Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Longitudes de onda de la clorofila ***a*** en acetona desorbida de los híbridos de Chl-Zn/Al(3), Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Ni/Al(3)-MW.

Muestra	λ_{max} (nm)		
	Soret	**Q_x**	**Q_y**
Chl-Zn/Al(3)	**429**	**577**	**661**
Chl-Mg/Al(3)	421	572	661
Chl-Ni/Al(3)	**429**	**574**	**662**

3.4.2 Efecto de la relación metálica molar M^{II}/Al de los soportes en la adsorción y estabilización de la clorofila *a*

3.4.2.1 Estructura

En la Figura 3.29 se comparan los patrones de difracción de rayos X de los híbridos obtenidos al poner en contacto las hidrotalcitas de Mg/Al tratadas hidrotérmicamente por irradiación con microondas con una disolución de clorofila ***a*** en acetona. Todas las muestras son cristalinas y se identifican como hidrotalcitas, cuya estructura se mantiene y no se observan otros compuestos. Las distancias interlaminares determinadas por la posición del pico 003 son iguales a 8 Å.

Los patrones de difracción de los híbridos reproducen el mismo comportamiento que el de las hidrotalcitas sin clorofila, es decir que la adición de la clorofila ***a*** en las hidrotalcitas no modifica su estructura. La clorofila ***a*** debe estar adsorbida en la superficie externa del soporte, independientemente de la naturaleza del catión, de la relación metálica molar y del método de cristalización.

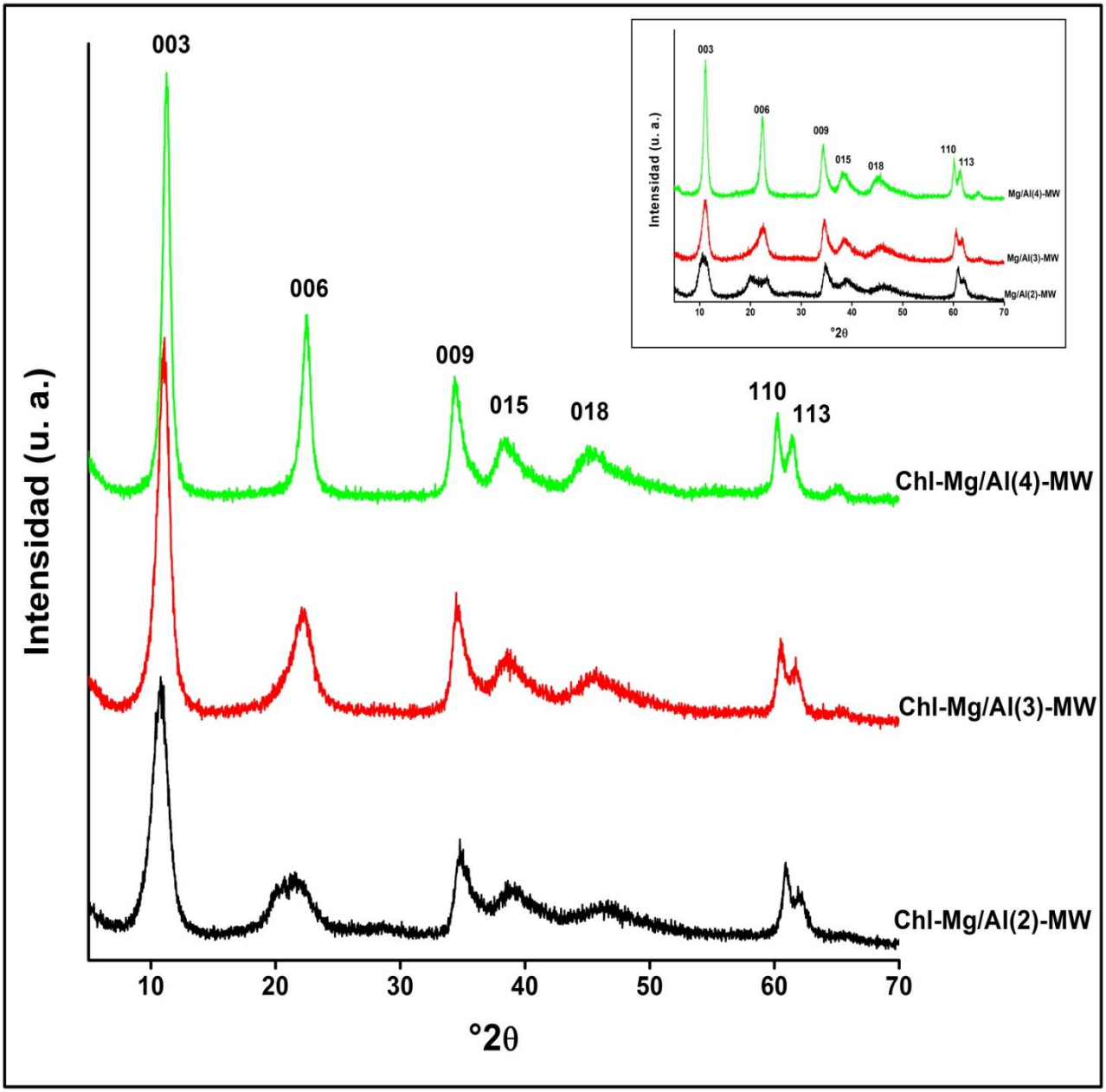


Figura 3.29. Patrones de difracción de rayos X de los híbridos Chl-Mg/Al(2)-MW, Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Mg/Al(4)-MW. La gráfica en la esquina superior derecha es la correspondiente a las muestras iniciales sin clorofila.

3.4.2.2 Comportamiento óptico

Las bandas de absorción, correspondientes a las bandas de Soret, en los materiales híbridos Chl-Mg/Al(2)-MW, Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Mg/Al(4)-MW resultado del contacto de las hidrotalcitas correspondientes con la clorofila ***a*** disuelta en acetona se observan por espectroscopia UV-Vis de reflectancia difusa a 426, 435 y 423 nm, Figura 3.30 (a). La transición Q_y aparece a 669, 669 y 666 nm, respectivamente. Las bandas entre 300 y 400 nm y la banda Q_x que se observan sobre todo para el híbrido Chl-Mg/Al(3)-MW son claramente de la clorofila ***a***, indicando que las moléculas de clorofila pueden inmovilizarse evitando la feofitinización. Nótese que a mayor relación metálica molar, mayor adsorción de clorofila según los valores de área superficial.

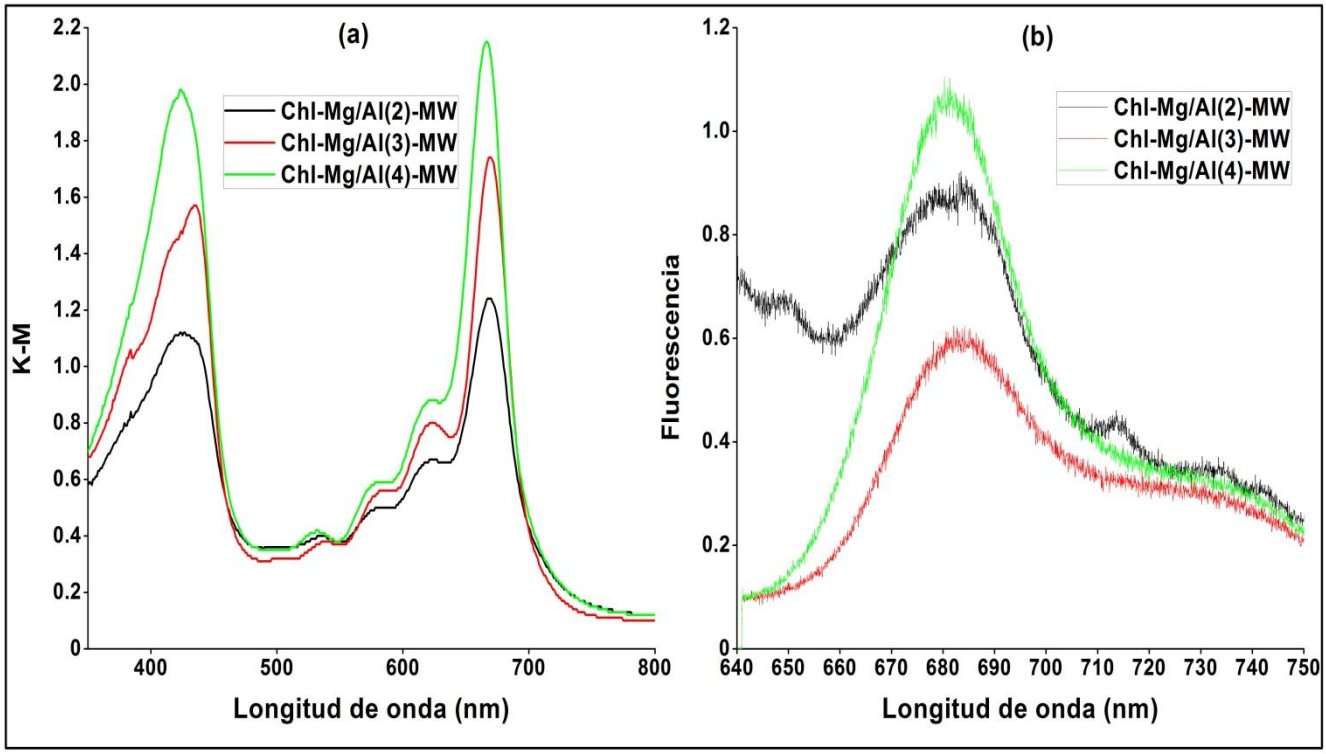


Figura 3.30. Espectros de absorción (a) (UV-Vis de reflectancia difusa) y emisión (b) (fluorescencia) de los híbridos Chl-Mg/Al(2)-MW, Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Mg/Al(4)-MW.

Las bandas de emisión de fluorescencia correspondientes a la excitación de los híbridos a 430 nm corresponden a las presentes en la clorofila ***a*** monomérica, Figura 3.30 (b). Presentan un cambio hacia el rojo debido a la interacción entre los sólidos y las moléculas de clorofila. Los valores de emisión máximos obtenidos son a 621 nm, muestra Chl-Mg/Al(2)-MW), a 682 nm, muestra Chl-Mg/Al(3)-MW y a 680 nm, muestra Chl-Mg/Al(4)-MW, Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Longitudes de onda de absorción y emisión asociadas a la clorofila ***a*** adsorbida en las hidrotalcitas de Mg/Al de diferentes relaciones molares (2,3 o 4) tratadas hidrotérmicamente con irradiación de microondas.

Muestra	λ_{max} (nm)			Excitación (nm)	Emisión (nm)
	Soret	**Q_x**	**Q_y**		
Chl-Mg/Al(4)-MW	425	572	666		680
Chl-Mg/Al(3)-MW	**435**	**577**	**669**	**430**	**682**
Chl-Mg/Al(2)-MW	**426**	**576**	**669**		**621**

Los resultados muestran que la estabilidad de la clorofila ***a*** adsorbida depende de la relación metálica molar, M^{II}/Al, de los soportes, según el orden: Chl-Mg/Al(2)-MW ≤ Chl-Mg/Al(4)-MW < Chl-Mg/Al(3)-MW. Los espectros de absorción de la clorofila ***a*** extraída con acetona de los híbridos de Mg/Al, Figura 3.31, confirman estos resultados.

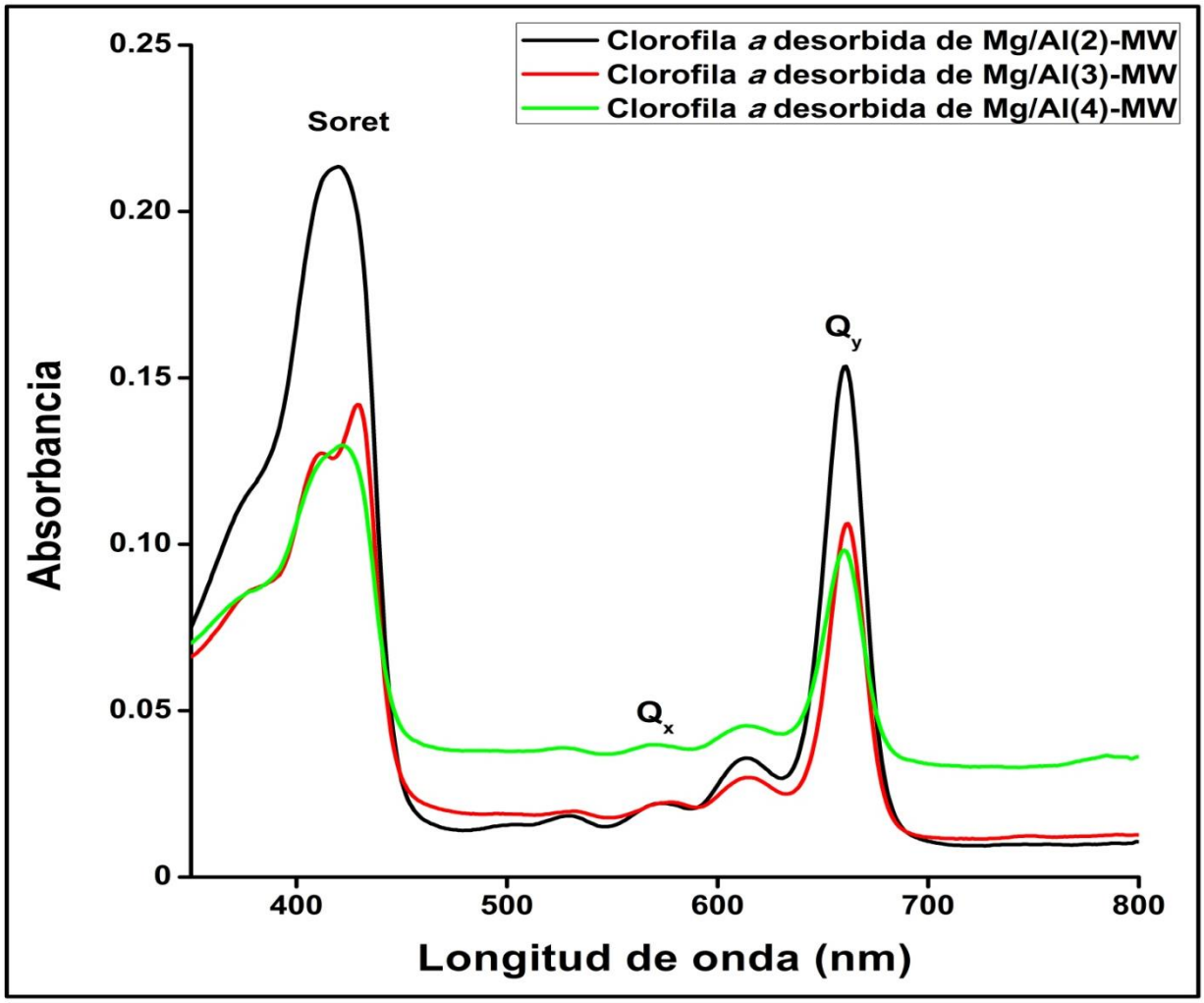


Figura 3.31. Espectros de absorción UV-Vis de la clorofila ***a*** extraída con acetona de los híbridos Chl-Mg/Al(2)-MW, Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Mg/Al(4)-MW.

El híbrido Chl-Mg/Al(4)-MW que más adsorbe clorofila ***a*** es del que menos se desorbe y el híbrido Chl-Mg/Al(2)-MW es del que más se desorbe la clorofila. La muestra Chl-Mg/Al(3)-MW mantiene su comportamiento intermedio. Las bandas de absorción Q_y vuelven a valores de λ cercanos a los que se obtienen para la clorofila ***a*** monomérica en acetona, lo cual comprueba que los desplazamientos batocrómicos así como el ensanchamiento de dichas bandas corresponden a la interacción entre los sólidos y la molécula de la clorofila ***a***, Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Longitudes de onda de absorción de la clorofila ***a*** extraída con acetona de los híbridos Chl-Mg/Al(2)-MW, Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Mg/Al(4)-MW.

Muestra	λ_{max} **(nm)**		
	Soret	**Q_x**	**Q_y**
Chl-Mg/Al(2**)**-MW	**422**	**572**	**660**
Chl-Mg/Al(3)-MW	428	572	661
Chl-Mg/Al(4**)**-MW	**420**	**570**	**660**

3.4.3 Efecto del tratamiento hidrotérmico de la síntesis de las hidrotalcitas en la adsorción y estabilización de la clorofila *a*

3.4.3.1 Comportamiento óptico

En la Figura 3.32 se comparan los espectros de absorción (a) (reflectancia difusa) y de emisión (b) (fluorescencia) de los híbridos Chl-Mg/Al(3), Chl-Ni/Al(3), Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Ni/Al(3)-MW. Se observa que el tratamiento hidrotérmico usado en la síntesis de las hidrotalcitas tiene una fuerte influencia en la adsorción y en la estabilización de la clorofila ***a***. Cuando las hidrotalcitas se sintetizan por el método convencional adsorben clorofila en menor cantidad que las hidrotalcitas hidrotérmicamente tratadas por irradiación con microondas. Con esta técnica se obtienen sólidos con mayor orden en sus láminas resultando una mayor cristalinidad (Benito y col., 2006a,b). Un mejor ordeno implica una mejor dispersión de las moléculas de clorofila ***a*** adsorbidas sobre la superficie del soporte confiriéndole además una mayor estabilidad.

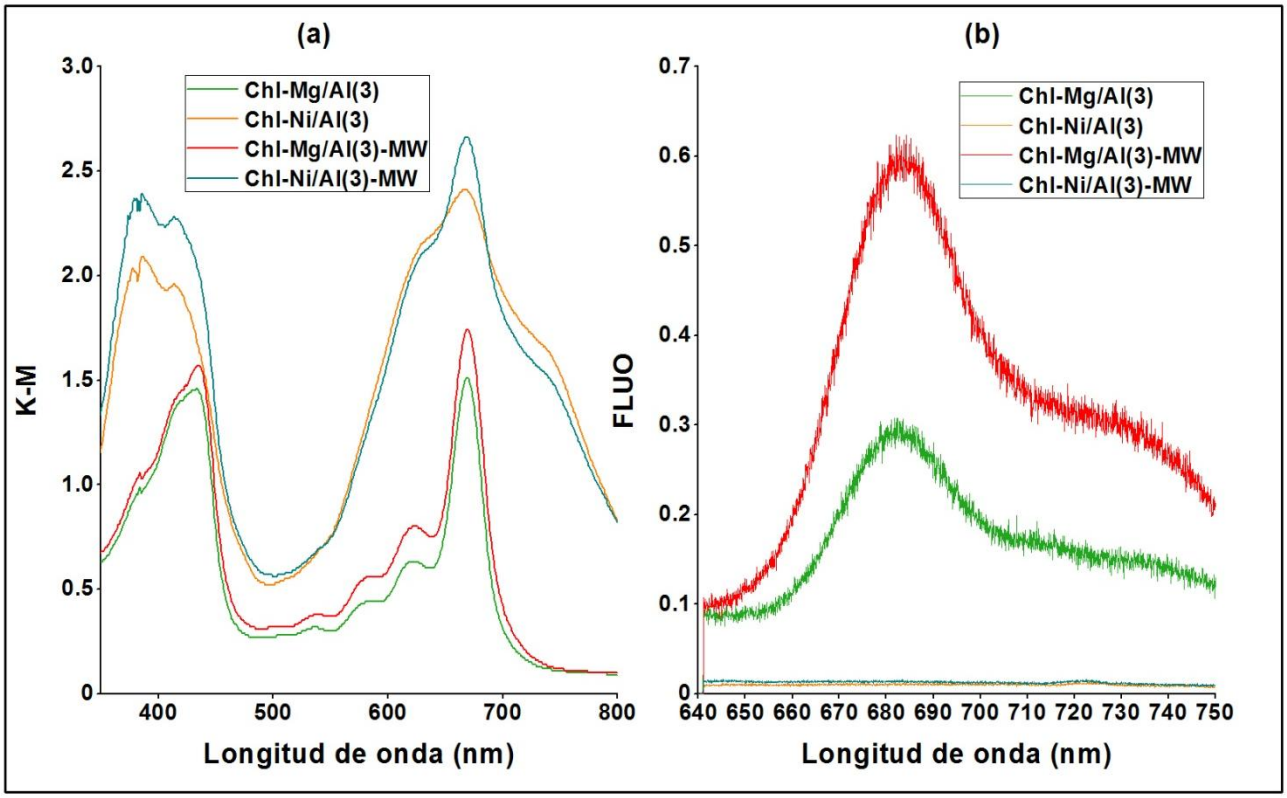


Figura 3.32. Espectros de absorción (a) (reflectancia difusa UV-Vis) y emisión (b) (fluorescencia) de los híbridos Chl-Mg/Al(3), Chl-Ni/Al(3), Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Ni/Al(3)-MW.

Las muestras de composición Mg/Al son mucho más efectivas para inmovilizar o adsorber clorofila ***a*** como puede verse en los espectros de absorción (a) y de emisión (b). Las bandas de Soret y las bandas Q observadas en los híbridos se asignaron como bandas correspondientes a la clorofila ***a***. Al extraer la clorofila ***a*** de las hidrotalcitas con acetona se comprueba el comportamiento descrito anteriormente, Figura 3.33. Los espectros de absorción de UV-Vis de la clorofila ***a*** extraída con acetona también muestran que no hay feofitinización de ésta, excepto en la muestra Chl-Ni/Al(3).

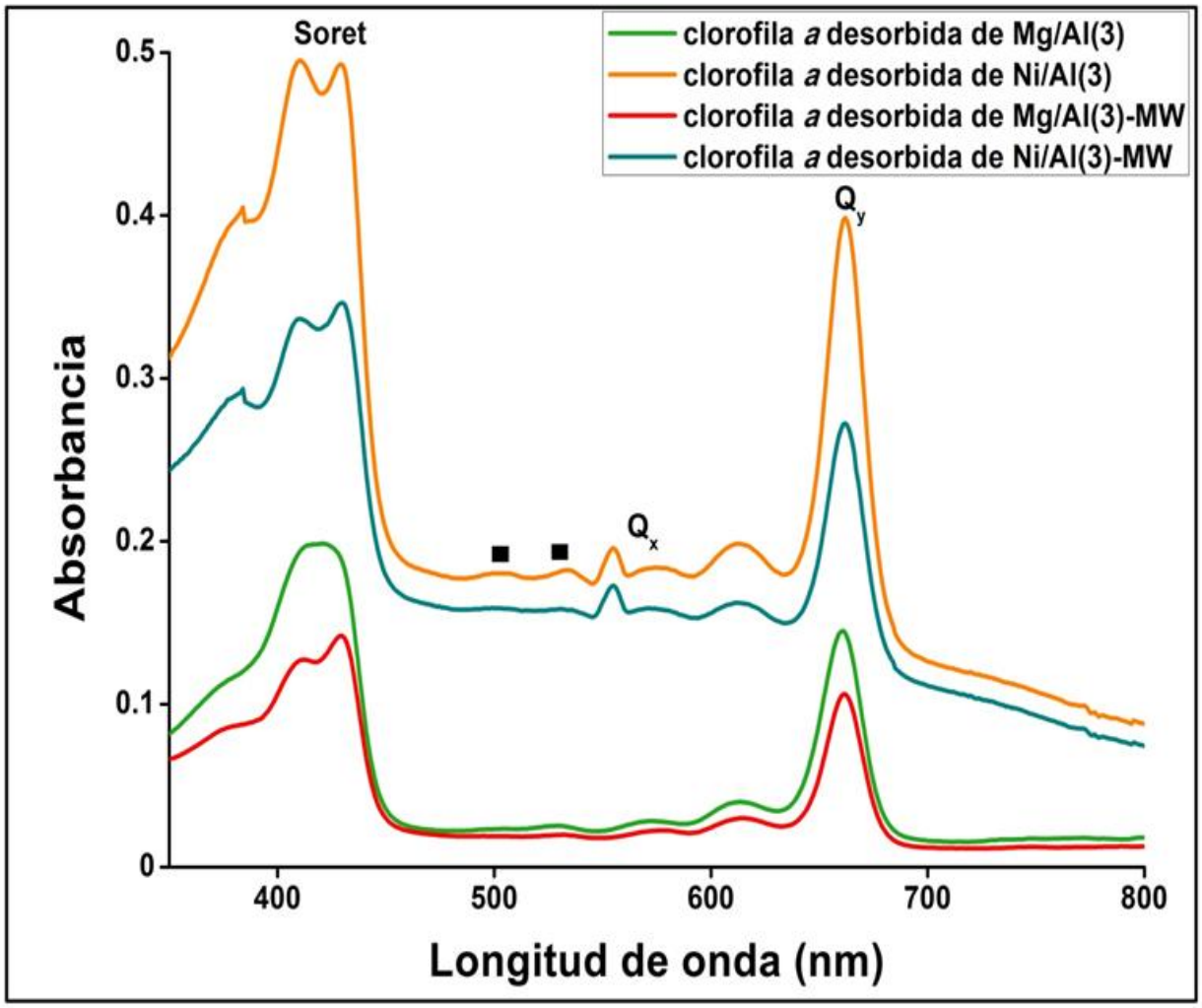


Figura 3.33. Espectros de absorción UV-Vis de la clorofila ***a*** extraída con acetona de los híbridos Chl-Mg/Al(3), Chl-Ni/Al(3), Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Ni/Al(3)-MW.

3.4.4 Efecto del disolvente empleado para disolver la clorofila *a* en la adsorción y estabilización de la clorofila *a* en las hidrotalcitas

3.4.4.1 Comportamiento óptico

Cuando la clorofila ***a*** se disolvió en éter y fue puso en contacto con las hidrotalcitas para obtener los híbridos, no se observaron diferencias por espectroscopia UV-Vis de reflectancia difusa (a) y fluorescencia (b) al comparar estas muestras respecto a los híbridos preparados con la clorofila disuelta en acetona, Figura 3.34. Sin

embargo al extraer la clorofila ***a*** de los hibridos Chl-Mg/Al(3)-MW, Chl-Mg/Al(3) y Chl-Zn/Al(3) con acetona y medir el sobrenadante por espectroscopia UV-Vis se observa que parte de la clorofila ***a*** se feofitiniza, sobre todo en las muestras sintetizadas por el método convencional, Figura 3.35. Para la muestra Chl-Mg/Al(3)-MW puede observarse que el disolvente empleado para disolver la clorofila ***a*** y preparar los materiales híbridos no es crucial en la estabilización de ésta en las hidrotalcitas. Sin embargo, para todas las muestras el disolvente es crucial en cuanto a la cantidad de clorofila ***a*** que se adsorbe en ellas, siendo definitivamente la acetona el disolvente adecuado para llevar a cabo la preparación de los híbridos.

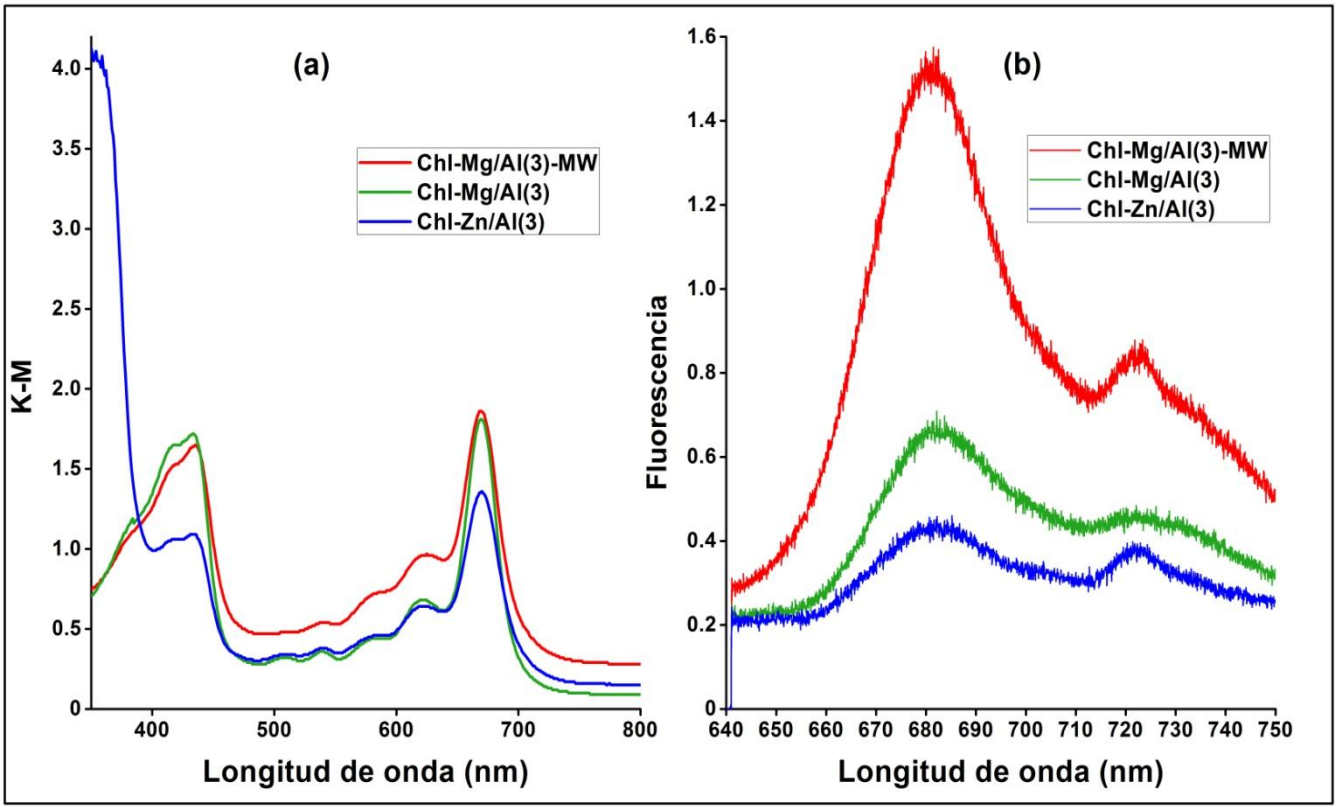


Figura 3.34. Espectros de absorción (a) (UV-Vis de reflectancia difusa) y emisión (b) (fluorescencia) de los híbridos Chl-Mg/Al(3), Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Zn/Al(3) preparados poniendo en contacto las hidrotalcitas con la clorofila ***a*** disuelta en éter.

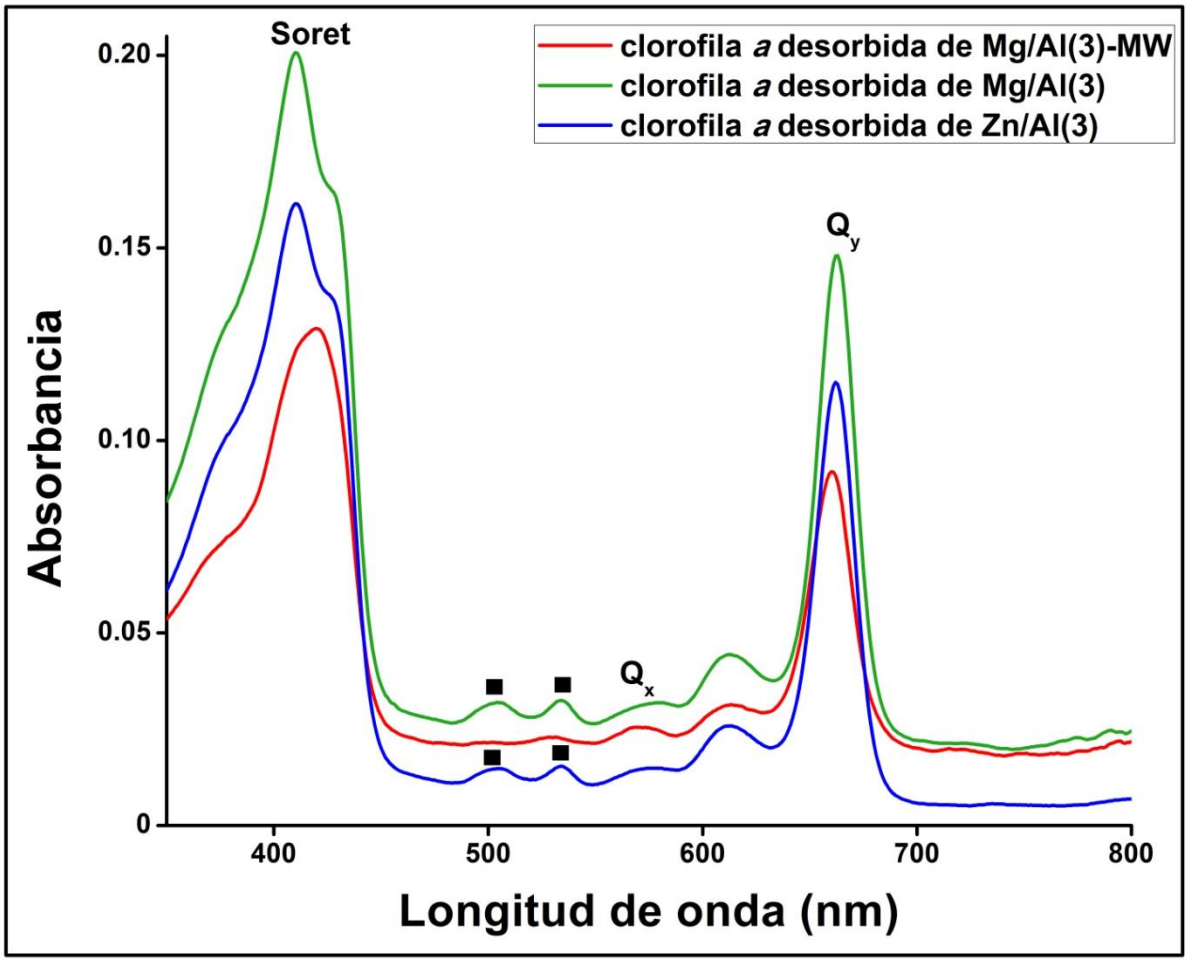


Figura 3.35. Espectros de absorción UV-Vis de la clorofila ***a*** extraída con acetona de los híbridos Chl-Mg/Al(3), Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Zn/Al(3) preparados al poner en contacto de las hidrotalcitas con la clorofila ***a*** disuelta en éter.

3.4.5. Desorción de la clorofila *a* con acetona de los híbridos Mg/Al y Zn/Al después de 10 y 30 días de almacenado

En la Figura 3.36 se comparan los espectros de absorción UV-Vis de la clorofila ***a*** extraída con acetona de los híbridos Chl-Mg/Al(3), Chl-Zn/Al(3) y Chl-Mg/Al(3)-MW después de 10 y 30 días. En todos los casos la clorofila ***a*** se mantiene y no se observa feofitinización, aunque no puede excluirse por completo la posibilidad de que haya sufrido algún otro tipo de modificación en su estructura (Scheer, 1991). Cabe mencionar

que los sólidos fueron almacenados a temperatura ambiente bajo luz tenue.

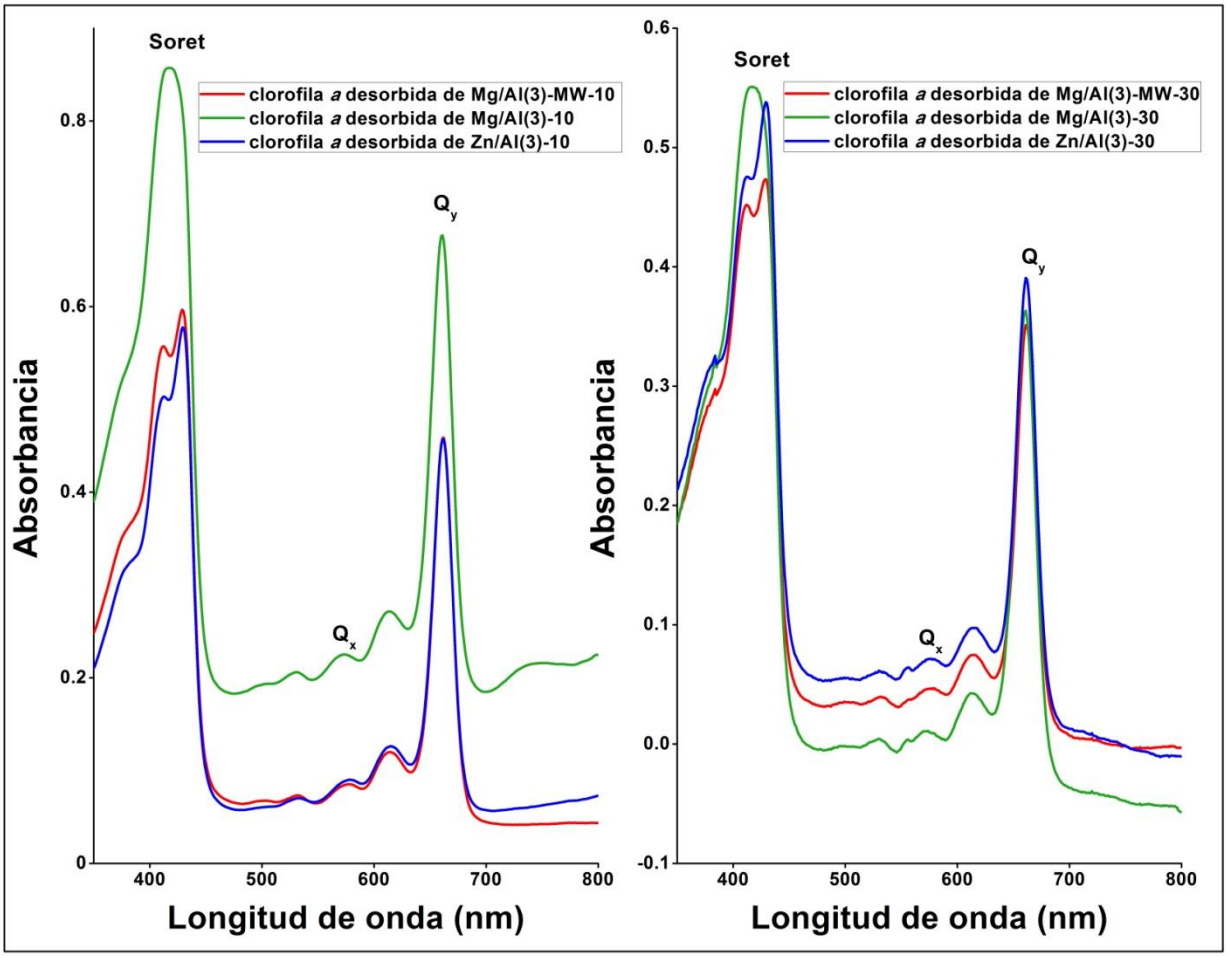


Figura 3.36. Espectros de absorción UV-Vis de la clorofila ***a*** extraída con acetona de los híbridos Chl-Mg/Al(3)-MW, Chl-Mg/Al(3) y Chl-Zn/Al(3) después de 10 y 30 días.

3.4.6 Discusión

Todos los híbridos clorofila ***a***-hidrotalcita mantienen su estructura al comparar sus patrones de difracción de rayos X con los de las hidrotalcitas Mg/Al(2)-MW, Mg/Al(3)-MW, Mg/Al(4)-MW, Ni/Al(3)-MW, Mg/Al(3), Ni/Al(3) y Zn/Al(3), ya que la clorofila ***a*** se adsorbe en la superficie externa de los soportes, al tratarse de una molécula neutra. La clorofila ***a*** puede fácilmente funcionar como una unidad constructora de bloques para interacciones supramoleculares debido a su estructura. La fuerza de estas interacciones son: 1) debidas al metal central el cual también está involucrado en las interacciones entre la clorofila y sus lipoproteínas (Dolphin, 1978) e incluso se ha mostrado que también pueden estar ligadas moléculas de agua al metal (Allen y col., 1987; Standfuss y col., 2005), y 2) debidas a los enlaces por puentes de hidrógeno (Pale, 2011), Figura 3.37. La clorofila ***a*** prefiere la periferia de las hidrotalcitas en la adsorción puesto que están formadas por unidades octaédricas con átomos centrales de M^{II} y M^{III} coordinados hexaédricamente con los grupos OH situados en los vértices de los octaedros. Las muestras de composición Mg/Al y Zn/Al son mucho más efectivas para estabilizar la clorofila ***a*** puesto que los iones magnesio y zinc tienen una fuerte interacción positiva con la clorofila y de hecho son los metales centrales en la clorofila encontrados en la naturaleza (Grimm y col., 2006). Los metales de transición con los orbitales **d** expuestos y los metales pesados presentarían una alta probabilidad de transiciones electrónicas intersistema, lo cual inhibiría el proceso natural de la fotosíntesis al reducir la transferencia de carga intrasistema y, por lo tanto no funcionarían apropiadamente para la fotosíntesis (Pale, 2011). Basados en este hecho, las hidrotalcitas de Ni/Al inhiben tales transiciones como puede verse por los espectros de fluorescencia de los híbridos, Figs. 3.27 y 3.33. El níquel tiene varios roles importantes en el metabolismo de las plantas superiores (Bai y col., 2006) como incrementar la actividad de la enzima hidrogenasa (Klucas y col., 1983), la cual favorece la degradación reversible del hidrógeno molecular transformándolo en dos iones hidrógeno positivos listos para reaccionar con cualquier otro elemento con afinidad que se le presente, por ejemplo los átomos de nitrógeno del macrociclo. En las muestras de níquel se observa una feofitinazión parcial de la clorofila ***a*** de acuerdo con las propiedades del níquel.

Las hidrotalcitas tratadas hidrotérmicamente por irradiación con microondas presentan un mejor comportamiento en la adsorción y estabilidad de la clorofila ***a***, Figs. 3.32 y 3.33. ya que con esta técnica se obtiene un mayor ordenamiento en las láminas de las hidrotalcitas resultando una mayor cristalinidad. Un mejor ordenamiento implica una mejor dispersión de las moléculas de clorofila ***a*** adsorbidas sobre la superficie del soporte confiriéndole además una mayor estabilidad. En la naturaleza, las clorofilas se encuentran tanto en forma de agregados como en complejos clorofila-proteína. En los complejos pigmento-proteína, la matriz de proteína actúa como soporte de las clorofilas. Esto asegura una distancia y orientación de las moléculas de clorofila. Sin embargo siempre existe la posibilidad de que dicho ordenamiento sea defectuoso, de tal manera que el estado excitado de la molécula sea de corta duración y se relaje por la rápida conversión interna a su estado basal. Si se logra un mejor orden de las moléculas de clorofila entonces este proceso es insignificante (Vernon y Seely, 1966). La clorofila ***a*** retenida en las hidrotalcitas de Mg/Al = 3 y de Zn/Al = 3 se mantiene estable y no se observa feofitinización incluso después de 1 mes a pesar de que los sólidos se almacenaron a temperatura ambiente y bajo luz tenue. Esto indica que el presente método de estabilización es eficiente.

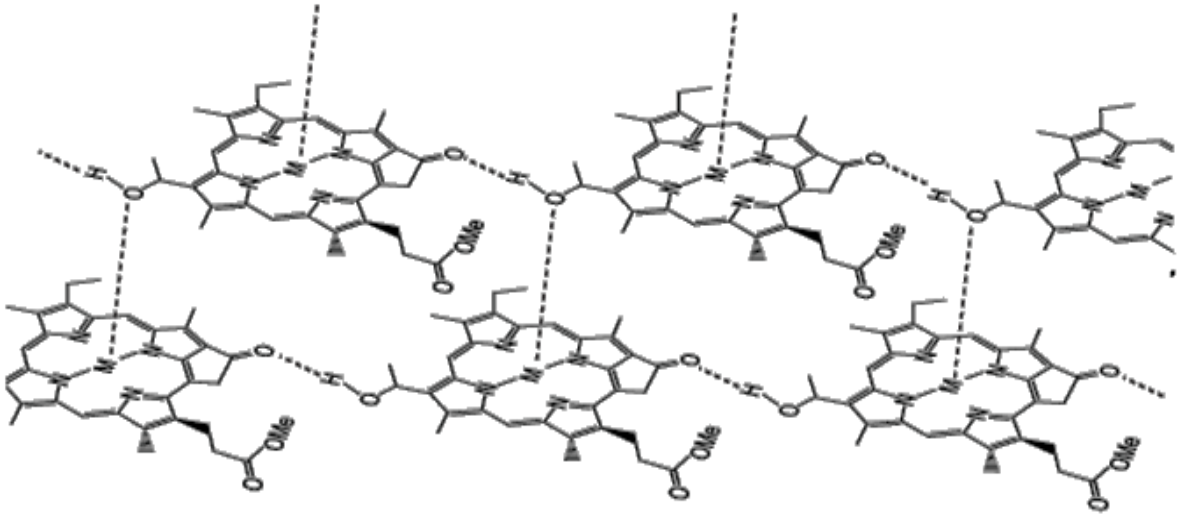


Figura 3.37. Ordenamiento de las moléculas de clorofila con el grupo fitilo reemplazado por grupos metilo. Los grupos OH pueden enlazarse con el ion central (M) y servir como donador. Los grupos carboxílicos pueden servir como aceptores. *Tomado de Pale, 2011.*

CONCLUSIÓN

La clorofilina puede retenerse en las hidrotalcitas en un proceso de un solo paso, ya sea por efecto memoria o por coprecipitación simultánea. Dependiendo del uso del agente coprecipitante (NaOH) o de la irradiación con microondas, tanto la morfología como la porosidad de las muestras pueden controlarse. Además, estas condiciones determinan la cantidad y el arreglo de las moléculas de clorofilina en la hidrotalcita: entre las láminas o en las bocas de los poros. Es importante notar que la irradiación con microondas propicia la mesoporosidad y áreas superficiales pequeñas. El método de regeneración promueve la intercalación de la clorofilina en hidrotalcitas. En todos los casos se obtienen materiales híbridos estables; por lo tanto las moléculas de clorofilina están bien dispersas y unidas a través de los grupos OH de las hidrotalcitas. Tales características son necesarias para llevar a cabo experimentos sobre la fotosíntesis artificial. Además, los híbridos resultantes no son tóxicos ya que están constituidos por clorofilina e hidrotalcita que, por cierto, se utiliza como antiácido estomacal. Por lo tanto, se pueden utilizar como complemento alimenticio o como colorante de alimentos.

Por sus características, la clorofila ofrece una posibilidad muy tentadora en la terapia fotodinámica (TFD). La TFD se usa en terapias contra el cáncer. Los derivados de clorofila como la clorofilina se utilizan como sensibilizadores en TFD. Desafortunadamente la mayoría de estas moléculas son muy inestables en presencia de luz y temperatura y las clorofilas naturales son además insolubles en agua. Sin embargo las moléculas de clorofila modificadas químicamente o retenidas en soportes como las hidrotalcitas muestran una mejor estabilidad y capacidad de ajuste para las necesidades de la TFD.

La clorofila ***a*** ha sido exitosamente inmovilizada en la superficie externa de las hidrotalcitas. La estabilidad de la clorofila adsorbida se ve afectada por la naturaleza del catión M^{II}: Zn/Al(3) > Mg/Al(3) > Ni/Al(3), de la relación molar M^{II}/Al: Mg/Al(4)-MW = Mg/Al(3)-MW = Mg/Al(2)-MW > Ni/Al(2)-MW = Ni/Al(3)-MW > Ni/Al(4)-MW y por el hidrotatamiento en la síntesis de las hidrotalcitas: Mg/Al(3)-MW > Ni/Al(3)-MW. La extracción de la clorofila ***a*** de las hidrotalcitas con acetona revela una alta estabilidad

incluso después de 10 y 30 días. Se espera además, que los híbridos obtenidos en este trabajo y a *posteriori*, puedan emplearse como unidades constructoras para obtener fotoantenas para la recolección de la energía luminosa o como sensores para canalizarla, o bien, como motores moleculares.

REFERENCIAS

- Abelló, S., Medina, F., Tichit, D., Pérez-Ramírez, Cesteros, Y., Salagre, P., Sueiras, J.E., **2005**, *Chem. Comm.*, 1453.
- Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiya, H., Rees, D.C., **1987**. *PNAS*, 84, 6162.
- Araki, S., Oohusa, T., Omata, T., Murata N., **1984**. *Plant Cell Physiol.*, 25, 841.
- Aramendía, M.A., Avilés, Y., Borau, V., Luque, J.M., Marinas, J.M., Ruiz, J.R., Urbano, F.J., **1999**. *J. Mater. Chem.*, 9, 1603.
- Armstrong. G. A., **1998**. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 43, 87.
- Arnoff, S., **1966**. In: *The Chlorophylls* eds L.P. Vernon y G.R. Seely. Academic Press, New York, pp. 3-20.
- Bai, C., Reilly, C.C., Wood, B.W., **2006**. *Plant Physiol.*, 140, 433.
- Bailar, J.C., Emeléus, H.J., Nyttorm, S.R., Dickenson, A.F.T., **1973**. *Comp. Inorg. Chem*, Ed. Board, Pergamon Press. 1ª ed.
- Barret, J., Jeffrey, S.W., **1964**. *Plant Physiol*. 33, 44. **1971**. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 7, 255.
- Beale, S.I., **1999**. *Photosynth*. *Res*. 60, 43.
- Beale, S.I., Weinstein, J.D., **1991**. In *Biosynthesis of Tetrapyrroles*, ed. P.M., Jordan, Elsevier, Amsterdam, pp. 155-235.
- Bégu, S., Aubert-Pouëssel, A., Polexe, R., Leitmanova, E., Lerner, D.A., Devoisselle, J-M, Tichit, D., **2009**. *Chem. Mater.*, 21, 2679.
- Belloto, M., Rebours, R., Clause, D., Lynch, J., Bazin, D., Elkim, E., **1996**. *J. Phys. Chem.*, 100, 8527.
- Benito, P., Labajos, F.M., Rives, V., **2006a**. *J. Solid State Chem.*, 179, 3784. Benito, P., Labajos, F.M., Rocha, J., Rives, V., **2006b**. 94, 148.
- Benito, P., Labajos, F.M., Rives, V., **2009**. *Pure Appl. Chem.*, 81, 1459.
- Bergadà, O., Salagre, P., Cesteros, Y., Medina, F., Sueiras, J.E., **2007a**. *Adsorp. Sci. Tech*., 25, 143.
- Bergadà, O., Vicente, I., Salagre, P., Cesteros, Y., Medina, F., Sueiras, J.E.

2007b. *Microporous Mesoporous Mater.*, 101, 363.

- Bjørnland, T., **1984**. *Biochem. Syst. Ecol*. 12, 279.
- Bjørnland, T., Borch, G., Liaaen-Jensen, S., **1984**. *Phytochem.*, 23, 1711.
- Bjørnland, T., Tangen, K., **1979**. *J. Phycol.* 15, 457.
- Blankenship, R.E., **2002**. Molecular Mechanisms of Photosynthesis, Blackwell Publishing, USA.
- Britton, G., Goodwin, T.W., **1971**. *Methods Enzymol*., 18C, 654.
- Bröcker, F., Kainer, L., **1971**. US Patent 1, 342, 020 1971.
- Cavani, F., Trifiro, E., Vaccari, A., **1991**. *Catal. Today*, 11, 173
- Chapman, D.J., Haxo, F.T., **1963**. *Plant Cell Physiol.*, 4, 59.
- Chiari, G., Giustetto, R., Druzik J., Doehne E., Ricchiardi G., **2008**. *J. Appl. Sci. & Process.*, 90, DOI 10.1007/s00339-007-4287-z.
- Choy, H., Choi, S.J., Oh, J.M., Park, T., **2007**. *Appl. Clay Sci.,* 36, 122.
- Clifford, J.C., Runquist O., Campbell M.M, **1980**. *Análisis Espectral de Compuestos Orgánicos*, 2ª Impesión, Editorial Diana, México.
- Cotton, F.A., Wilkinson, G., **1986**. Química Inorgánica Avanzada, 4ta Ed.
- Curtis, N.F., Curtis, Y.M., **1965**. *Inorg. Chem.*, 4, 804.
- Dalponte, M.P., Melio, C.B., Massabni, A.C., Molina, M., **1984**. *Rev. Chim. Miner.*, 21, 45.
- Davies, B.H., **1965**. In *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments,* 1st ed., ed. T.W. Goodwin, Academic Press., London, pp. 489-532.
- Di Cosimo, I., Díez, V.K., Xu, M., Iglesia, E., Apesteguía, C.R., **1998**. *J. Catal*., 178, 499.
- Dolphin, D., **1978**. In *Physical Chemistry, Part A.* Academic Press, New York.
- Dolphin, D., **1983**. In *Chromatography: Fundamentals and applications of Chromatographic and Electrophoretic Methods,* Pt. B: *Applications*, ed. E. Heftmann, Elsevier, Amsterdam, pp. B377-406.
- Evans, D.G., Slade, R.C.T., **2006**. *Struct. Bond*, 119, 1.
- Farag, A.A.M., Mansour, A.M., Ammar, A.H., Abdel-Rafea, Farid M.A.M., **2012**. *J. Alloys Comp.*, 513, 404.

- Ferruzzi, M., Schwartz, S.J., **2005**. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 7098.
- Fetter, G., Bosch, P., **2010**. In *Pillared Clays and Related Catalysts*, eds., A. Gil, S.A. Korili, R. Trujillano, M.A. Vicente, Springer, New York, pp. 1-21.
- Fetter, G., Olguín, M.T., Bosch, P., Bulbulian, S., **2000**. *J. Porous Mater.*, 7, 469.
- Fiksdahl, A., Witers, N., Guillard, R.R.L., Liaaen-Jensen, S., **1984b**. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B, 265.
- Gastuche, M.C., Brown, G., Mortland, M., **1967**. *Clay Miner*., 7, 177.
- Gil, A., Corili, S.A., Vicente, M.A., **2008**. *Catal. Rev. Sci. Eng*., 50, 153.
- Goodwin, T.W., **1955**. In *Modern Methods of Plant Analysis,* Vol. 3, ed. K. Paech y M.V. Tracey. Springer-Verlag, Berlin, pp. 272-311.
- Gouterman, M., **1961**. *J. Molec. Spectroscopy*, 6, 138.
- Gregg, S.J., Sing, S.W., **1982**. *Adsorption, Surface Area and Porosity*, Academic Press, London.
- Grimm, B., Porra, R.J., Rüdiger, W., Scheer, H., **2006**. *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls*. Springer, Netherlands.
- Haxo, F.T., **1985**. *J. Phycol.*, 21, 282.
- Hiyama, T., Nishimura, M., Chance, B., **1969**. *Anal. Biochem.*, 29, 339.
- Ibarra, I.A., Loera S., Laguna H., Lima E., Lara V., **2005**. *Chem. Mater.*, 17, 5763.
- Ishii; A, Itoh; T, Kageyama; H, Mizoguchi; T, Kodera; Y, Matsushima; A, Torii; K, Inada; Y., **1995**. *Dyes and* Pigments, 28, 77.
- Ishiwatari, M., Ishiwatari, R., Sakashita, H., Tatsumi, T.J., **1995**. *Analyt. Appl. Pyrol*., 35, 237.
- Itoh; T, Ishii; A, Kodera; Y, Matsushima; A, Hiroto; M, Nishimura; H, Tsuzuki; T, Kamachi; T, Okura; I, Inada; Y., **1998**. *Bioconjugate Chem.*, 9, 409.
- Jeffrey, S.W., **1968a**. *Biochem. Biophys. Acta*, 162, 271. **1968b**. *Nature*, 220, 1032. **1968c**. *Biol. Bull.*, 135, 141. **1969**. *Biochem. Biophys. Acta*, 177, 456. **1972**. *Biochem. Biophys. Acta*, 279, 15. **1974**. *Mar. Biol.*, 26, 101. **1981**. *Limnol. Oceanogr.*, 26, 191.
- Jeffrey, S.W., Hallegraeff, G.M., **1980a**. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 3, 265.
- Jeffrey, S.W., Wright, S.W., **1987**. *Biochem. Biophys. Acta*, 894, 180.

- Jeffrey,S.W., Sielicki, M., Haxo, F.T., **1975**. *J. Phycol.*, 11, 374.
- Jensen, A., **1978**. In *Handbook of Physiological Methods: Physiological and Biochemical Methods*, ed. J.A. Hellebust and J.S. Cragie,. Cambridge University Press., Cambridge, pp. 59-70.
- Kloprogge, T., Frost, R.L., **1999**. *Phys. Chem. Chem. Phys*., 1,1641.
- Klucas, R.V., Hanus, F.J., Russell, S.A., Evans, H.J., **1983**. *Proc. Na. Acad. Sci. U.S.A.*, 80, 2253.
- Li, F., Duan, X., **2006**. *Struct. Bond*., 119, 193.
- Liaaen-Jensen, S., **1971**. In *Caarotenoids*, ed. O. Isler, Birkhäuser, Basel, pp. 68-188.
- Liaaen-Jensen, S., **1985**. *Pure Appl. Chem.*, 57, 649.
- Lima, E., Bosch, P., Loera, S., Ibarra, I.A., Laguna, H., Lara, V., **2009**. *Applied Clay Sci.,* 42, 478.
- Lubian, L.M., Establier, R., **1982**. *Inv. Pesq.*, 46, 379.
- Mackinney, G., **1941**. *The J. Biolog. Chem.*, 140, 315.
- Mandal, S., Tichit, D., Lerner, D.A., Marcotte, N., **2009**. *Langmuir*, 25, 18, 10980.
- Mandelli, E.F., **1968**. *J. Phycol*., 4, 347.
- Mascolo, G., Marino, O., **1980**. *Miner. Mag.,* 43, 619.
- Matile, Ph., **1987**. *Chimia*, 41, 376.
- Matile, Ph., Hörtensteiner, St., Thomas, H., Kräutler, B., **1996**. *Plant. Physiol.*, 112, 1403.
- Murata, S., Hideo, H., Tatsuo, K., Yoshiyuki, S., Kazuyuki, K., **2001**. *Chem. Mater.*, 13, 8, 2722.
- Omata, T., Murata, N., **1983a**. *Plant Cell Physiol.*, 24, 1093.
- Pale,V., **2011**. *Improving the optical properties of chlorophyll aggregates with supramolecular design*. Tésis.
- Paredes, S.P., Fetter, G., Bosch, P., Bulbulian, S., **2006**. *J. Mater. Sci.,* 41, 3377.
- Parsons, T.R., **1963**. *J. Mar. Res.*, 21, 164.
- Pérez-Ramírez, J., Mul, G., Kapteijn, F., Moulijn, J.A., **2001**. *J. Mater. Chem.*, 11, 821.

- Porra, R.J., **1997**. *Photochem. Photobiol*. 65, 492.
- Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann, P.E., **1989**. *Biochim. Biophys. Acta*, 16 975, 384.
- Pretsch E., Bühlmann P., Affolter C., **2000**. *Structure Determination of Organic Compounds*, Springer, Zürich,
- Prinetto, F., Ghiotti, G., Durand, R., Tichit, D., **2000**. *J. Phys. Chem. B*, 104, 11117.
- Ran, S., Zhu, Y., Huang, H., Liang, B., Xu, J., Liu, B., Zhang, J., Xie, Z., Wang, Z., Ye, J., Chen, D., Shen, G., **2012**. *Cryst. Eng. Comm.*, 14, 3063.
- Reichle, W.T., **1986**. *Solid State Ionics*, 22, 135.
- Ricketts, T.R., **1966a**. *Phytochemestry*, 5, 223. **1967c**. *Phytochemestry*, 6, 1375.
- Rivera J.A., Fetter G., Jiménez Y., Xochipa M.M., Bosch P., **2007**. *Appl. Catal. A: General*, 316, 207.
- Rivera, J.A., Fetter, G., Bosch, P., **2006**. *Microporous and Mesoporous Mater.*, 89, 314.
- Rives, V., Kannan, S., **2000**. *J. Mater. Chem.*, 10, 489.
- Rives, V., Ulibarri, M.A., **1999**. *Coord. Chem. Rev.*, 181, 61.
- Rosen, W., Busch, D.H., **1970**. *Inorg. Chem.*, 9, 262.
- Rouquerol, F., Rouquerol, J., Sing, K., **1999**. In *Principles, Methodology and Applications*, Academic Press, San Diego.
- Sampieri, A., Fetter, G., Pfeiffer, H., Bosch, P., **2007**. *Solid State Sci.*, 9, 394.
- Scheer, H. **1991**. In: *Chlorophylls*, ed. H. Scheer, CRC Press Boca Raton, FL, pp 3-30.
- Seely, G.R., Cannolly, J.S. In: *Light Emission by Plants and Bacteria*, eds Govindjee, J. Amesz and D.C. Fork, Academic Press, Orlando, FL, pp.99-133.
- Sels, B.F., De Vos, D.E., Jacobs, P.A., **2001**, *Catal. Reviews*, 43, 443.
- Sestak, Z., **1967**. *Photosynthetica*, 1, 267. **1982**. *Photosynthetica*, 2, 568.
- Smith, W.A., **2001**. *Mutat. Res.*, 480, 97.
- Sommer A.E., Fetter G., Bosch P., Lara V.H., **2010**. *Clays Clay Miner*., 58, 340.

- Sommer, A.E., Fetter G., Bosch P., **2009**. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Solicitud de patente.
- Sommer, A.E., Rivera, J.A., Fetter, G., Bosch, P., **2006**. *Rev. Mex. Ing. Quim.*, 5, 245.
- Sommer, A.E., Rivera, J.A., Fetter, G., Bosch, P., **2006**. Rev. Mex. Ing. Quím. 5, 245.
- Souza, P., 1975. *Tecnologia de Argilas Vol.1 – Fundamentos,* Ed. da USP- Ed. Edgard Blücher Ltda., Sao Paulo.
- Souza, P., Vieira, A.C., **1988**. *Rev. Bras. Eng. Quim.* 11, 35.
- Standfuss, J., Terwisscha, A.C., Scheltinga, V., Lamborghini, M., Kühlbrandt, W., **2005**. *EMBO J.*, 24, 919.
- Stoll, A. **1912**. Acerca de la clorofila y clorofilida. Tesis, ETH No. 49.
- Strain, H., **1954**. *Arch. Biochem. Biophys.*, 48, 458-68. **1958**. 32nd Annual Priestley Lecture. University Park, PA: Penn State University Press.
- Strain, H., Svec, W.A., **1966**. In *The Chlorophylls*, ed. L.P. Vernon and G.R. Seeley, Academic Press, New York, pp. 22-66. **1969**. *Adv. Chromatogr*. 8, 119.
- Sutton, D. **1975**. *Espectros electrónicos de los Metales de Transición*, Ed. Reverte, S.A.
- Suzuki, J.Y., Bollivar, D.W., Bauer, C.E., **1997**. *Ann. Rev. Gen*. 31, 61.
- Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, N.K., Yoshida K., Okada, K., **1998**. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 95, 12719.
- Thanpitcha, T., Sirivat, A., Jamieson, A.M., Rujiravanit, R., **2008**. *Macromol. Symp*. 264, 168.
- Thomas, D.M., Goodwin, T.W., **1965**. *J. Phycol.*, 1, 118.
- Tichit, D., Lutic, D., Coq, B., Durand, R., Teissier, R., **2003**. *J. Catal*. 219, 1, 167.
- Trifiro, F., Vaccari, A., **1996**. *Comp. Sup. Chem*., 7, 251.
- Tswett, M., **1906a**. *Ber. Deutsh. Bot. Ges.*, 24, 316. **1911**. *Ber. Deutsh. Bot. Ges.*, 29, 630.
- Valencia, F., Romero, A.H., Hernández, E., Terrones, M., Terrones, H., **2003**. *New J. Phys*., 5, 123.
- Vernon, L.P., Seely, G.R., **1966**. *The Chlorophylls*, Academic Press, New York.

- Watanabe, T.; Hongu, A.; Honda, K.; Nakazato, M.; Konno, M.; Saitoh, S. **1984**. *Anal.Chem.*, *56*, 251.
- Weber, A., Czygan, F.C., **1972**. *Arch. Mikrobiol.*, 84, 243.
- Whiters, N.W., Alberte, R.S., Lewin, R.A., Thomber, J.P., Britton, G., Goodwin, T.W., **1978a**. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 75, 2301.
- Wright, S.W., **1987**. *Australian Nat. Antartic Res. Note*, 115, 58.
- Wright, S.W., Jeffrey, S., Mantoura, R., **1997**. In *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods,* eds S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura y S.W. Wright, UNESCO: Paris, pp. 261–282.
- Yang, W., Kim, Y., Liu, P.K., Sahimi, M., Tsotsis, T., **2002**. *Chem. Eng. Sci*., 57,15, 2945.
- Yokohama, Y. **1981a**. *Bot. Mar.*, 24, 637. **1983**. *Bot. Mar.*, 26, 45.

LISTA DE FIGURAS

1.1 Fórmula estructural de la clorofila ***a*** y su sistema de numeración IUPAC (izquierda) y la más antigua de Fischer (derecha)…..... 13

1.2 Estructura de las clorofilas *a*, *b*, *c* y *d*..... 15

1.3 Espectros de absorción (izquierda) y fluorescencia (derecha) de la clorofila ***a*** en éter……. 17

1.4 Diagrama de orbitales moleculares de los noveles de energía de una porfirin, del grupo clorin y del grupo bactereoclorin……. 18

1.5 Cambios de densidad electrónica asociados a las transiciones Q_x y Q_y de la bactereoclorofila ***a***…… 19

1.6 Esquema general de la hidrólisis de la clorofila ***a***……. 29

1.7 Estructura de la feofitina ***a***…… 31

1.8 Estructura de la feoforbida…… 31

1.9 Estructura de la clorofilida ***a***…….. 32

1.10 Clorofilina de cobre y sodio..... 33

1.11 Esquema de composición de una hoja en las plantas superiores..... 35

1.12 Estructura y funcionamiento de los pigmentos antena…..... 37

1.13 (a) Esquema general de transferencia electrónica en los centros de reacción fotosintéticos…… 39

1.14 Diagrama esquemático del proceso de transferencia electrónica acíclico encontrado en los organismos aerobios…… 40

1.15 Representación de una lámina de brucita..... 43

1.16 Estructura de una hidrotalcita..... 44

2.1 Procedimiento de separación de los pigmentos fotosintéticos por TLC..... 58

2.2 Procedimiento de separación de los pigmentos fotosintéticos por columna……. 59

2.3 Dimensiones del macrociclo de la clorofila ***a*** calculado por Material Studio…..... 60

2.4 Esquema general de preparación de los híbridos Chl *a*/HT…… 61

2.5 Diagrama de bloques de un espectrofotómetro de fluorescencia…….. 72

3.1 Técnicas de caracterización de hidrotalcitas.……. 75

3.2 Difractogramas de rayos X de las muestras iniciales Mg/Al(2)-MW, Mg/Al(3)-MW y Mg/Al(4)-MW; Ni/Al(2)-MW, Ni/Al(3)-MW y Ni/Al(4)-MW; Zn/Al(2)-MW, Zn/Al(3)-MW y Zn/Al(4)-MW. *Zincita……..... 77

3.3 Espectros de infrarrojo de las muestras iniciales de Mg/Al y de Ni/Al de diferentes relaciones molares..... 81

3.4. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno de las muestras de Mg/Al y Ni/Al sintetizadas con irradiación de microondas…… 83

3.5 Distribuciones de tamaño de poro de las muestras de Mg/Al y Ni/Al con diferentes relaciones molares sintetizadas con microondas..... 85

3.6 Micrografias electrónicas de barrido de las muestras Mg/Al(2)-MW x50.0k; Mg/Al(3)-MW (a) x50.0k, (b)x25.0k y Mg/Al(4)-MW (a) x50.0k, (b) x15.0…….. 86

3.7 Micrografias electrónicas de barrido de las muestras Ni/Al(2)-MW (a) x50.0k, (b) x25k; Ni/Al(3)-MW (a) x50.0k, (b)x20.0k y Ni/Al(4)-MW (a) x50.0k, (b) x100.0k..... 88

3.8 Análisis termogravimétricos de las hidrotalcitas de Mg/Al y Ni/Al de

diferentes relaciones molares sintetizadas con irradiación de microondas..... 90

3.9 Espectros de absorción de las muestras de Mg/Al y Ni/Al de diferentes relaciones molares obtenidos por espectroscopia ultravioleta visible de reflectancia difusa..... 93

3.10 Espectros de emisión de fluorescencia de las muestras de Mg/Al y Ni/Al de diferentes relaciones molares..... 94

3.11 Difractogramas de rayos X de las muestras Mg/Al(3), Ni/Al(3) y Zn/Al(3)..... 96

3.12 Espectros de absorción de las muestras Mg/Al(3), Ni/Al(3) y Zn/Al(3) obtenidos por espectroscopia ultravioleta visible de reflectancia difusa..... 97

3.13 Espectros de emisión de fluorescencia de las muestras Mg/Al(3), Ni/Al(3) y Zn/Al(3)..... 98

3.14 Patrones de difracción de rayos X de los híbridos clorofilina-hidrotalcita (a) sintetizadas por efecto memoria y (b) métodos de cooprecipitación simultánea..... 99

3.15 Espectros de infrarrojo de la clorofilina y de la muestra S-OHMW..... 103

3.16 Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno de los híbridos clorofilina-hidrotalcita..... 105

3.17 Distribución de tamaño de poro de los híbridos clorofilina-hidrotalcita..... 107

3.18 Curvas ATG/ATD de los híbridos clorofilina-hidrotalcita..... 108

3.19 Espectros de absorción de UV-Vis a) clorofilina, b) híbridos preparados por efecto memoria y c) híbridos preparados por

coprecipitación simultánea……. 111

3.20 Placas para cromatografía en capa fina con los pigmentos separados, extraídos por el método A y por el método B…… 114

3.21 Espectros de absorción UV-Vis de los pigmentos obtenidos por cromatografía de capa fina..... 115

3.22 Columna de separación de los pigmentos fotosintéticos……. 116

3.23 Espectros de absorción UV-Vis de la clorofila ***a*** en acetona y en éter…… 117

3.24 Espectros de emisión de fluorescencia de la clorofila ***a*** en acetona y en éter…… 118

3.25 Espectros de absorción (UV-Vis) y emisión (fluorescencia) de la feofitina ***a*** en acetona…….. 119

3.26 Patrones de difracción de rayos X de los híbridos clorofila ***a***-hidrotalcita de diferente composición metálica (Mg, Ni o Zn) de relación 3…….. 121

3.27 Espectros de absorción (a) (UV-Vis de reflectancia difusa) y emisión (b) (fluorescencia) de las muestras Chl-Mg/Al(3), Chl-Ni/Al(3) y Chl-Zn/Al(3)…… 122

3.28 Espectros de absorción UV-Vis de la clorofila ***a*** extraída con acetona de los híbridos Chl-Mg/Al(3), Chl-Ni/Al(3) y Chl-Zn/Al(3)….. 125

3.29 Patrones de difracción de rayos X de los híbridos Chl-Mg/Al(2)-MW, Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Mg/Al(4)-MW……. 127

3.30 Espectros de absorción (a) (UV-Vis de reflectancia difusa) y emisión (b) (fluorescencia) de los híbridos Chl-Mg/Al(2)-MW, Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Mg/Al(4)-MW..... 128

3.31 Espectros de absorción UV-Vis de la clorofila ***a*** extraída con acetona de los híbridos Chl-Mg/Al(2)-MW, Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Mg/Al(4)-MW……. 130

3.32 Espectros de absorción (a) (reflectancia difusa UV-Vis) y emisión (b) (fluorescencia) de los híbridos Chl-Mg/Al(3), Chl-Ni/Al(3), Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Ni/Al(3)-MW……..... 132

3.33 Espectros de absorción UV-Vis de la clorofila ***a*** extraída con acetona de los híbridos Chl-Mg/Al(3), Chl-Ni/Al(3), Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Ni/Al(3)-MW …… 133

3.34 Espectros de absorción (a) (UV-Vis de reflectancia difusa) y emisión (b) (fluorescencia) de los híbridos Chl-Mg/Al(3), Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Zn/Al(3) preparados del contacto de las hidrotalcitas con la clorofila ***a*** disuelta en éter..... 134

3.35 Espectros de absorción UV-Vis de la clorofila ***a*** extraída con acetona de los híbridos Chl-Mg/Al(3), Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Zn/Al(3) preparados del contacto de las hidrotalcitas con la clorofila ***a*** disuelta en éter..…… 135

3.36 Espectros de absorción UV-Vis de la clorofila ***a*** extraída con acetona de los híbridos Chl-Mg/Al(3)-MW, Chl-Mg/Al(3) y Chl-Zn/Al(3) después de 10 y 30 días……..... 136

3.37 Figura 3.37. Ordenamiento de las moléculas de clorofila con el grupo fitilo reemplazado por grupos metilo……..... 139

LISTA DE TABLAS

1.1 Propiedades espectroscópicas de las clorofilas *in vitro*[a]……..... 21

1.2 Nombre, fórmula química, parámetros de red y simetría de algunas hidrotalcitas naturales..... 45

1.3 Iones que forman HTs y sus radios iónicos……..... 46

1.4 Distancia interlaminar **d**(Å) de algunas HTs con diferentes aniones intercalados…….. 47

2.1 Condiciones de síntesis de las HTs……. 54

2.2 Condiciones de síntesis de las muestras con clorofilina de cobre….. 56

2.3 Denominación de los híbridos…… 61

3.1 Composición química de las hidrotalcitas de Mg/Al y Ni/Al determinadas por ICP-OES y análisis elemental…….. 80

3.2 Pérdida de masa de las muestras de Mg/Al y Ni/Al…….. 91

3.3. Transiciones permitidas de espín del ion Ni^{II}……. 92

3.4 Comparación de la composición elemental de las muestras…….. 101

3.5 Características principales de los híbridos……..... 109

3.6 Longitudes de onda de la clorofila ***a*** en acetona y éter y de la feofitina ***a*** en acetona……..... 119

3.7 Longitudes de onda de absorción y emisión asociadas a la clorofila ***a*** adsorbida en las hidrotalcitas de Zn/Al, Mg/Al y Ni/Al……..... 123

3.8 Longitudes de onda de la clorofila ***a*** en acetona desorbida de los híbridos de Chl-Zn/Al(3), Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Ni/Al(3)-MW…….... 126

3.9 Longitudes de onda de absorción y emisión asociadas a la clorofila ***a*** adsorbida en las hidrotalcitas de Mg/Al de diferentes relaciones molares (2,3 o 4) tratadas hidrotérmicamente con irradiación de microondas……... 129

3.10 Longitudes de onda de absorción de la clorofila ***a*** extraída con acetona de los híbridos Chl-Mg/Al(2)-MW, Chl-Mg/Al(3)-MW y Chl-Mg/Al(4)-MW…… 131