



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Programa de Doctorado en Síntesis y Reactividad Química

**FUNCIONALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
NANOZEOLITAS PARA SU APLICACIÓN COMO  
MARCADORES DE BIOSENSORES  
ELECTROQUÍMICOS**

Tesis Doctoral

**Javier Calleja García**

Directores

**Dr. Fco. Javier García Alonso**

Catedrático en Química Inorgánica

Universidad de Oviedo

**Dr. Manuel Moliner Marín**

Científico Titular del CSIC

Instituto de Tecnología Química (ITQ-UPV)

Junio – 2019

Oviedo











## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Funcionalización y caracterización de nanozeolitas para su aplicación como marcadores de biosensores electroquímicos	Inglés: Functionalization and characterization of nanozeolites as possible tags for electrochemical biosensors
2.- Autor	
Nombre: JAVIER CALLEJA GARCÍA	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: SÍNTESIS Y REACTIVIDAD QUÍMICA	
Órgano responsable: DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA	

### RESUMEN (en español)

Dada la experiencia previa de nuestro grupo en la funcionalización de nanopartículas de fosfato de titanio (NPFT), y teniendo en cuenta que las NPFT y las nanozeolitas (NZ) poseen una capacidad similar para intercambiar cationes y para ser funcionalizadas, decidimos iniciar una colaboración con el grupo del Dr. Manuel Moliner Marín (ITQ-UPV), experto en el campo de las zeolitas, y el grupo del Profesor Agustín Costa (Departamento de Química Analítica de la Universidad de Oviedo), experto en electroquímica, para estudiar la funcionalización y bioconjugación de nanozeolitas cargadas con cationes electroquímicamente activos, con el objetivo final de preparar nuevas marcas para biosensores electroquímicos.

En una primera etapa, logramos incorporar cationes de  $Cd^{2+}$  a la nanozeolita H-Beta por tratamiento con una disolución acuosa de  $Cd(CH_3COO)_2$ . Posteriormente, las nanopartículas resultantes fueron funcionalizadas con distintas aminas y poliaminas: n-octilamina, OA, 1,8-octanodiamina, ODA, tris(2-aminoetil)amina, TREN, y poli(hidrocloruro de alilamina), PAH. Los productos resultantes fueron caracterizados mediante FTIR, RMN de sólido de C-13 (CPMAS), DRX y HR-TEM, que pusieron de manifiesto la elevada tendencia de estas zeolitas a la agregación. Seguidamente, las



zeolitas cargadas únicamente con  $\text{Cd}^{2+}$  o cargadas con cadmio y recubiertas con ODA y PAH fueron bioconjugadas con neutravidina, NAV, por reacción directa o usando glutaraldehído como puente entre las zeolitas y la proteína.

En una segunda etapa, y usando la nanozeolita comercial CP814E como modelo, la nanozeolita H-Beta fue cargada con concentraciones superiores de  $\text{Cd}^{2+}$ , siendo funcionalizadas ambas nanozeolitas con (3-aminopropil)triétoxissilano, APTES, que se ancló en su superficie. Las nanopartículas resultantes fueron caracterizadas por RMN de sólido de Si-29 (CPMAS y BD), análisis textural: adsorción de  $\text{N}_2$ , ICP-MS y FTIR. Posteriormente, las nanozeolitas fueron bioconjugadas con la NAV, con la ayuda del glutaraldehído. Las micrografías de HR-TEM mostraron que el empleo de APTES no logró evitar la aglomeración de las nanozeolitas.

Finalmente, se prepararon nuevas nanozeolitas H-Beta incorporando cationes  $\text{Cu}^{2+}$  durante el proceso de síntesis. De todas ellas, se escogió la nanozeolita CuBeta\_23 para ser funcionalizada con APTES y bioconjugada con NAV por ser la nanozeolita que contenía más cobre y con mejor distribución, tal como indicaron las micrografías FE-SEM. Usando una suspensión de agarosa en agua se logró dispersar homogéneamente la nanozeolita resultante. De este modo, se logró que la NAV enlazada a la CuBeta\_23 se uniera selectivamente a la biotina anclada en un electrodo (un paso imprescindible en la preparación de marcas para biosensores). No obstante, la reproducibilidad de estas medidas fue baja.



## RESUMEN (en Inglés)

Our group is interested in metal-based nanoparticles as labels for electrochemical biosensors. Thus, we were able to load titanium phosphate nanoparticles with several electroactive metals (cadmium, bismuth, silver, mercury and copper) and then, to bioconjugate the resulting nanoparticles with neutravidin. Finally, we studied their application as tags for electrochemical biosensors in collaboration with the electroanalytical team of Prof. A. Costa (University of Oviedo). As far as nanozeolites are ion exchangers and they can also be functionalized, it seemed plausible that they could be appropriate candidates to be converted into tags for electrochemical biosensors. Therefore, we contacted the zeolite group of Dr. M. Moliner from the ITQ (Valencia), to explore this possibility.

In a first stage,  $\text{Cd}^{+2}$  ions were incorporated into H-Beta nanozeolite by treating it with a cadmium acetate water solution. After that, the resulting nanoparticles were functionalized with several amines and polyamines including n-octylamine, OA, 1,8-octanodiamine, ODA, tris(2-aminoethyl)amine, TREN, and poly(allylamine), PAH. The obtained nanozeolites were characterized by FTIR,  $^{13}\text{C}$  CPMAS solid NMR, XRD and HR-TEM techniques, which revealed a strong tendency of these nanozeolites to the aggregation. Later, the nanozeolites charged with cadmium ions, or loaded with cadmium (II) cations and functionalized with ODA and PAH, were bioconjugated with neutravidin by direct reaction or using glutaraldehyde as a bridge between the nanoparticles and the protein, respectively.

In a second stage, and using the commercial zeolite CP814E as a model, the H-Beta nanozeolite was first loaded with higher cadmium concentration following an iterative method and then, both nanozeolites were functionalized with (3-





aminopropyl)triethoxysilane, APTES, which was anchored on their surface. The resulting products were characterized by  $^{29}\text{Si}$  solid NMR (CPMAS and BD), BET surface determination, ICP-MS, and FTIR techniques. Later, these nanozeolites were bioconjugated with neutravidin using glutaraldehyde as a bridge. The HR-TEM micrographs of H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu showed that the tendency to agglomeration could not be avoided using APTES instead of the amines used previously.

Finally, it was accomplished the synthesis of a new type of beta zeolites, incorporating copper (II) as electroactive cation during the hydrothermal process. One of them, the nanozeolite CuBeta\_23, with higher and better distributed  $\text{Cu}^{2+}$  cations (as it was shown using the FE-SEM technique, was functionalized with APTES and later bioconjugated with neutravidin (with the help of glutaraldehyde). By using an agarose suspension in water, the resulting zeolites were dispersed homogeneously. In this way, the NZ ( $\text{M}^{n+}$ ) – NAV platforms, prepared with the CuBeta\_23, were able to bind specifically to biotin molecules anchored on an electrode (a necessary step to be converted into a tag for electrochemical biosensor). However, the reproducibility of these measurements was low.





# Agradecimientos

Durante todos estos años, son muchas las personas a las que quiero mostrar mi más sincero agradecimiento por su contribución al desarrollo de esta tesis doctoral.

En primer lugar, a mis directores de tesis; el catedrático Fco. Javier García Alonso, por darme la oportunidad de unirme y continuar mi formación en su grupo de investigación; y el Dr. Manuel Moliner Marín, por acogerme en su laboratorio en el Instituto de Tecnología Química de Valencia, permitiéndome adquirir una gran variedad de conocimientos dentro del campo de las zeolitas, así como la posibilidad de trabajar con otros investigadores expertos en la materia.

Por otra parte, a los profesores Agustín Costa García y Avelino Corma Canós, porque sin la colaboración con sus respectivos grupos de investigación, este trabajo no habría sido posible.

A cada uno de mis compañeros de laboratorio durante todos estos años, que son muchos y todos han sido importantes por sus consejos, su colaboración y su apoyo en todo momento.

A todos los integrantes del grupo de nanobioanálisis durante estos años, por su inestimable ayuda, principalmente en el campo de la electroquímica.

A mis compañeras de laboratorio y al resto de investigadores en el ITQ, que no dudaron en ayudarme y resolverme las dudas que me fueron surgiendo relacionadas con mi investigación, además de hacer mi estancia más amena desde el primer día.

Finalmente, a mi familia, a mi novia, y a mis amigos, por el apoyo incondicional y la paciencia que han tenido durante estos años, siendo fundamentales en la realización de esta tesis doctoral.



# Índice

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1. Zeolitas .....	4
1.2. Biosensores .....	11
1.3. Objetivos .....	16
<b>2. Funcionalización de los centros ácidos de las zeolitas y posterior bioconjugación</b> .....	<b>21</b>
2.1. Incorporación del catión cadmio .....	27
2.2. Funcionalización con distintas aminas.....	30
2.2.1. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-OA .....	30
2.2.2. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA.....	34
2.2.3. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-TREN.....	37
2.2.4. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH .....	41
2.2.5. Discusión del HR-TEM de los derivados de la nanozeolita H-Beta.....	43
2.3. Incorporación de la neutravidina .....	46
2.3.1. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-NAV .....	46
2.3.2. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu.....	48
2.3.3. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu-NAV .....	50
2.3.4. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu .....	51
2.3.5. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu-NAV.....	53
<b>3. Funcionalización superficial de las zeolitas y posterior bioconjugación</b> .....	<b>57</b>
3.1. Funcionalización y bioconjugación de la nanozeolita Beta comercial .....	61
3.1.1. Incorporación del catión cadmio a la nanozeolita CP814E.....	61
3.1.2. Funcionalización de la nanozeolita CP814E con APTES .....	64
3.1.3. Incorporación del glutaraldehído a la nanozeolita CP814E.....	67
3.1.4. Bioconjugación de la nanozeolita CP814E con neutravidina .....	68
3.2. Funcionalización y bioconjugación de la nanozeolita H-Beta .....	71
3.3. Discusión del HR-TEM de los derivados de las nanozeolitas CP814E y H-Beta.....	78
<b>4. Funcionalización y bioconjugación de las nanozeolitas CuBeta preparadas por síntesis directa</b> .....	<b>83</b>

<b>4.1. Síntesis de nanozeolitas CuBeta utilizando tetraetilamonio (TEA) como ADEO .....</b>	<b>88</b>
<b>4.2. Síntesis de nanozeolitas CuBeta utilizando N-butil-N,N-dimetilciclohexilamonio (BDMC6) como ADEO .....</b>	<b>95</b>
<b>4.3. Funcionalización con grupos NH<sub>2</sub> .....</b>	<b>108</b>
4.3.1. Preparación de la nanozeolita CuBeta_23-PAH.....	108
4.3.2. Preparación de la nanozeolita CuBeta_23-APTES.....	109
<b>4.4. Incorporación del glutaraldehído.....</b>	<b>111</b>
4.4.1. Preparación de las nanozeolitas CuBeta_23-PAH-Glu y CuBeta_23-APTES-Glu .....	111
4.4.2. Discusión del HR-TEM de los derivados de la nanozeolita CuBeta_23 con Glu .....	113
<b>4.5. Incorporación de la neutraavidina .....</b>	<b>116</b>
4.5.1. Preparación de la nanozeolita CuBeta_23-APTES-Glu-NAV.....	116
<b>4.6. Ensayo de afinidad de la nanozeolita CuBeta_23-APTES-Glu-NAV .....</b>	<b>118</b>
<b>5. Perspectivas Futuras .....</b>	<b>123</b>
<b>6. Procedimiento Experimental .....</b>	<b>129</b>
<b>6.1. Zeolitas y Reactivos .....</b>	<b>131</b>
6.1.1. Reactivos.....	131
6.1.2. Síntesis de las nanozeolitas .....	132
6.1.2.1. Zeolita nanocristalina H-Beta.....	132
6.1.2.2. Zeolita nanocristalina CP814E .....	133
6.1.2.3. Síntesis directa de las nanozeolitas tipo Beta con Cu .....	133
<b>6.2. Técnicas empleadas en la caracterización de compuestos .....</b>	<b>135</b>
6.2.1. Voltamperometría.....	135
6.2.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) .....	135
6.2.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN) .....	135
6.2.4. Difracción de Rayos X (DRX) .....	136
6.2.5. Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM).....	136
6.2.6. Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) .	136
6.2.7. Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FE-SEM) .....	137
6.2.8. Análisis textural: adsorción de N <sub>2</sub> .....	137
<b>6.3. Nanozeolitas funcionalizadas con aminas orgánicas .....</b>	<b>138</b>
6.3.1. Derivados de la nanozeolita H-Beta .....	138
6.3.1.1. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd.....	138

6.3.1.2. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-OA .....	138
6.3.1.3. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA .....	139
6.3.1.4. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-TREN .....	140
6.3.1.5. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH.....	140
6.3.1.6. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-NAV.....	141
6.3.1.7. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu .....	141
6.3.1.8. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu-NAV .....	142
6.3.1.9. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu.....	142
6.3.1.10. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu-NAV.....	143
<b>6.4. Nanozeolitas funcionalizadas con APTES .....</b>	<b>144</b>
6.4.1. Derivados de la nanozeolita comercial CP814E.....	144
6.4.1.1. Preparación de la nanozeolita CP814E-Cd .....	144
6.4.1.2. Preparación de la nanozeolita CP814E-Na .....	144
6.4.1.3. Preparación de la nanozeolita CP814E-Na-Cd .....	144
6.4.1.4. Preparación de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2.....	145
6.4.1.5. Preparación de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2-APTES .....	145
6.4.1.6. Preparación de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu .....	145
6.4.1.7. Preparación de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu-NAV .....	146
6.4.2. Derivados de la nanozeolita H-Beta .....	146
6.4.2.1. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Na .....	146
6.4.2.2. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd .....	147
6.4.2.3. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2 .....	147
6.4.2.4. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES .....	147
6.4.2.5. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu .....	147
6.4.2.6. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu-NAV .....	148
<b>6.5. Nanozeolitas con cobre en su estructura preparadas por síntesis directa..</b>	<b>149</b>
6.5.1. Derivados de las nanozeolitas CuBeta .....	149
6.5.1.1. Preparación de la nanozeolita CuBeta_23 .....	149
6.5.1.2. Preparación de la nanozeolita CuBeta_23-PAH .....	149
6.5.1.3. Preparación de la nanozeolita CuBeta_23-APTES .....	149
6.5.1.4. Preparación de la nanozeolita CuBeta_23-PAH-Glu .....	150
6.5.1.5. Preparación de la nanozeolita CuBeta_23-APTES-Glu .....	150
6.5.1.6. Preparación de la nanozeolita CuBeta_23-APTES-Glu-NAV .....	151
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>153</b>



<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>159</b>
<b>9. Apéndice.....</b>	<b>167</b>





## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Selectividad de forma de las zeolitas. ....	6
<b>Figura 2.</b> Relación entre el número de núcleos generados durante el proceso de síntesis de una zeolita y el tamaño de los cristales finales. ....	8
<b>Figura 3.</b> Esquema general del funcionamiento de un biosensor. ....	11
<b>Figura 4.</b> Métodos de inmovilización del elemento que actúa como biosensor sobre la superficie de un transductor.....	12
<b>Figura 5.</b> Esquema general de un electrodo serigrafiado estándar utilizado en electroquímica. ....	14
<b>Figura 6.</b> Esquema representativo del funcionamiento de un biosensor electroquímico. ....	14
<b>Figura 7.</b> Estructura del biosensor electroquímico. ....	17
<b>Figura 8.</b> Dispositivo para la realización del ensayo de afinidad entre la biotina y la neutravidina. ....	17
<b>Figura 9.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta.....	25
<b>Figura 10.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd.....	28
<b>Figura 11.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-OA. ....	31
<b>Figura 12.</b> RMN de C-13 en sólido (CP-MAS) de la nanozeolita H-Beta-Cd-OA.....	32
<b>Figura 13.</b> Modos de unirse la OA a la nanozeolita H-Beta-Cd.....	33
<b>Figura 14.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA.....	35
<b>Figura 15. A)</b> RMN de C-13 en sólido (CP-MAS) de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA, <b>B)</b> RMN de C-13 en disolución simulado (ChemDraw) para la $H_2N(CH_2)_8NH_3^+Cl^-$ y <b>C)</b> RMN de C-13 en disolución simulado (ChemDraw) para la $Cl^-H_3N(CH_2)_8NH_3^+Cl^-$ ...	36
<b>Figura 16.</b> Modo de unirse la ODA a la nanozeolita H-Beta-Cd. ....	37
<b>Figura 17.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-TREN.....	38
<b>Figura 18.</b> RMN de C-13 en sólido (CP-MAS) de la nanozeolita H-Beta-Cd-TREN. .	39
<b>Figura 19.</b> Predicciones del programa ChemDraw para cuatro posibles estructuras de la tetramina TREN. <b>A)</b> sin protonar, <b>B)</b> parcialmente protonada, <b>C)</b> triplemente protonada, <b>D)</b> cuádruplemente protonada. ....	40

<b>Figura 20.</b> Modo de unirse la TREN a la nanozeolita H-Beta-Cd.....	41
<b>Figura 21.</b> Modo de unirse la PAH a la nanozeolita H-Beta-Cd.....	41
<b>Figura 22.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH. ....	43
<b>Figura 23.</b> Micrografía HR-TEM de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH. ....	44
<b>Figura 24.</b> Micrografía HR-TEM de la nanozeolita H-Beta.....	44
<b>Figura 25.</b> Micrografías HR-TEM de <b>A)</b> H Beta-Cd, <b>B)</b> H-Beta-Cd-ODA y <b>C)</b> H-Beta-Cd-TREN.....	45
<b>Figura 26.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-NAV.....	47
<b>Figura 27.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu. ....	49
<b>Figura 28.</b> Formación de grupos imina en la síntesis de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu. ....	49
<b>Figura 29.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu-NAV. ....	51
<b>Figura 30.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu.....	52
<b>Figura 31.</b> Formación de grupos imina en la síntesis de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu. ....	53
<b>Figura 32.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu-NAV.....	54
<b>Figura 33.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita CP814E-Na-Cd <sub>2</sub> -APTES. ....	65
<b>Figura 34.</b> RMN de Si-29 en sólido (CP-MAS) de la nanozeolita CP814E-Na-Cd <sub>2</sub> -APTES.....	66
<b>Figura 35.</b> RMN de Si-29 en sólido (BD-MAS) de la nanozeolita CP814E-Na-Cd <sub>2</sub> -APTES.....	67
<b>Figura 36.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita CP814E-Na-Cd <sub>2</sub> -APTES-Glu.....	68
<b>Figura 37.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita CP814E-Na-Cd <sub>2</sub> -APTES-Glu-NAV..	70
<b>Figura 38.</b> RMN de Si-29 en sólido (CP-MAS) de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd <sub>2</sub> -APTES.....	73
<b>Figura 39.</b> RMN de Si-29 en sólido (BD-MAS) de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd <sub>2</sub> -APTES.....	74
<b>Figura 40.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd <sub>2</sub> -APTES-Glu.....	75

<b>Figura 41.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu-NAV....	76
<b>Figura 42.</b> Micrografías HR-TEM de <b>A)</b> CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu, <b>B)</b> H-Beta- Na-Cd2-APTES-Glu.....	78
<b>Figura 43.</b> Distribución del Cd en diferentes áreas de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu.....	79
<b>Figura 44.</b> Distribución del Cd en diferentes áreas de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu.....	80
<b>Figura 45.</b> Multiautoclave con 15 mezclas de reactivos diferentes.....	85
<b>Figura 46.</b> Multiautoclave completamente sellado.....	86
<b>Figura 47.</b> Multiautoclaves con las nanozeolitas CuBeta sintetizadas.....	86
<b>Figura 48.</b> Patrones de difracción de los sólidos obtenidos utilizando Cu-TEPA y TEA en el medio de síntesis.....	91
<b>Figura 49.</b> Micrografía FE-SEM de la nanozeolita CuBeta_01 caracterizada por EDX.....	92
<b>Figura 50.</b> Micrografía FE-SEM de la nanozeolita CuBeta_04 caracterizada por EDX.....	93
<b>Figura 51.</b> Estructura del N-butil-N,N-dimetilciclohexilamonio (BDMC6).....	95
<b>Figura 52.</b> Patrones de difracción de los sólidos obtenidos utilizando Cu-TEPA y BDMC6 en el medio de síntesis.....	97
<b>Figura 53.</b> Micrografías FE-SEM de la nanozeolita CuBeta_17 caracterizada por EDX.....	98
<b>Figura 54.</b> Micrografía FE-SEM de la nanozeolita CuBeta_22 caracterizada por EDX.....	100
<b>Figura 55.</b> Micrografía FE-SEM de la nanozeolita CuBeta_23 caracterizada por EDX.....	101
<b>Figura 56.</b> Micrografías FE-SEM de la nanozeolita CuBeta_24 caracterizada por EDX.....	102
<b>Figura 57.</b> Autoclave individual utilizada en la síntesis de la CuBeta_23.....	104
<b>Figura 58.</b> Patrón de difracción de la nanozeolita escalada CuBeta_23.....	104
<b>Figura 59.</b> UV-Vis de la nanozeolita CuBeta_23 sintetizada a mayor escala.....	105

<b>Figura 60.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita CuBeta_23. ....	107
Figura 61. Espectro de FTIR de la nanozeolita CuBeta_23-PAH. ....	109
<b>Figura 62.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita CuBeta_23-APTES. ....	110
<b>Figura 63.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita CuBeta_23-PAH-Glu. ....	112
<b>Figura 64.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita CuBeta_23-APTES-Glu. ....	113
<b>Figura 65.</b> Distribución del Cu en diferentes áreas de la nanozeolita CuBeta_23-PAH-Glu. ....	114
<b>Figura 66.</b> Distribución del Cu en diferentes áreas de la nanozeolita CuBeta_23-APTES-Glu. ....	115
<b>Figura 67.</b> Espectro de FTIR de la nanozeolita CuBeta_23-APTES-Glu-NAV. ....	117
<b>Figura 68.</b> Esquema general de las etapas previas al ensayo de afinidad. ....	119
<b>Figura 69.</b> Esquema general de las nuevas nanozeolitas en fase de preparación. ....	125







## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Valores de área BET, área externa y volumen de microporo medidos por adsorción de N <sub>2</sub> para la nanozeolita H-Beta. ....	24
<b>Tabla 2.</b> Asignación de las vibraciones características de las estructuras de las zeolitas. ....	26
<b>Tabla 3.</b> Datos relativos a la reacción de la H-Beta con una disolución 10 mM de acetato de cadmio (II). <sup>1</sup> μmoles de Cd <sup>2+</sup> detectados electroquímicamente en la mezcla de aguas madres y aguas de lavado. ....	28
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de la reacción de anclaje de la OA a la nanozeolita H-Beta-Cd.	31
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de la reacción de anclaje de la ODA a la nanozeolita H-Beta-Cd. ....	34
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de la reacción de anclaje de la TREN a la nanozeolita H-Beta-Cd. ....	37
<b>Tabla 7.</b> Análisis de los resultados obtenidos a partir del ICP-MS de la nanozeolita CP814E-Cd. ....	61
<b>Tabla 8.</b> Análisis de los resultados obtenidos a partir del ICP-MS de la nanozeolita CP814E-Na. ....	62
<b>Tabla 9.</b> Análisis de los resultados obtenidos a partir del ICP-MS de la nanozeolita CP814E-Na-Cd. ....	63
<b>Tabla 10.</b> Análisis de los resultados obtenidos a partir del ICP-MS de la nanozeolita CP814E-Na-Cd <sub>2</sub> . ....	63
<b>Tabla 11.</b> Valores de área BET, área externa y volumen de microporo medidos por adsorción de N <sub>2</sub> para las dos nanobetas. ....	70
<b>Tabla 12.</b> Análisis de los resultados obtenidos a partir del ICP-MS de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd <sub>2</sub> . ....	72
<b>Tabla 13.</b> Relaciones molares escogidas para llevar a cabo el estudio de la síntesis de la zeolita CuBeta en su forma nanocrystalina utilizando TEA como ADEO. ....	89
<b>Tabla 14.</b> Composición de las nanozeolitas CuBeta usando TEA como ADEO. ....	90
<b>Tabla 15.</b> ICP-MS de las muestras seleccionadas en el estudio de la síntesis directa de las nanozeolitas CuBeta utilizando TEA y Cu-TEPA. ....	92

<b>Tabla 16.</b> Relación de Si/Al y % de Cu en diferentes puntos de la nanozeolita CuBeta_01. ....	93
<b>Tabla 17.</b> Relación de Si/Al y % de Cu en diferentes puntos de la nanozeolita CuBeta_04. ....	94
<b>Tabla 18.</b> Relaciones molares escogidas para llevar a cabo el estudio de la síntesis de la zeolita CuBeta en su forma nanocristalina utilizando TEA como ADEO. ....	96
<b>Tabla 19.</b> Composición de las nanozeolitas CuBeta usando BDMC6 como ADEO. ...	96
<b>Tabla 20.</b> ICP-MS de las muestras seleccionadas en el estudio de la síntesis directa de las nanozeolitas CuBeta utilizando BDMC6 y Cu-TEPA. ....	98
<b>Tabla 21.</b> Relación de Si/Al y % de Cu en diferentes puntos de la nanozeolita CuBeta_17. ....	99
<b>Tabla 22.</b> Relación de Si/Al y % de Cu en diferentes puntos de la nanozeolita CuBeta_22. ....	100
<b>Tabla 23.</b> Relación de Si/Al y % de Cu en diferentes puntos de la nanozeolita CuBeta_23. ....	102
<b>Tabla 24.</b> Relación de Si/Al y % de Cu en diferentes puntos de la nanozeolita CuBeta_24. ....	103
<b>Tabla 25.</b> Relaciones molares escogidas para escalar la síntesis de la zeolita CuBeta_23 en su forma nanocristalina utilizando BDMC6 como ADEO. ....	103
<b>Tabla 26.</b> ICP-MS de la nanozeolita escalada CuBeta_23. ....	104
<b>Tabla 27.</b> Relación de Si/Al y % de Cu en diferentes puntos de la nanozeolita escalada CuBeta_23. ....	106
<b>Tabla 28.</b> Resumen de las medidas de afinidad de la nanozeolita CuBeta_23-APTES-Glu-NAV. ....	120





## **Lista de Apéndices**

<b>Apéndice 1.</b> Difractograma de rayos X de la nanozeolita H-Beta.....	167
<b>Apéndice 2.</b> Difractograma de rayos X de la nanozeolita H-Beta-Cd.....	167
<b>Apéndice 3.</b> Difractograma de rayos X de la nanozeolita H-Beta-Cd-OA.....	168
<b>Apéndice 4.</b> Difractograma de rayos X de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA.....	168
<b>Apéndice 5.</b> Difractograma de rayos X de la nanozeolita H-Beta-Cd-TREN.....	168
<b>Apéndice 6.</b> Difractograma de rayos X de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH.....	168



## Lista de Abreviaturas y Acrónimos

**ITQ:** Instituto de Tecnología Química

**UPV:** Universidad Politécnica de Valencia

**CSIC:** Consejo Superior de Investigaciones Científicas

**NPFT:** Nanopartículas de Fosfato de Titanio

**NZ:** Nanozeolitas

**Å:** Ångstrom

**IZA:** International Zeolite Association

**ADEs:** Agentes Directores de Estructura

**ADEOs:** Agentes Orgánicos Directores de Estructura

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**EA:** Electrodo auxiliar

**ET:** Electrodo de trabajo

**ER:** Electrodo de referencia

**AC:** Anticuerpos que existen en la sangre de los celíacos

**PrC:** Proteínas que se forman en el intestino de los celíacos

**M<sup>n+</sup>:** Cationes metálicos electroquímicamente activos

**NZ (M<sup>n+</sup>):** Nanozeolitas cargadas con cationes metálicos electroquímicamente activos

**AI:** Anticuerpos capaces de reconocer selectivamente los anticuerpos de los celíacos

**AI - NZ (M<sup>n+</sup>):** Sistema formado por los AI y las marcas

**MPM:** Micropartículas de magnetita

**B:** Biotina



**NAV:** Neutravidina

**TEA:** Tetraetilamonio

**ICP-MS:** Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente

**BET:** Brunauer–Emmett–Teller

**FTIR:** Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

**OA:** n-octilamina

**RMN de C-13:** Resonancia Magnética Nuclear de C-13

**CP-MAS:** CP (Polarización Cruzada) + MAS (Giro al Ángulo Mágico)

**ppm:** partes por millón

**ODA:** 1,8-octanodiamina

**DRX:** Difracción de Rayos X

**TREN:** tris(2-aminoetil)amina

**PAH:** Poli(hidrocloruro de alilamina)

**PBS:** Buffer Fosfato Salino

**HR-TEM:** Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución

**Glu:** Glutaraldehído

**APTES:** (3-aminopropil)triétoxissilano

**RMN de Si-29:** Resonancia Magnética Nuclear de Si-29

**BD-MAS:** BD (Bloch Decay) + MAS (Giro al Ángulo Mágico)

**BDMC6:** N-butil-N,N-dimetilciclohexilamonio

**FE-SEM:** Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo

**EDX:** Microanálisis por Dispersión de Energías por rayos-X

**BSA:** Albúmina de Suero Bovino

**NZ (M<sup>n+</sup>) – NAV:** Sistema formado por las nanozeolitas cargadas con los cationes metálicos y bioconjugadas con neutravidina

**PM:** Peso molecular

**VBL:** Voltamperometría de Barrido Lineal

**SCTs:** Servicios Científico-Técnicos

**mf:** muy fuerte

**f:** fuerte

**m:** media

**d:** débil

**md:** muy débil

**a:** banda ancha

**h:** hombro

**int:** vibraciones internas (intra-tetraedros)

**ext:** vibraciones externas (inter-tetraedros)

**v<sub>s</sub>:** vibraciones de tensión simétricas

**v<sub>as</sub>:** vibraciones de tensión asimétricas

**δ:** vibraciones de deformación

**δ<sub>s</sub>:** vibraciones de deformación simétricas

**δ<sub>as</sub>:** vibraciones de deformación asimétricas

**d-a:** vibraciones de doble anillo

**a-p:** vibraciones de apertura de poro

**θ:** Theta

**d:** Espaciado entre planos





# 1

---

## *Introducción*



Este trabajo se ha desarrollado en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo bajo la dirección del Dr. Francisco Javier García Alonso, Catedrático de Química Inorgánica y en el Instituto de Tecnología Química de la Universidad Politécnica de Valencia (ITQ-UPV) bajo la dirección del Dr. Manuel Moliner Marín, Científico Titular del CSIC y experto en el campo de las zeolitas. Además, se ha mantenido una estrecha colaboración con el grupo de electroquímica del Profesor Agustín Costa, Catedrático de Química Analítica de la Universidad de Oviedo.

Nuestro grupo posee una amplia experiencia en el estudio de las Nanopartículas de Fosfato de Titanio, NPFT, como especies capaces de incorporar cationes metálicos y susceptibles de ser funcionalizadas en su superficie <sup>1-5</sup>, y, por tanto, actuar como marcas de biosensores electroquímicos. Dada la similitud existente entre las NPFT y las nanozeolitas (NZ) en cuanto a capacidad para intercambiar cationes y para ser funcionalizadas, decidimos iniciar una colaboración con los grupos del Dr. Manuel Moliner Marín y del Profesor Agustín Costa para estudiar la funcionalización y bioconjugación de nanozeolitas cargadas con cationes electroquímicamente activos con el objetivo final de preparar nuevas marcas para biosensores.

## Capítulo 1

### 1.1. Zeolitas

Las zeolitas son aluminosilicatos con una estructura aniónica rígida, formada a partir de tetraedros  $TO_4$  ( $T = Si$  o  $Al$ ) compartiendo vértices, dotada de una red de poros y cavidades de dimensiones moleculares ( $\sim 3 - 10 \text{ \AA}$ ), por donde pueden circular cationes y moléculas, y cuya fórmula general se puede expresar como  $M^{n+}_{x/n} (Al_xSi_{1-x}O_2) \cdot yH_2O$  <sup>11</sup>.

La estructura cristalina de las zeolitas se encuentra principalmente formada por átomos de silicio en coordinación tetraédrica. No obstante, la sustitución isomórfica de alguno de esos átomos de silicio por un átomo de Al genera una carga negativa en la estructura, debido a que los átomos de Al tienen una carga (3+) y los átomos de Si tienen una carga (4+). En el caso de las zeolitas, esa carga negativa se puede compensar con la presencia en sus canales/cavidades de cationes de distinta carga <sup>6</sup>, siendo normalmente cationes alcalinos o alcalinotérreos, o protones ( $H^+$ ) anclados a los oxígenos puente entre los átomos de aluminio y silicio,  $Al-O(H)^+-Si$  <sup>12</sup>. Dependiendo de la naturaleza de esos cationes, se pueden controlar las propiedades ácidas/básicas de las zeolitas, permitiendo su uso como catalizadores heterogéneos <sup>12</sup>.

La distribución de aluminios en las zeolitas sigue la regla de Löwenstein <sup>13</sup> según la cual no puede haber fragmentos Al-O-Al. Eso limita el valor de x, que no puede superar el valor 0.5 <sup>10</sup>. Ocasionalmente x puede valer cero <sup>11</sup>, si la zeolita es puramente de óxido de silicio.

La capacidad de ajustar la relación de Si/Al de las zeolitas resulta de gran utilidad para diferentes aplicaciones, ya que permite tener materiales altamente hidrófobos (puramente silíceo o con una elevada relación de Si/Al), que pueden adsorber componentes orgánicos en medios altamente polares (por ejemplo, acuosos), o, por el



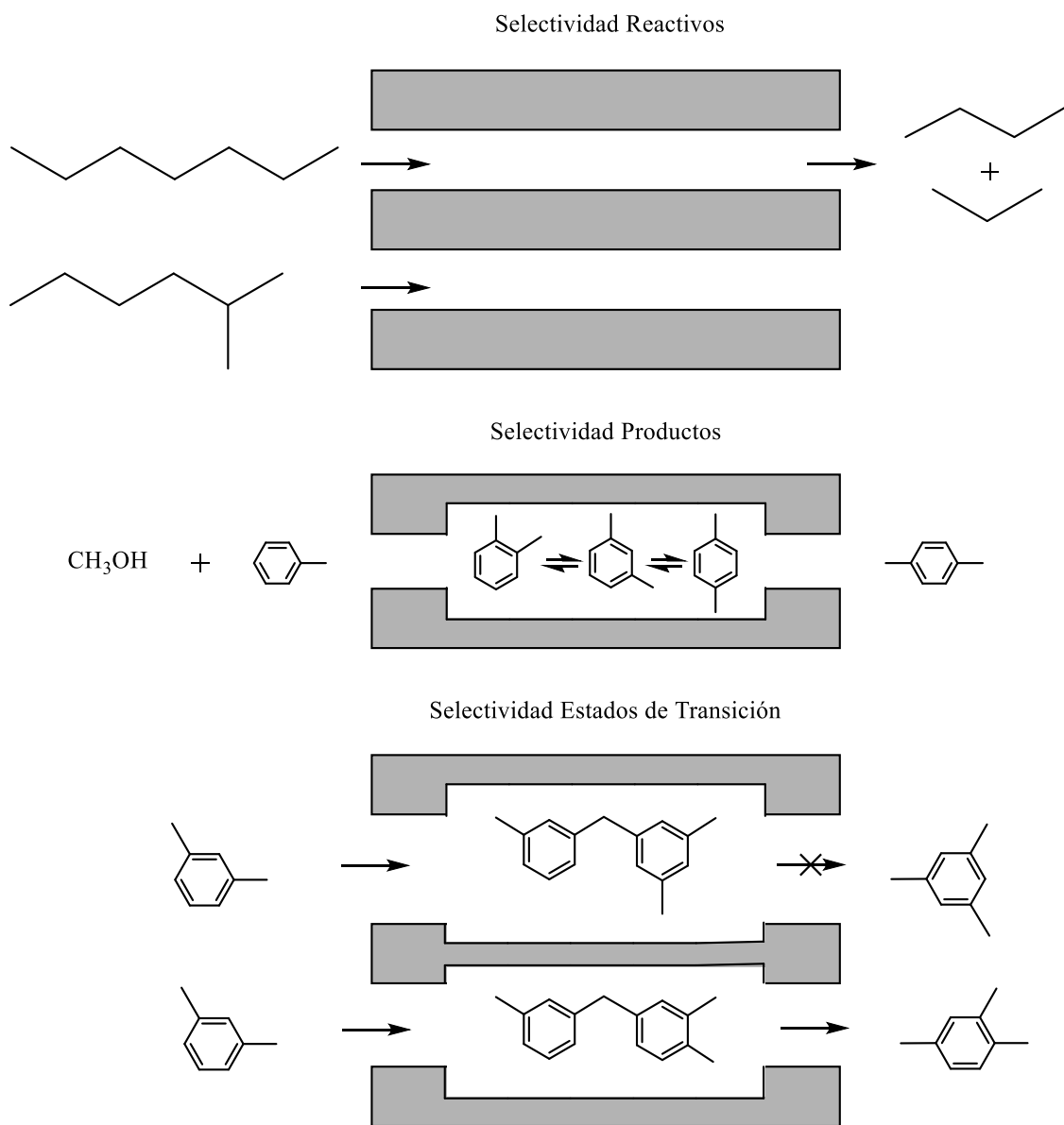
contrario, materiales muy hidrofílicos (baja relación de Si/Al), que pueden adsorber agua en medios apolares (por ejemplo, numerosos disolventes orgánicos) <sup>10, 14, 15</sup>.

De manera general, las principales propiedades de las zeolitas son las siguientes <sup>8</sup>:

- Elevada superficie microporosa, que permite la difusión de moléculas y su interacción con los centros activos distribuidos a lo largo de dicha superficie.
- Importante selectividad de forma de los reactivos, de los estados de transición y de los productos de las reacciones que ocurran en su interior. Es decir, que debido al tamaño de los poros y de las cavidades, permiten diferenciar por tamaño y forma los reactivos disponibles en el medio, facilitando su difusión o formación selectiva a lo largo de dichos poros y/o cavidades (Ver **Figura 1**) <sup>16</sup>.
- Elevada capacidad de intercambio iónico. Debido al control de la carga negativa en la red cristalina de las zeolitas, se pueden utilizar como excelentes materiales de intercambio catiónico. En general, los cationes utilizados pueden incluir metales de transición además de los habituales alcalinos y alcalinotérreos.
- Posibilidad de controlar sus capacidades ácidas/básicas dependiendo de los heteroátomos que conforman la red cristalina. Por ejemplo, cuando las zeolitas presentan átomos de Al, se pueden utilizar como excelentes catalizadores heterogéneos ácidos de Brønsted, gracias a los fragmentos  $\text{Al-O(H)}^+\text{-Si}$ . Por otro lado, la posibilidad de modificar la composición de la estructura cristalina por otros heteroátomos, como por ejemplo Be, B, P, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Zn, Ga, Ge, y Zr, permite controlar sus propiedades, tales como propiedades redox o ácido de Lewis.

## Capítulo 1

- Gran estabilidad química, mecánica, térmica e hidrotérmica, permitiendo su aplicación incluso en condiciones de operación muy severas (altas temperaturas, pHs, y presencia de vapor).



*Figura 1. Selectividad de forma de las zeolitas.*

El tamaño de los poros de las zeolitas se puede modificar dependiendo de las condiciones de síntesis empleadas. De manera general, se puede decir que las zeolitas se pueden clasificar, atendiendo al tamaño de sus poros, teniendo entonces zeolitas de poro pequeño (anillos de 8 tetraedros,  $\sim 3.5 \text{ \AA}$ ), de poro medio (anillos de 10 tetraedros,  $\sim 5.5$

Å), de poro grande (anillos de 12 tetraedros,  $\sim 6.5 - 7$  Å), o de poro extragrande (anillos superiores a 12 tetraedros,  $> 7$  Å). A veces, una misma zeolita puede presentar más de un tipo de poro en la misma estructura, como por ejemplo la zeolita ITQ-39<sup>17</sup>.

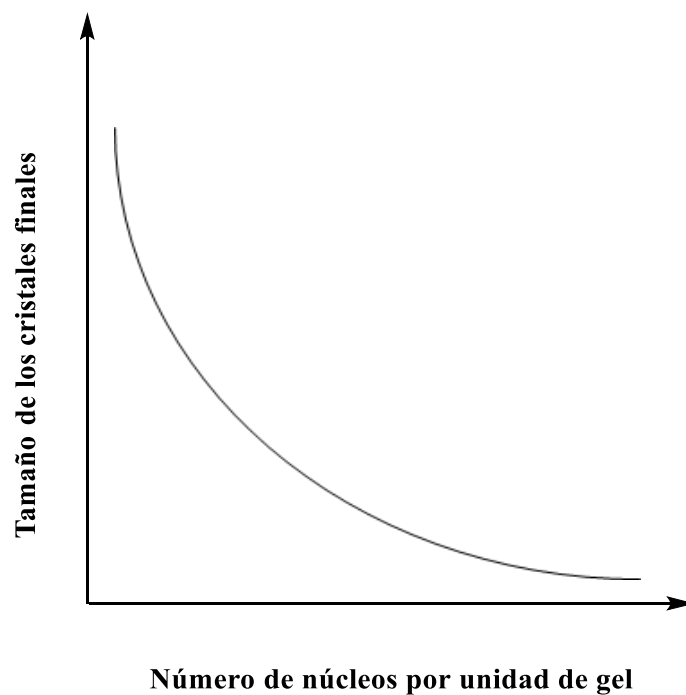
Actualmente se conocen 248 tipos de zeolitas de acuerdo con la versión más reciente que aparece en la página de la “International Zeolite Association” (IZA)<sup>18</sup>. Se puede encontrar amplia información sobre sus estructuras en la última actualización del “Atlas of Zeolite Framework Types”<sup>18,19</sup>. La gran diversidad de zeolitas conocidas, tanto desde el punto de vista químico como estructural, se debe a la relación que existe entre la composición química de las zeolitas y el tipo de estructura que presenten<sup>20</sup>. Las diferentes estructuras de zeolitas que existen están recopiladas por la IZA y se identifican mediante un código de 3 letras cada una (Ejemplos: \*BEA, MWW, EMT...), el cual aparece acompañado de un asterisco cuando designa a un material parcialmente desordenado<sup>15,18,19</sup>. En la presente tesis doctoral se han utilizado diferentes zeolitas de tipo Beta (\*BEA)<sup>10,18,19</sup>.

La síntesis de zeolitas consiste preferentemente en mezclar a una temperatura comprendida entre 100 y 200 °C, en un sistema cerrado, diferentes sales orgánicas e inorgánicas en medio acuoso, llevándose a cabo su preparación en condiciones hidrotermales<sup>10,15,20</sup>. Las sales catiónicas presentes en la mezcla actúan como agentes directores de estructura, ADEs, tanto inorgánicos como orgánicos, siendo determinantes en la preparación de zeolitas con nuevas composiciones y estructuras<sup>10,21</sup>. Las especies orgánicas más utilizadas como agentes directores de estructura orgánicos, ADEOs, son las aminas y las sales cuaternarias de amonio<sup>10</sup>.

Durante el proceso de síntesis, se produce una reacción entre los componentes del gel de partida, iniciándose un proceso de nucleación seguido de un posterior crecimiento

## Capítulo 1

de los núcleos hasta obtenerse los cristales finales<sup>15, 20, 21</sup>. Existe una correlación entre el número de núcleos generados y el tamaño de los cristales finales, como se observa en la *Figura 2*<sup>21</sup>.



*Figura 2. Relación entre el número de núcleos generados durante el proceso de síntesis de una zeolita y el tamaño de los cristales finales.*

Como se puede deducir de la figura anterior, el número de núcleos que se generan durante el proceso de síntesis determina el tamaño final del cristal<sup>20, 21</sup>. Esto supone que una nucleación abundante conduce a cristales muy pequeños mientras que la formación de pocos núcleos implica la obtención de cristales más grandes<sup>20, 21</sup>.

Por tanto, si somos capaces de controlar las etapas de nucleación y crecimiento, podremos controlar el tamaño de los cristales de las zeolitas obtenidas. Esta característica es muy importante, porque la capacidad de sintetizar las zeolitas con tamaños inferiores a los 100 nm permite incrementar considerablemente su superficie externa, ofreciendo no sólo una mejor accesibilidad a las moléculas voluminosas a los centros activos situados en el interior de los nanocristales, sino que también permite el potencial aprovechamiento

de su gran área externa para poder modificarla con los grupos funcionales deseados. Las zeolitas que presentan cristales inferiores a los 100 nm tradicionalmente se conocen como nanozeolitas.

La síntesis de nanozeolitas no es una tarea sencilla. Existen muchas variables que pueden influir en las etapas de nucleación/cristalización, con lo que cada sistema requiere de una optimización personalizada. De manera general, se puede afirmar que la selección de los reactivos es uno de los factores fundamentales en la síntesis de las nanozeolitas <sup>20</sup>. Suele ser preferible que la mezcla se prepare con un bajo contenido en metales alcalinos, que, junto a la dilución del gel, suele evitar la aglomeración de los cristales <sup>20</sup>. Existen muchos métodos de síntesis descritos para controlar el tamaño de los cristales de las zeolitas <sup>9</sup>.

Las zeolitas representan hoy en día el más amplio e importante grupo de catalizadores industriales en estado sólido <sup>22</sup>. Se usan en la transformación de hidrocarburos y en la química fina <sup>23-25</sup> para la eliminación de óxidos de nitrógeno <sup>26-28</sup> en el aprovechamiento de la biomasa <sup>29-31</sup> o en la conversión del monóxido de carbono y metano en productos de interés <sup>32-37</sup>.

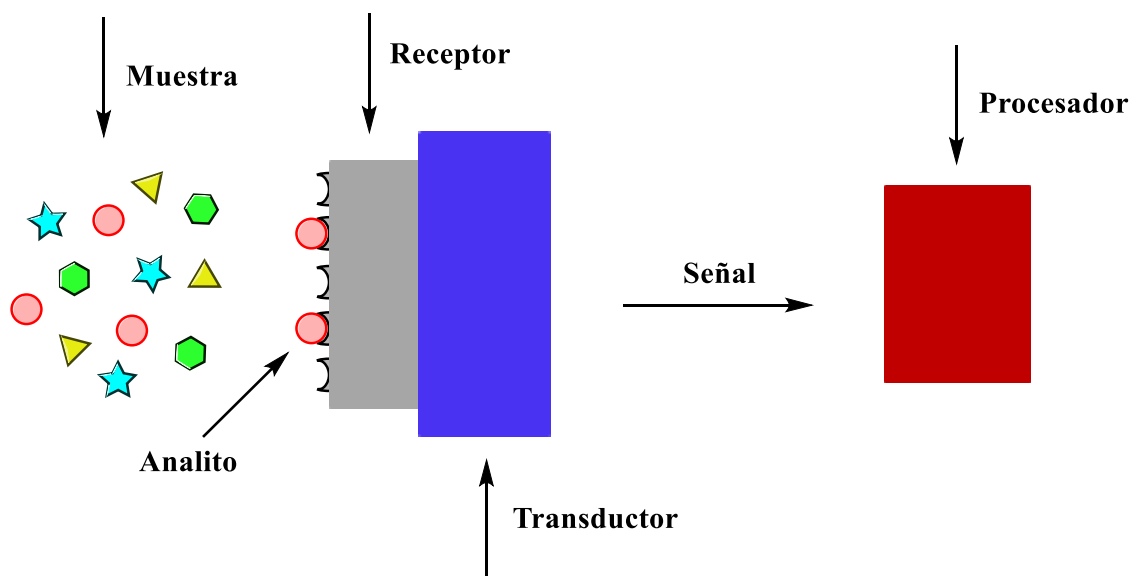
Las zeolitas también tienen aplicaciones electroanalíticas <sup>38</sup>, incluso pueden actuar como parte de biosensores electroquímicos <sup>39</sup>, pero en todos los casos la zeolita está directamente unida al electrodo. En general, se saca partido de su capacidad de intercambio iónico, de la selectividad de tamaños que ofrecen sus poros y de la capacidad de algunas zeolitas con elevada superficie externa para anclar enzimas, normalmente aquellas con tamaños de cristal en el rango nanocristalino.

## **Capítulo 1**

En nuestro caso, el objetivo principal será unir nanozeolitas cargadas con iones electroactivos a un anticuerpo, de forma que la nanozeolita actúe como marca del biosensor.

## 1.2. Biosensores

Un sensor químico es un dispositivo que transforma información química (concentración de una especie química, denominada analito) en una señal analítica útil. Los sensores constan de dos partes (Ver *Figura 3*). La primera es un receptor, capaz de reconocer el analito interactuando con él, y la segunda es un instrumento (transductor), que traduce la interacción en una señal procesable. Dado que el analito normalmente se encuentra en una muestra compleja, es deseable que el sensor sea lo más selectivo posible. Cuando el receptor emplea un sistema bioquímico para reconocer el analito, entonces el sensor se denomina biosensor <sup>40</sup>.



*Figura 3. Esquema general del funcionamiento de un biosensor.*

El reconocimiento de un analito se puede llevar a cabo <sup>41</sup>:

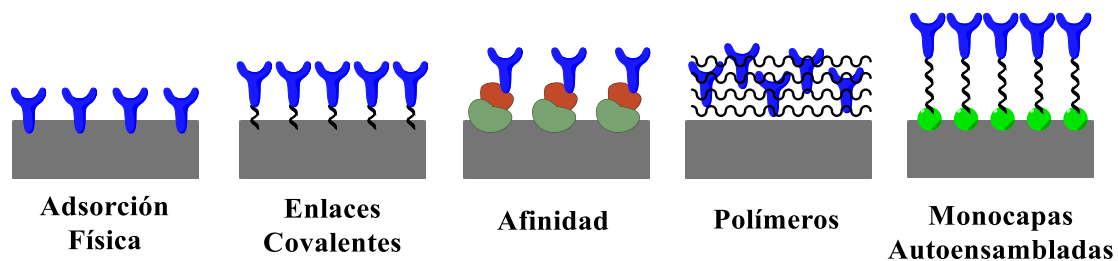
- Mediante una membrana (que permite o impide el paso al analito).
- Mediante una reacción catalítica (en la que un enzima reconoce al analito).
- Mediante la formación de un complejo (por medio de enlaces no covalentes) entre el analito y el sensor.

## Capítulo 1

En el último caso, el complejo entre el analito y el sensor puede formarse <sup>41</sup>:

- Entre dos hebras de ADN que se reconocen mutuamente (una actúa como analito y la otra como sensor).
- Entre un aptámero (oligonucleótido o péptido), que es el sensor, y una molécula a la que reconoce, que es el analito.
- Entre un polímero entrecruzado, que tiene huecos que se adaptan a la forma de una molécula dada, denominado polímero impreso, y esa misma molécula (pueden actuar indistintamente como sensor o analito).
- Entre un antígeno y un anticuerpo (pueden actuar indistintamente como sensor o analito).

En general, el receptor puede estar inmovilizado sobre el transductor mediante diferentes métodos <sup>41-43</sup> (Ver **Figura 4**); por adsorción física, formación de enlaces covalentes, por afinidad (mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre el sensor y el transductor, unión que se conoce como el modelo llave-cerradura), por atrapamiento en un polímero o membrana, y por formación de monocapas autoensambladas.



**Figura 4.** Métodos de inmovilización del elemento que actúa como biosensor sobre la superficie de un transductor.

Por lo que se refiere al tipo de señal que se genera en el transductor se distinguen los siguientes tipos de biosensores <sup>41</sup>:



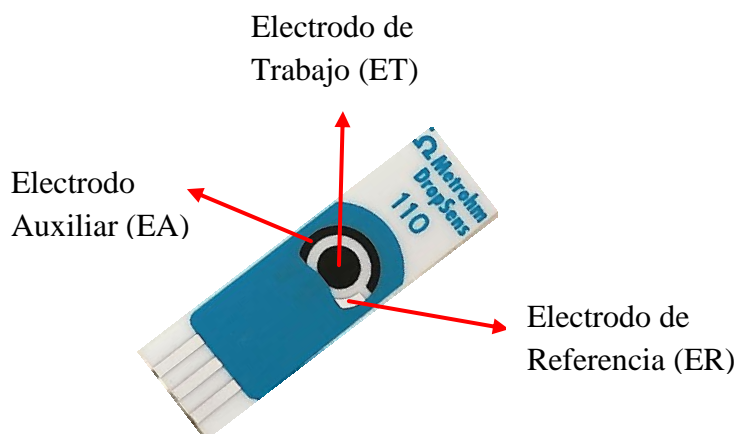
- a) *Sensores ópticos*, si en el transductor se absorbe o se emite luz, o bien la luz es reflejada, difractada o dispersada.
- b) *Sensores mecánicos*, si se produce un cambio de masa que puede ser detectada, generalmente, mediante un sistema piezoeléctrico.
- c) *Sensores térmicos*, si se produce un cambio de temperatura (por algunos procesos catalíticos).
- d) *Sensores electroquímicos*, si la señal generada es detectada por un electrodo.

En nuestro trabajo se han empleado biosensores electroquímicos. Estos sensores destacan por su gran sensibilidad (capacidad para detectar pequeños cambios de concentración), selectividad (capacidad para detectar un analito concreto en una muestra con muchas especies químicas), fiabilidad, precio, y facilidad para ser miniaturizados (y por tanto ser fáciles de transportar). De hecho, los biosensores electroquímicos han sido empleados con éxito en la industria, el medio ambiente, la agricultura y la medicina <sup>4</sup>.

Ahora bien, en este tipo de sensores son posibles diferentes tipos de transducción eléctrica <sup>41</sup>. De todas ellas, aquí se ha utilizado la transducción voltamperométrica, que “se basa en la aplicación de un barrido de potenciales y el registro de la corriente generada en función del potencial aplicado. Al producirse una reacción redox, la corriente aumenta (en términos absolutos) de manera proporcional a la concentración de analito en la muestra” <sup>41</sup>.

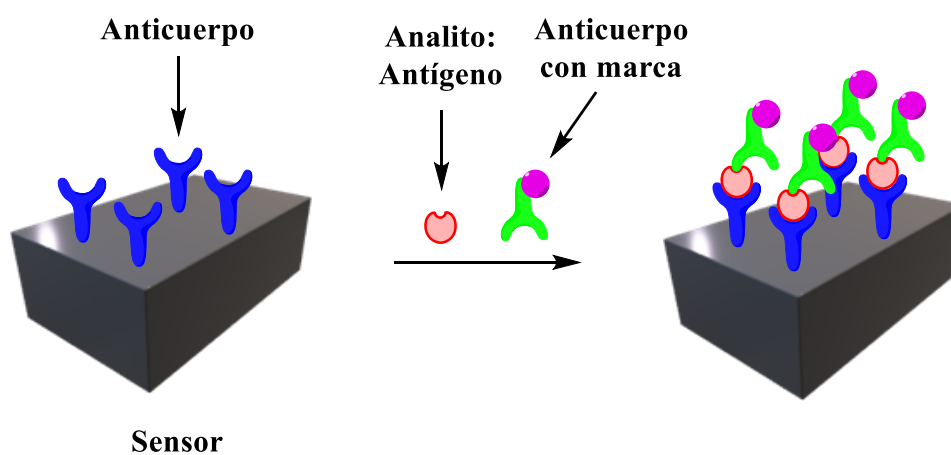
En nuestro caso, se han elegido electrodos serigrafiados, como el que se muestra en la **Figura 5**, ya que, además de baratos y fiables, son pequeños (requieren poco volumen de muestra y son fáciles de integrar en biosensores miniaturizados), versátiles (diversos tipos de diseños y recubrimientos), y además, permiten llevar a cabo varias mediciones simultáneas <sup>4</sup>.

## Capítulo 1



*Figura 5. Esquema general de un electrodo serigrafado estándar utilizado en electroquímica.*

Los biosensores electroquímicos en los que nosotros estamos interesados suelen utilizar las interacciones antígeno-anticuerpo para fijar el analito al sensor. Un caso sencillo de detección es el que se muestra en la **Figura 6**, donde el analito, que es un antígeno, interacciona con el anticuerpo del sensor y, a continuación, un anticuerpo provisto de una marca <sup>41</sup>.



*Figura 6. Esquema representativo del funcionamiento de un biosensor electroquímico.*

Las marcas facilitan la detección de los analitos. Las marcas más usadas en los biosensores electroquímicos son las enzimas y las nanopartículas <sup>41</sup>.

La ventaja de la marca enzimática es que generan un producto detectable a lo largo del tiempo, lo que permite amplificar la señal, mejorando la sensibilidad del sensor; sin

embargo, suelen perder su función biológica con relativa facilidad. El empleo de nanopartículas está adquiriendo mayor importancia, ya que pueden ser ellas mismas electroquímicamente activas, o contener especies electroactivas (con lo que el efecto amplificador queda asegurado). Además, suelen ser más estables y se pueden funcionalizar con cierta facilidad para unirse a distintas biomoléculas, permitiendo la detección simultánea de diversos analitos (simplemente usando distintas nanopartículas o la misma nanopartícula con distintas especies electroactivas).

Más arriba se ha hecho referencia al empleo de nanopartículas de fosfato de titanio como marcas en este tipo de biosensores y el objetivo final del presente trabajo es el uso de nanozeolitas como marcas para biosensores electroquímicos.

## Capítulo 1

### 1.3. Objetivos

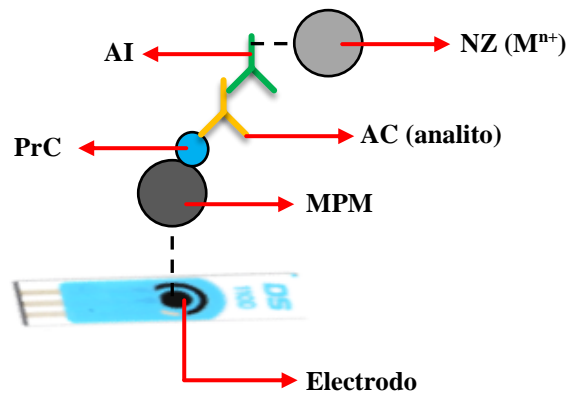
Este trabajo forma parte de un proyecto para detectar los anticuerpos que existen en la sangre de los celíacos (AC), como reacción a la presencia de unas proteínas que se forman en el intestino de los celíacos (PrC).

Lo que se busca es encontrar una zeolita nanocristalina (NZ) que sirva como marca para los biosensores electroquímicos que se desean fabricar.

Para que las nanozeolitas (NZ) actúen como marcas de tales biosensores, es necesario cargarlas previamente con cationes metálicos electroquímicamente activos ( $M^{n+}$ ), a las que se denominarán NZ ( $M^{n+}$ ). A continuación, las NZ ( $M^{n+}$ ), deben enlazarse a anticuerpos (AI) que sean capaces de reconocer selectivamente los anticuerpos presentes en los celíacos (AC), formando los complejos AI - NZ ( $M^{n+}$ ).

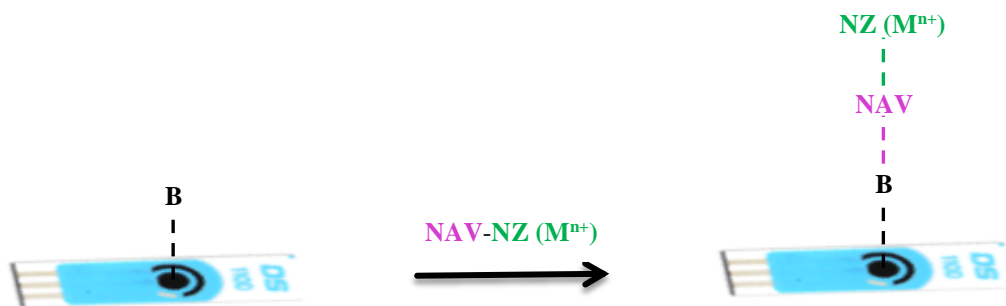
Posteriormente, los anticuerpos con la marca AI - NZ ( $M^{n+}$ ), se unirían a los anticuerpos de los celíacos (AC), que en este caso serían los analitos cuya existencia se desea detectar y eventualmente cuantificar. Los analitos se habrían anclado previamente a las proteínas (PrC) enlazadas en la superficie de una micropartícula magnética (MPM).

Finalmente, el sistema resultante se depositaría sobre un electrodo capaz de detectar la presencia de los iones  $M^{n+}$  y, por tanto, de los analitos AC (Ver *Figura 7*).



*Figura 7. Estructura del biosensor electroquímico.*

Sin embargo, antes de llegar a ese punto conviene saber si las nanozeolitas son realmente útiles electroquímicamente. Para ello se lleva a cabo una prueba de afinidad, utilizando un dispositivo simplificado. (Ver *Figura 8*).



*Figura 8. Dispositivo para la realización del ensayo de afinidad entre la biotina y la neutravidina.*

La biotina (B) se ancla en la superficie del electrodo y a continuación, se añaden las nanozeolitas (NZ) cargadas con cationes metálicos ( $M^{n+}$ ). Dado que la NAV se acopla selectivamente a la Biotina, las NZ ( $M^{n+}$ ) quedan fijadas al electrodo y se pueden llevar a cabo medidas electroquímicas.

Por tanto, los objetivos de esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Cargar diferentes nanozeolitas (NZ) con distintos cationes  $M^{n+}$  electroquímicamente activos.

## **Capítulo 1**

2. Funcionalizar con grupos amino,  $\text{-NH}_2$ , las zeolitas nanocristalinas previamente cargadas con cationes  $\text{M}^{n+}$ .
3. Bioconjugar con neutravidina las nanozeolitas obtenidas en la etapa anterior utilizando glutaraldehído. El dialdehído se debería unir por un extremo a las aminas de las zeolitas y por el otro extremo a los grupos  $\text{NH}_2$  de la biotina mediante la formación de grupos imina en ambos casos,  $(\text{NZ})\text{-N}=\text{CH}\text{---}\text{CH}=\text{N}\text{-(Biotina)}$ .
4. Comprobar que los sistemas así preparados se unen a la biotina anclada a los electrodos (prueba de afinidad).







# 2

---

*Funcionalización de los centros ácidos de las zeolitas y posterior bioconjugación*



Puesta la vista en la consecución de nanozeolitas como marcas para biosensores, la primera decisión que hubo que tomar fue la elección de las zeolitas nanocristalinas con las que empezar a trabajar.

Como punto de partida, los materiales zeolíticos que queremos utilizar como soporte de los biosensores deben presentar una elevada superficie externa para poder favorecer el anclaje de las moléculas voluminosas necesarias, así como una densidad de carga negativa en la red cristalina para favorecer la presencia de los cationes  $M^{n+}$ . Teniendo esto en cuenta, se propone el uso de una zeolita nanocristalina tipo Beta con un tamaño de cristal nanométrico ( $\sim 10 - 15$  nm) <sup>44</sup>.

La zeolita Beta presenta un sistema tridireccional de poros grandes, con aperturas de  $\sim 6.5 - 7$  Å. Tradicionalmente, este material se sintetiza con un agente director de estructura orgánico sencillo, como el catión tetraetilamonio (TEA), pero dicho procedimiento de síntesis presenta serios problemas para obtener la zeolita Beta con elevados rendimientos de síntesis a altas relaciones OH/Si, que son las más adecuadas para obtener cristales pequeños <sup>45</sup>.

Recientemente, se ha descrito una nueva metodología de síntesis que permite obtener la zeolita Beta con elevados rendimientos y composición química controlada (Si/Al  $\sim 10 - 30$ ), utilizando como ADEOs moléculas orgánicas cíclicas muy sencillas, como por ejemplo, butilmetilciclohexilamonio <sup>44, 46</sup>. Los cristales de zeolita Beta resultantes presentan un tamaño homogéneo de  $\sim 10 - 15$  nm, y con una superficie externa de  $\sim 200 - 300$  m<sup>2</sup>/g.

Para empezar, seleccionamos una zeolita Beta nanocristalina sintetizada con ADEOs cíclicos sencillos, con una relación Si/Al de  $\sim 10 - 12$ .

## Capítulo 2

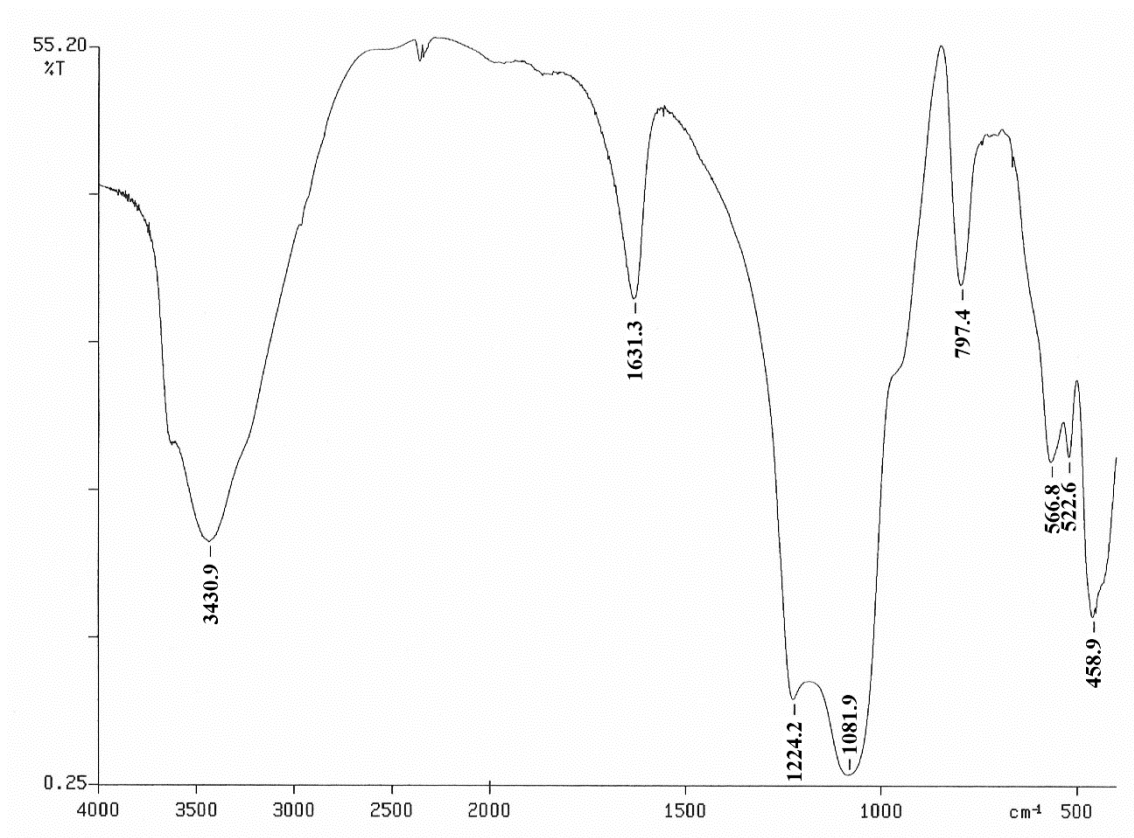
El patrón de difracción de rayos X de la zeolita Beta se recoge en el *Apéndice 1*, donde se observa su naturaleza cristalina, así como la ausencia de impurezas.

Las medidas de ICP-MS revelan que la relación de Si/Al en la nanozeolita H-Beta empleada en el presente trabajo es 11. La porosidad de la muestra se estudió por adsorción de N<sub>2</sub> (Ver *Tabla 1*).

*Tabla 1. Valores de área BET, área externa y volumen de microporo medidos por adsorción de N<sub>2</sub> para la nanozeolita H-Beta.*

Muestra	Área BET (m <sup>2</sup> /g)	Área externa (m <sup>2</sup> /g)	V <sub>microporo</sub> (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño cristal (nm)
H-Beta	757	440	0.15	~ 10 – 15

Dado que se siguieron las reacciones de funcionalización de la nanozeolita H-Beta mediante espectroscopia infrarroja, parece conveniente comenzar por la discusión del espectro registrado en nuestro laboratorio (Ver *Figura 9*), que, naturalmente, coincide con el observado en la literatura <sup>47</sup>.



**Figura 9.** Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta.

En el espectro de FTIR de la H-Beta se distinguen, en primer lugar, las bandas características del agua a 3431 y a 1631  $\text{cm}^{-1}$ , atribuidas a las vibraciones de tensión OH y de deformación fuera del plano H-O-H, respectivamente.

Para la asignación del resto de bandas existe abundante bibliografía (Ver **Tabla 2**), donde los tetraedros a los que se refiere son las unidades  $\text{TO}_4$  (T = Si o Al) de los aluminosilicatos <sup>48</sup>. Así, la banda a 1224  $\text{cm}^{-1}$  sería debida a la tensión asimétrica interna (dentro del propio tetraedro  $\text{TO}_4$ ), el pico a 1082  $\text{cm}^{-1}$ , se podría atribuir a la tensión asimétrica externa (entre tetraedros  $\text{TO}_4$ ), la absorción a 797  $\text{cm}^{-1}$ , a la tensión simétrica externa (entre tetraedros  $\text{TO}_4$ ), las bandas a 567  $\text{cm}^{-1}$  y 523  $\text{cm}^{-1}$ , a las vibraciones de doble anillo y finalmente el pico a 459  $\text{cm}^{-1}$  a la deformación O-T-O.

## Capítulo 2

*Tabla 2. Asignación de las vibraciones características de las estructuras de las zeolitas.*

Vibraciones internas (Intra-tetraedro)		Vibraciones externas (Inter-tetraedro)	
Tipo	cm <sup>-1</sup>	Tipo	cm <sup>-1</sup>
Tensión asimétrica	920–1250	Tensión asimétrica	1050–1150
Tensión simétrica	650–720	Tensión simétrica	750–870
Deformación O–T–O	420–500	Doble anillo	500–650
		Apertura de poro	300–420

Es importante señalar que las vibraciones externas son sensibles a la estructura de la zeolita.

## **2.1. Incorporación del catión cadmio**

Aunque existe una gran variedad de cationes que se pueden incorporar a las zeolitas, se escogió el cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) para empezar estos estudios por sus excelentes propiedades electroquímicas, su estabilidad en un amplio rango de pH, tal como puede verse en los diagramas  $\log C / \text{pH}$  para distintos cationes metálicos <sup>49</sup>, y por la posibilidad de comparar su eficacia con otras marcas cargadas previamente con Cd.

Para introducir este catión en la nanozeolita se hicieron varias pruebas preliminares en las que se agitaron suspensiones de nanocristales de la zeolita H-Beta en disoluciones acuosas de nitrato y de acetato de cadmio. Transcurridas aproximadamente 20 horas, se demostró electroquímicamente que, en ambos casos, la concentración de los iones que quedaban en disolución había disminuido, lo que implica que se habían incorporado a la nanozeolita. Para confirmarlo, se midió electroquímicamente la liberación de  $\text{Cd}^{2+}$  en ambas zeolitas, resultando que, aunque ambas contenían cationes de cadmio  $\text{Cd}^{2+}$ , la zeolita preparada con acetato de cadmio (II) liberaba más  $\text{Cd}^{2+}$  por gramo de zeolita que la zeolita obtenida usando nitrato de cadmio (II), por lo que se decidió preparar las nanozeolitas H-Beta con cadmio utilizando  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  como sal de partida.

Así pues, para incorporar los cationes  $\text{Cd}^{2+}$  a la zeolita, se agitó a 20 °C durante 20 horas una suspensión de H-Beta en una disolución acuosa 10 mM de acetato de cadmio (II) (Ver **Tabla 3**). El producto obtenido (H-Beta-Cd) se aisló mediante centrifugación de la mezcla final a 8000 rpm durante 2 minutos. El sólido separado se redispersó en 4 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ y se centrifugó nuevamente. Esta operación se repitió dos veces adicionales. Finalmente, el sólido se secó a vacío y 20 °C durante una noche. El rendimiento fue prácticamente cuantitativo.

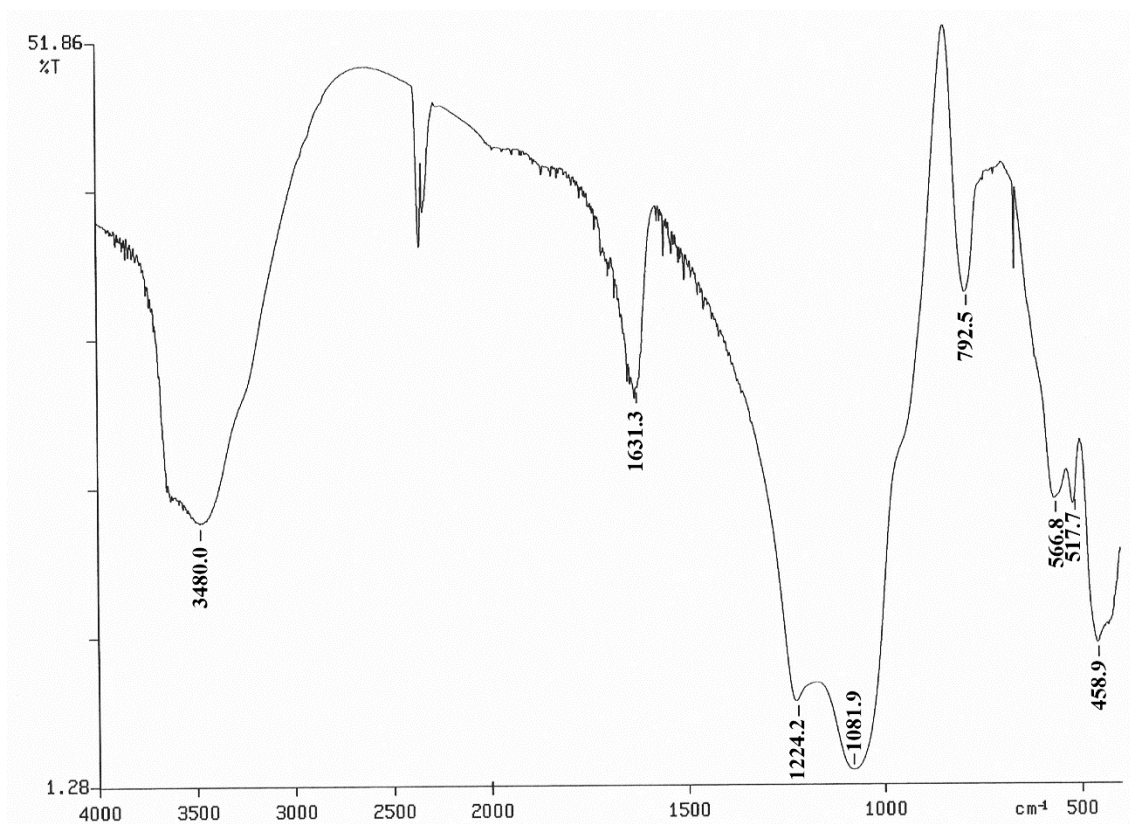
## Capítulo 2

**Tabla 3.** Datos relativos a la reacción de la H-Beta con una disolución 10 mM de acetato de cadmio (II).

<sup>1</sup>μmoles de Cd<sup>2+</sup> detectados electroquímicamente en la mezcla de aguas madres y aguas de lavado.

Producto obtenido	Zeolita de partida (mg)	Sal de Cd <sup>2+</sup> en disolución (ml)	μmoles de Cd <sup>2+</sup> en reacción añadidos	μmoles de Cd <sup>2+</sup> no incorporados <sup>1</sup>
H-Beta-Cd	175	72 (Acetato)	730	539

El espectro de infrarrojo de la H-Beta-Cd (Ver **Figura 10**) coincide con el espectro de infrarrojo de la zeolita de partida, H-Beta, en la región donde aparecen las bandas atribuidas a las vibraciones externas de los tetraedros TO<sub>4</sub>, 1200 - 400 cm<sup>-1</sup>, por lo que no parece que se hayan producido cambios estructurales en la nanozeolita al introducir los cationes metálicos. Este hecho se comprueba por difracción de rayos X en polvo (Ver difractogramas de la nanozeolita H-Beta con Cd en el **Apéndice 2**).



**Figura 10.** Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd.



Por otra parte, y como era de esperar, en el espectro de infrarrojo de la H-Beta-Cd tampoco se observan bandas correspondientes a posibles restos de iones acetato.

## Capítulo 2

### 2.2. Funcionalización con distintas aminas

Una vez introducidos los cationes metálicos en la H-Beta, se exploró la funcionalización de la nanozeolita con distintas aminas. En primer lugar, se decidió estudiar la reacción con una alquilamina,  $\text{RNH}_2$ , en parte por el interés que pueda tener en sí y, en parte, como información preliminar antes de anclar la nanozeolita a cualquier proteína requerida para formar un posible biosensor electroquímico. En efecto, si una amina  $\text{RNH}_2$  se uniese a la zeolita, sería muy probable que cualquier proteína se pudiese unir directamente a la zeolita, ya que existen muchas aminas primarias en la superficie de las proteínas. En particular, se eligió la n-octilamina, OA, porque tiene un elevado número de grupos  $\text{CH}_2$  fáciles de seguir por Espectroscopía Infrarroja y por Resonancia Magnética Nuclear de C-13 (RMN de C-13).

#### **2.2.1. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-OA**

La zeolita H-Beta-Cd se puso en contacto con OA disuelta en una mezcla de etanol/agua al 50 % en volumen, pues la OA no es soluble en agua. Esta mezcla se mantuvo en agitación a 20 °C durante 20 horas. El sólido obtenido, H-Beta-Cd-OA, se aisló mediante centrifugación. A continuación, se purificó mediante sucesivas redispersiones (en una mezcla de 2 ml de agua y 2 ml de etanol) y centrifugaciones, siendo finalmente secado a vacío. En la **Tabla 4** se recogen las condiciones de la reacción de funcionalización con la OA.

Tabla 4. Condiciones de la reacción de anclaje de la OA a la nanozeolita H-Beta-Cd.

Producto obtenido	Zeolita de partida (mg)	Disolución de OA (ml)	mM OA
H-Beta-Cd-OA	150	9	1.08

El espectro de FTIR de la H-Beta-Cd-OA indica que la n-octilamina se ha incorporado como ion octilamonio (Ver *Figura 11*).

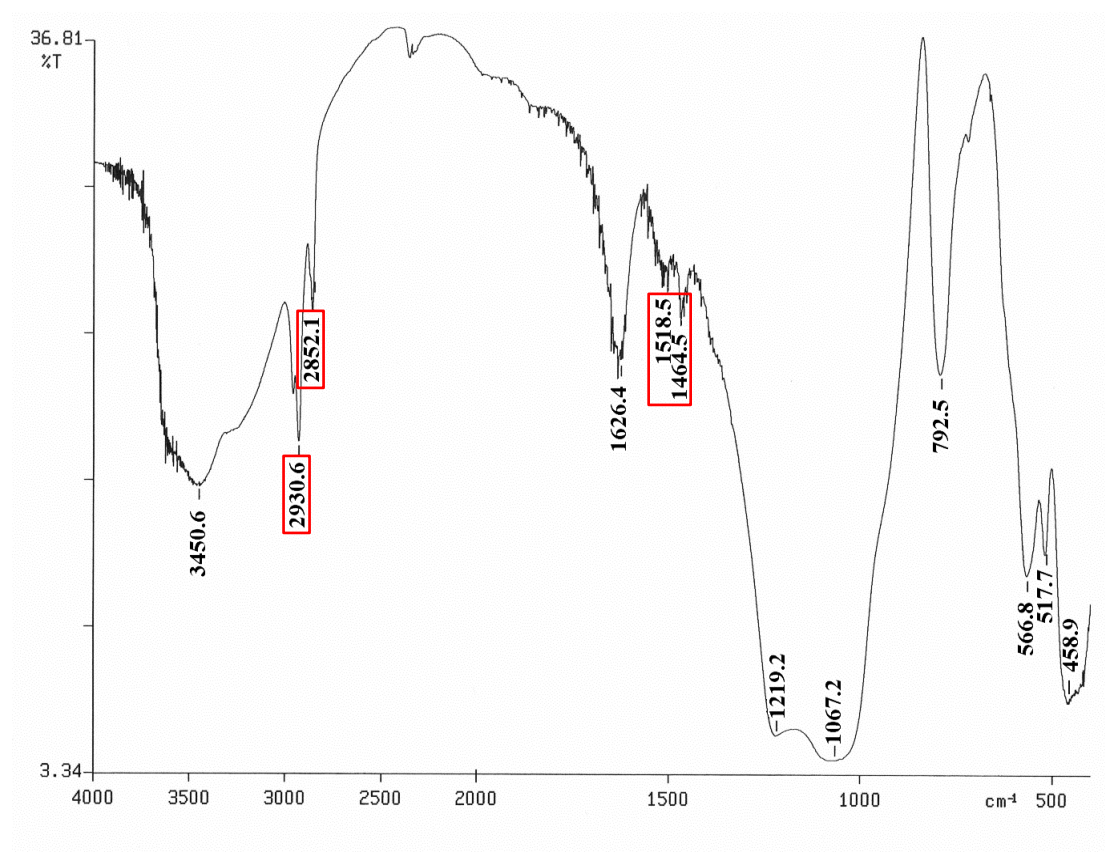


Figura 11. Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-OA.

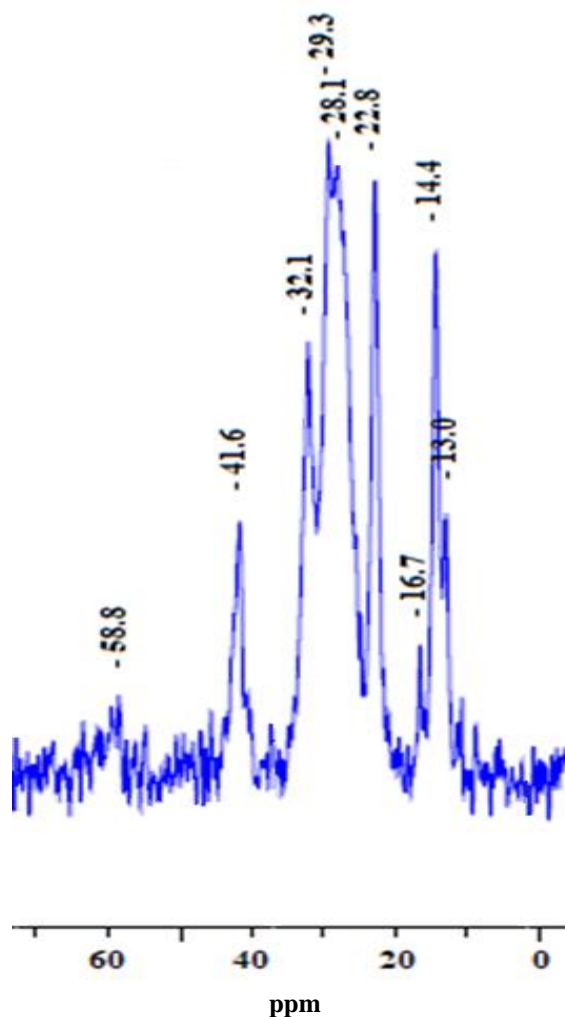
Las señales a 2931 y 2852  $\text{cm}^{-1}$  asociadas a la vibración de tensión C-H y la banda a 1465  $\text{cm}^{-1}$  asignada a la deformación del grupo  $\text{CH}_2$  indican la presencia de la OA en el sólido. Por otro lado, la existencia de una banda a 1519  $\text{cm}^{-1}$ , característica de los iones  $\text{RNH}_3^+$ , parece indicar que la amina se encuentra como catión octilamonio<sup>50</sup>. De hecho, el espectro de infrarrojo del cloruro de octilamonio muestra una banda a 1515  $\text{cm}^{-1}$ , señal

## Capítulo 2

que no existe en el espectro de la octilamina. La formación del octilamonio se produciría por transferencia de un hidrógeno de un grupo Si-O(H)-Al ácido de la zeolita a la OA.

En el espectro de infrarrojo (Ver *Figura 11*), la zona de 1200-400  $\text{cm}^{-1}$  no presenta alteraciones significativas respecto al espectro de la H-Beta, por lo que la incorporación de la OA no parece alterar la estructura de la nanozeolita. El difractograma de rayos X de la H-Beta-Cd-OA confirmó que la estructura original de la zeolita permanece intacta (Ver *Apéndice 3*).

Para obtener información adicional sobre la forma en que se encuentra la OA en la H-Beta-Cd-OA, se registró su espectro de RMN de C-13 en sólido (CP-MAS), que puede verse en la *Figura 12*.

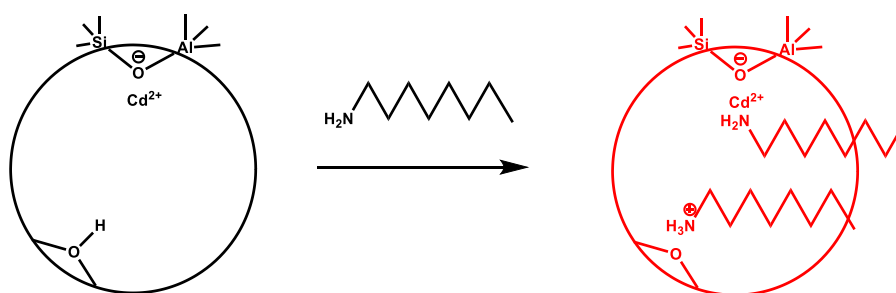


*Figura 12.* RMN de C-13 en sólido (CP-MAS) de la nanozeolita H-Beta-Cd-OA.

En primer lugar, el espectro parece confirmar que se ha formado el catión octilamonio, pues, las bandas a 41.6, 32.1, 29.3, 28.1, 22.8 y 14.4 ppm del espectro se asemejan bastante a las que aparecen en la bibliografía para el cloruro de octilamonio en DMSO-d6 (38.7, 31.2, 28.5, 26.9, 25.9, 22.1 y 14.0 ppm), y coinciden aún mejor con las señales del tetrafluoroborato de octilamonio en CD<sub>3</sub>CN (41.4, 32.5, 29.8, 29.7, 27.7, 26.9, 23.4 y 14.4 ppm) <sup>51</sup>.

Por otra parte, en el espectro recogido en la **Figura 12** aparecen más señales, a 58.8, 16.7 y 13.0 ppm. La existencia de más de un pico próximo a 14 ppm podría ser atribuible al CH<sub>3</sub> terminal en distintos entornos químicos, lo que no es sorprendente dada la longitud de la cadena. Sin embargo, la señal a 58.8 ppm sugiere que la OA también se encuentra unida al cadmio, ya que los carbonos alfa de las aminas coordinadas a centros metálicos suelen aparecer en las proximidades a los 60 ppm <sup>52-54</sup>.

Por tanto, lo más probable es que la OA se haya incorporado a la zeolita de dos formas diferentes, a través de un enlace iónico entre el octilamonio y un puente óxido desprotonado, y uniéndose al cadmio como ligando (Ver **Figura 13**). Nótese que, mientras que el catión octilamonio puede quedarse en la superficie o penetrar en el interior de la zeolita, para que la OA puede actuar como ligando la amina debe entrar dentro de la zeolita, lo que también podría explicar los distintos entornos del metilo terminal (señales en torno a 14 ppm).



**Figura 13.** Modos de unirse la OA a la nanozeolita H-Beta-Cd.

## Capítulo 2

### 2.2.2. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA

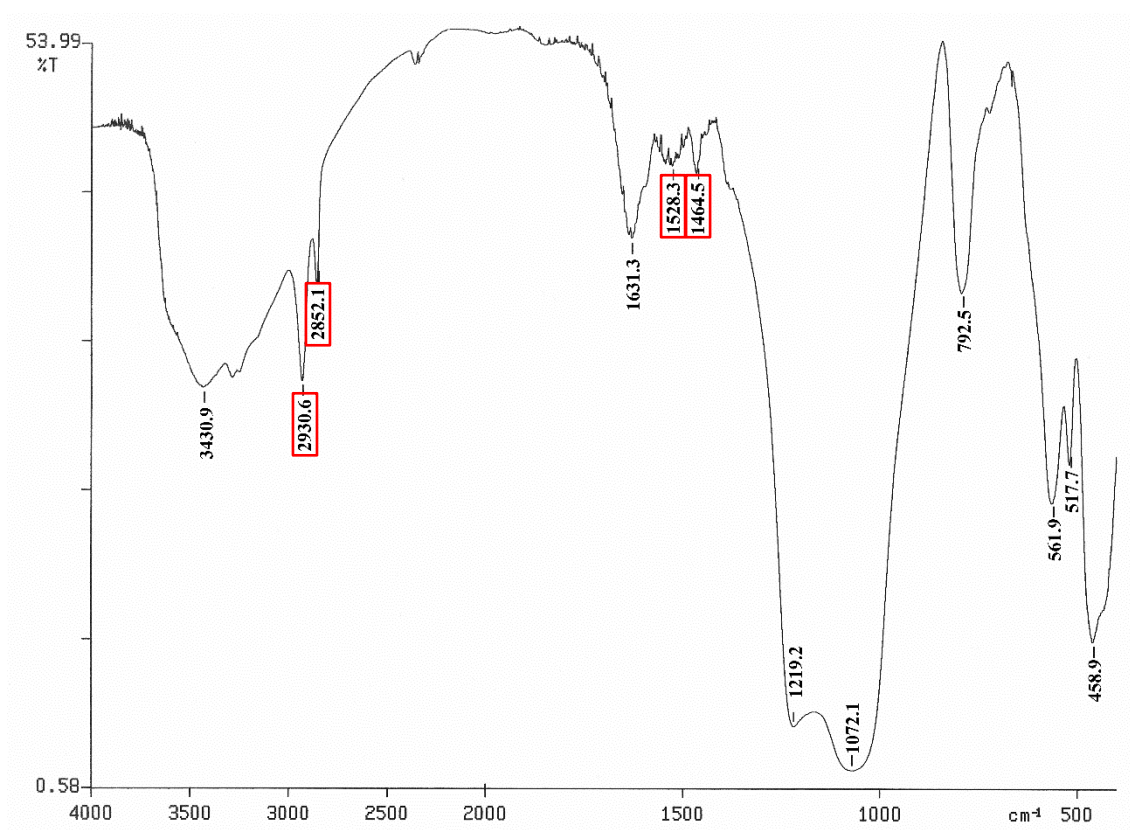
A continuación, se decidió explorar la reactividad de la nanozeolita H-Beta cargada con cadmio con una diamina como la 1,8-octanodiamina, ODA. Aparte de ampliar los modos de funcionalizar la zeolita, la ODA presenta un interés adicional ya que, si se uniera por un extremo a la zeolita y quedara libre el otro extremo amino, permitiría anclar las nanozeolitas a las posibles proteínas necesarias para construir biosensores electroquímicos mediante una reacción posterior con el glutaraldehído. Este dialdehído podría actuar como puente entre la zeolita funcionalizada y la proteína, formando grupos imina tanto con los grupos amino de la ODA (amina unida a la zeolita) como con los grupos NH<sub>2</sub> de la propia proteína.

La reacción de la nanozeolita H-Beta-Cd con la diamina 1,8-octanodiamina se llevó a cabo a 20 °C durante 20 horas. Los detalles de las condiciones de la reacción están recogidos en la **Tabla 5**. El sólido obtenido, H-Beta-Cd-ODA, se aisló y purificó mediante centrifugación y redispersión en agua miliQ, y finalmente fue secado a vacío.

**Tabla 5.** Condiciones de la reacción de anclaje de la ODA a la nanozeolita H-Beta-Cd.

Producto obtenido	Zeolita de partida (mg)	Disolución de ODA (ml)	mM ODA
H-Beta-Cd-ODA	150	15	6.35

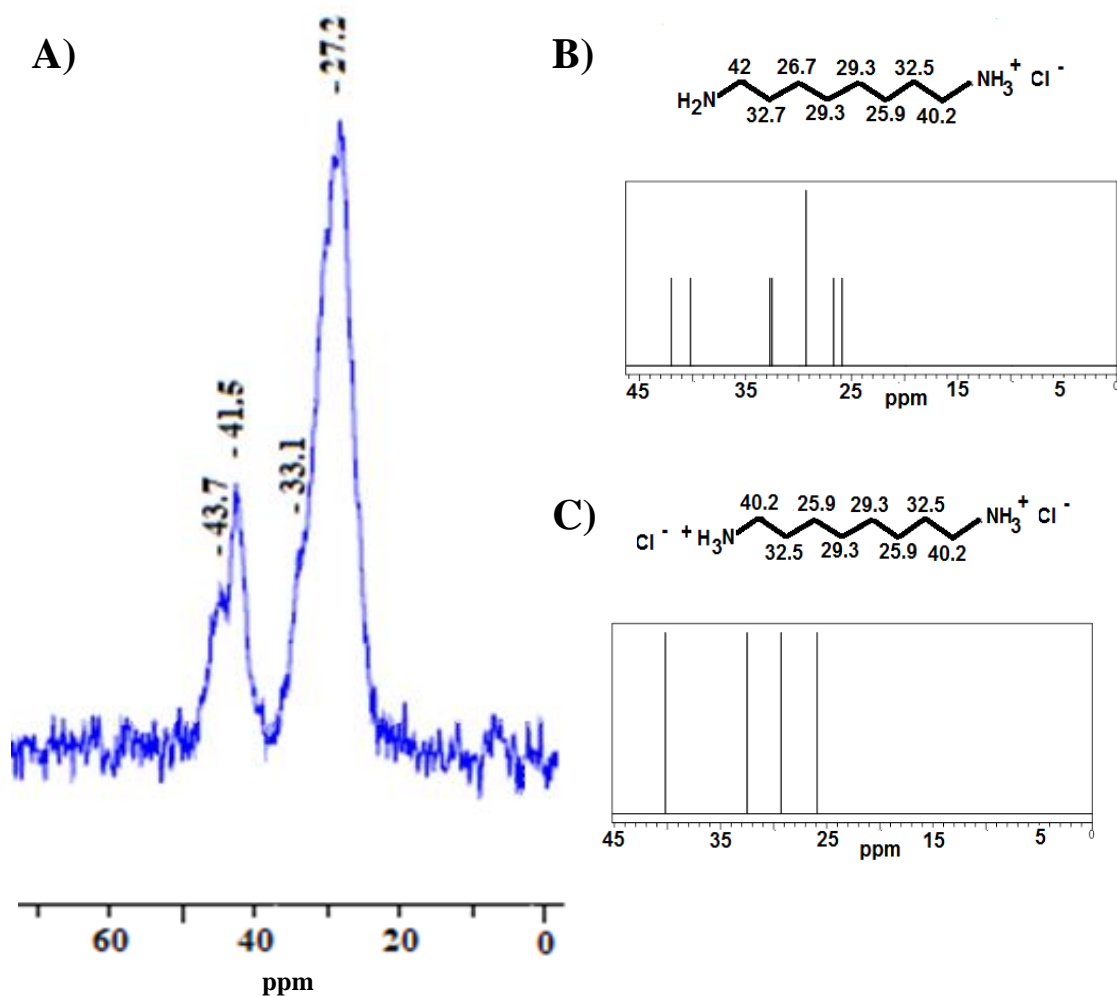
En el espectro de IR de la H-Beta-Cd-ODA (Ver **Figura 14**) se observan las bandas a 2931, 2852 y 1465 cm<sup>-1</sup> características de los grupos CH<sub>2</sub> del resto alquílico de la amina, y a 1528 cm<sup>-1</sup> se aprecia la señal atribuible a los grupos amonio (RNH<sub>3</sub><sup>+</sup>)<sup>50</sup>. Esto indica que la 1,8-octanodiamina se ha incorporado a las zeolitas en forma de amonio.



*Figura 14.* Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA.

Debe señalarse que el espectro de FTIR (Ver **Figura 14**) no presenta alteraciones significativas en la zona de 1200-400  $\text{cm}^{-1}$  respecto al espectro de la H-Beta, por lo que la incorporación de la ODA no parece alterar la estructura de la nanozeolita. El difractograma DRX de la H-Beta-Cd-ODA confirmó que la estructura de la nanozeolita inicial permanece inalterada (Ver **Apéndice 4**).

El espectro de RMN de C-13 en sólido (CP-MAS) de la H-Beta-Cd-ODA puede verse en la **Figura 15 (A)**. A efectos orientativos, se han incluido en la misma **Figura 15** las predicciones del programa ChemDraw para los espectros de RMN de C-13 de la 1-8-octanodiamina sencilla (**B**) y doblemente protonada (**C**).



**Figura 15.** A) RMN de C-13 en sólido (CP-MAS) de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA, B) RMN de C-13 en disolución simulado (ChemDraw) para la  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_8\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$  y C) RMN de C-13 en disolución simulado (ChemDraw) para la  $\text{Cl}^- + \text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_8\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$ .

Lo más importante es que no presenta ninguna señal cerca de 60 ppm, por lo que parece que la diamina no se ha unido al cadmio. El espectro RMN de C-13 de la H-Beta-Cd-ODA se parece más al predicho para la amina protonada en un extremo, y, además, es similar al espectro RMN de C-13 de la ODA unida por un extremo a un fullereno<sup>55</sup>. Por tanto, parece que la ODA se ha unido a la zeolita por un solo extremo tal como se indica en la **Figura 16**.



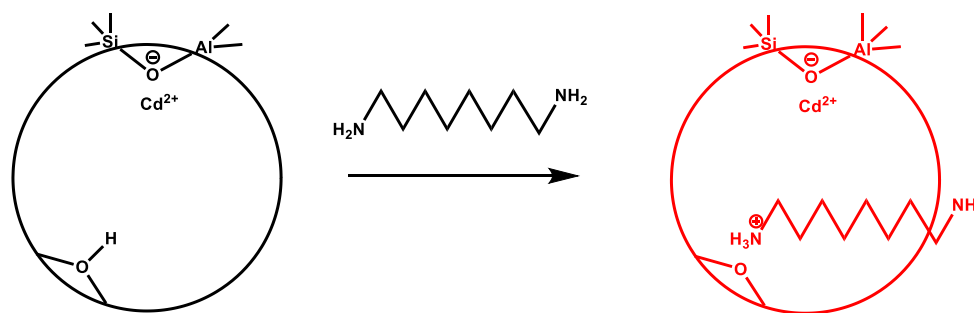


Figura 16. Modo de unirse la ODA a la nanozeolita H-Beta-Cd.

### 2.2.3. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-TREN

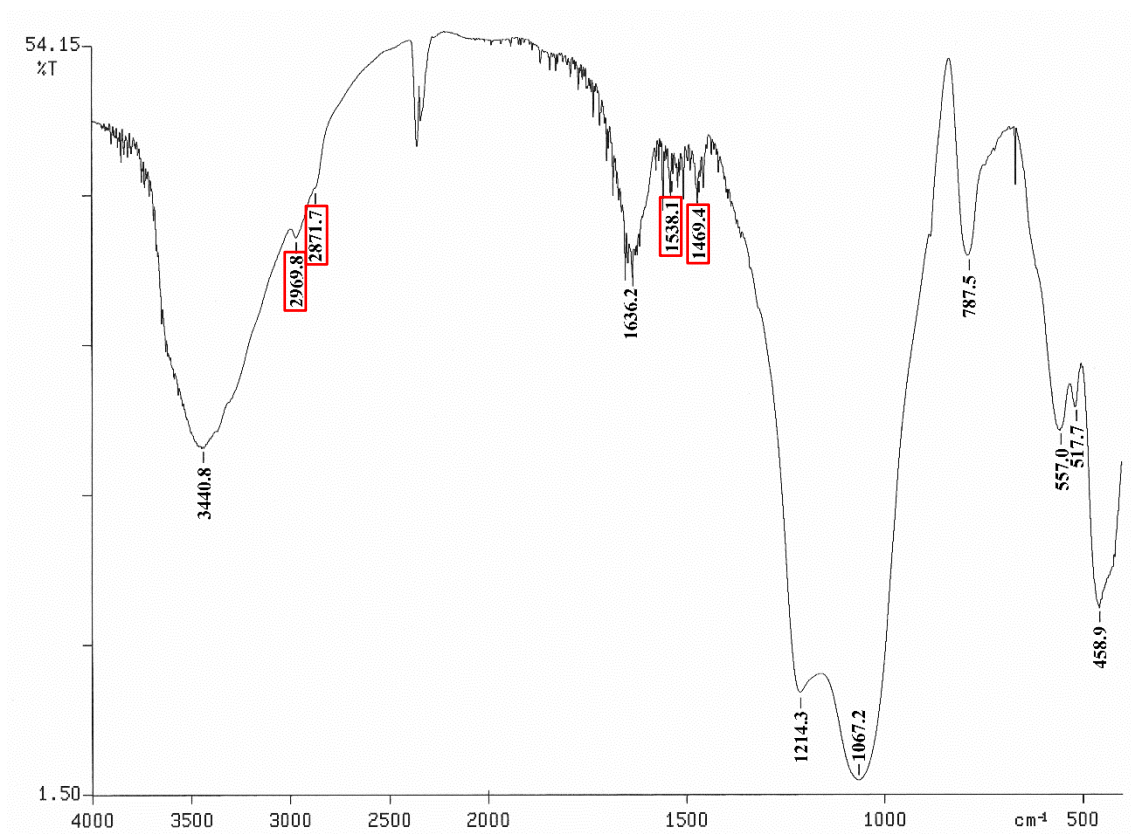
Además de las aminas expuestas anteriormente, también se exploró la reactividad de la nanozeolita H-Beta-Cd con una tetramina como la tris(3-aminoetil)amina, TREN, con el objetivo de abrir nuevas vías de anclaje para unir las nanozeolitas a una proteína dada (usando el glutaraldehído como puente entre las zeolitas y las proteínas).

La reacción de las nanozeolita con la tetramina TREN se llevó a cabo a 20 °C durante 20 h. Los detalles de las condiciones de la reacción están recogidos en la **Tabla 6**. El sólido obtenido, H-Beta-Cd-TREN, se aisló mediante sucesivos procesos de centrifugación y redispersión en agua miliQ, y, finalmente, se secó a vacío.

Tabla 6. Condiciones de la reacción de anclaje de la TREN a la nanozeolita H-Beta-Cd.

Producto Obtenido	Zeolita de partida (mg)	Disolución de TREN (ml)	mM TREN
H-Beta-Cd-TREN	130	7.8	0.94

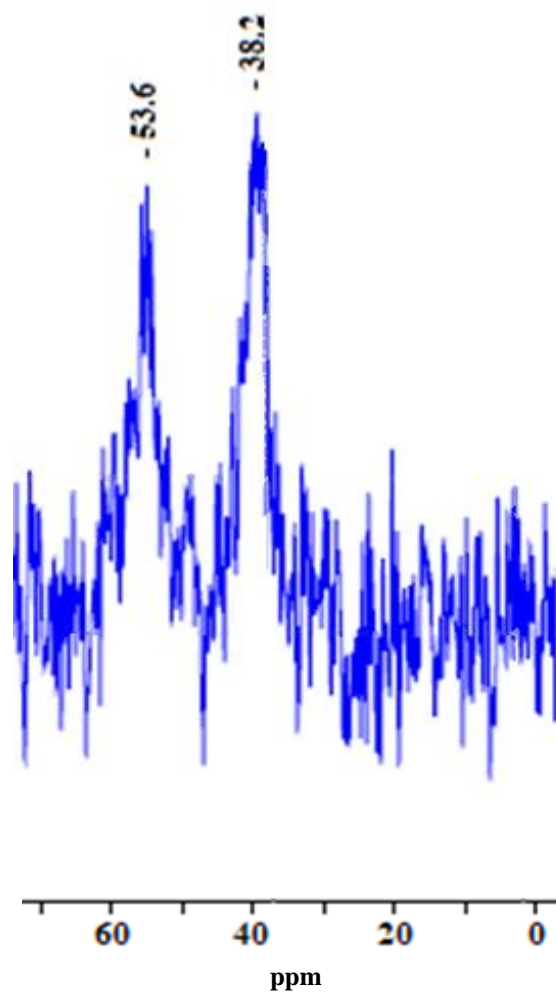
En el espectro FTIR de la H-Beta-Cd-TREN, recogido en la **Figura 17**, se observan las bandas a 2970, 2872 y 1469  $\text{cm}^{-1}$ , características de los grupos  $\text{CH}_2$  del resto alquílico de la amina. Además, aparece también otra señal a 1538  $\text{cm}^{-1}$  típica de los grupos amonio ( $\text{RNH}_3^+$ ), que confirma la incorporación de la tris(2-aminoetil)amina a la H-Beta-Cd<sup>50</sup>.



*Figura 17. Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-TREN.*

De nuevo, tanto el espectro de FTIR (Ver *Figura 17*, en la zona de 1200-400  $\text{cm}^{-1}$ ) como el difractograma de rayos X de la zeolita (Ver *Apéndice 5*), muestran que la H-Beta-Cd-TREN tiene la misma estructura que la zeolita de partida.

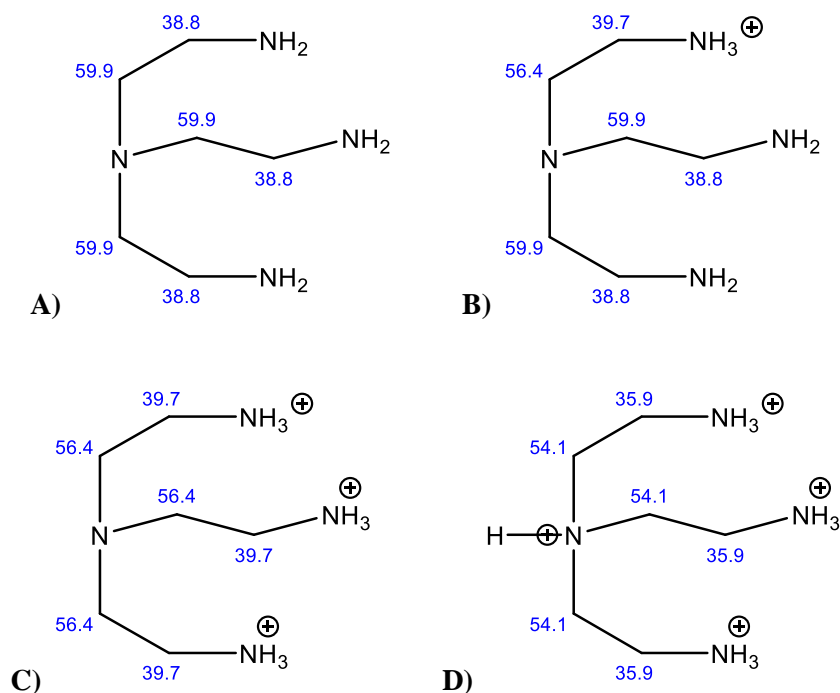
El espectro RMN de C-13 del sólido H-Beta-Cd-TREN está recogido en la *Figura 18* y aporta información complementaria. El hecho de que mayoritariamente aparezcan dos señales en el espectro indicaría que la disposición que adopta la TREN en la zeolita presenta una gran simetría. No obstante, la resolución del espectro no permite descartar la presencia de algunas bandas minoritarias adicionales.



*Figura 18. RMN de C-13 en sólido (CP-MAS) de la nanozeolita H-Beta-Cd-TREN.*

A efectos comparativos se muestran en la **Figura 19** algunas de las predicciones del programa ChemDraw para la tetramina TREN, con diversos grados de protonación, A) sin protonar, B) con algún amino terminal protonado, C) con todos los grupos amino terminales protonados y D) con todos los nitrógenos protonados. Se ha incluido la predicción para la propia TREN para visualizar la tendencia de los desplazamientos al protonarse la tetramina. Las estructuras B, C y D presentan grupos amonio ( $\text{RNH}_3^+$ ), que serían compatibles con los datos registrados por infrarrojo y RMN de C-13.

## Capítulo 2



**Figura 19.** Predicciones del programa ChemDraw para cuatro posibles estructuras de la tetramina TREN. A) sin protonar, B) parcialmente protonada, C) triplemente protonada, D) cuádruplemente protonada.

Teniendo en cuenta las señales de la TREN libre en  $\text{CDCl}_3$  (57.7 y 39.9 ppm) y las predicciones del programa, las bandas a 53.6 y 38.2 de la **Figura 18**, podrían sugerir que la estructura que adopta la tetramina en la zeolita podría ser la C, es decir, que, tras la reacción con la nanozeolita, la TREN se protonaría en los grupos amino terminales (Ver **Figura 20**). No obstante, una configuración de este tipo significaría la presencia de un gran número de protones en la estructura zeolítica, y, por tanto, una relación Si/Al muy baja (Si/Al  $\sim 2 - 5$ ). Dado que, en este caso, la relación de la nanobeta es significativamente más alta (Si/Al  $\sim 10 - 12$ ), seguramente la TREN se debe encontrar en una situación más próxima a la B (Ver **Figura 19**). Se necesitaría una mayor resolución en el espectro de RMN de C-13 para poder asignar con mayor precisión la conformación exacta de la molécula TREN en la nanozeolita Beta.

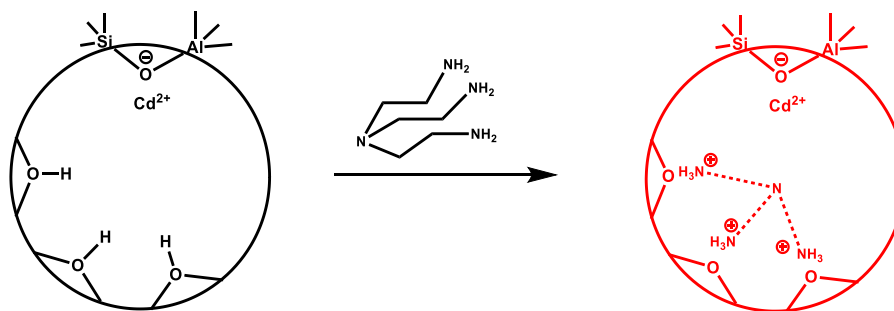


Figura 20. Modo de unirse la TREN a la nanozeolita H-Beta-Cd.

### 2.2.4. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH

Finalmente, se hizo reaccionar la nanozeolita H-Beta-Cd con la amina polimérica polialilamina.

Además de ampliar la variedad de funcionalizaciones, la reacción con polialilamina también resultaría apropiada para que la nanozeolita se anclase a cualquier proteína. El polímero se uniría a la nanopartícula a través de varios grupos amino dejando otros grupos  $-NH_2$  o  $-NH_3^+$  libres para unirse a moléculas de glutaraldehído, que podrían formar puentes con las proteínas deseadas. (Ver *Figura 21 I*). Para ello, las moléculas de glutaraldehído deberían formar grupos imina por un lado con la polialilamina y por el otro con las proteínas. No obstante, debe tenerse en cuenta que siempre cabe la posibilidad de que la polialilamina se una a más de una nanozeolita y se produzcan aglomeraciones indeseadas (Ver *Figura 21 II*).

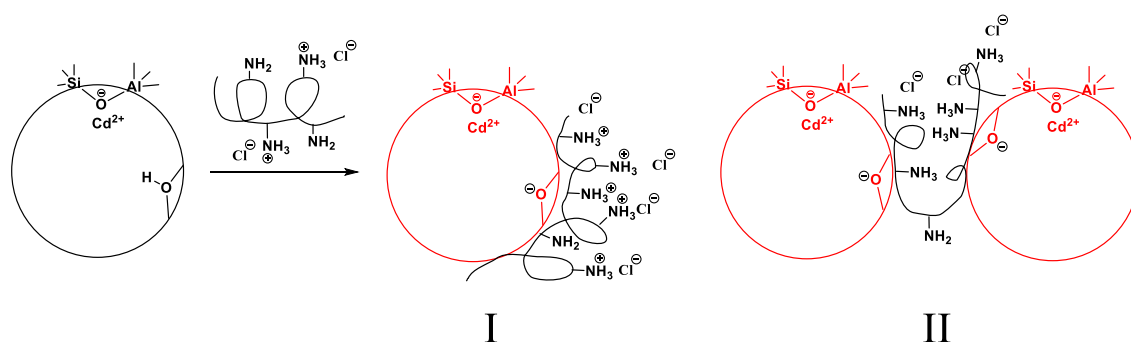
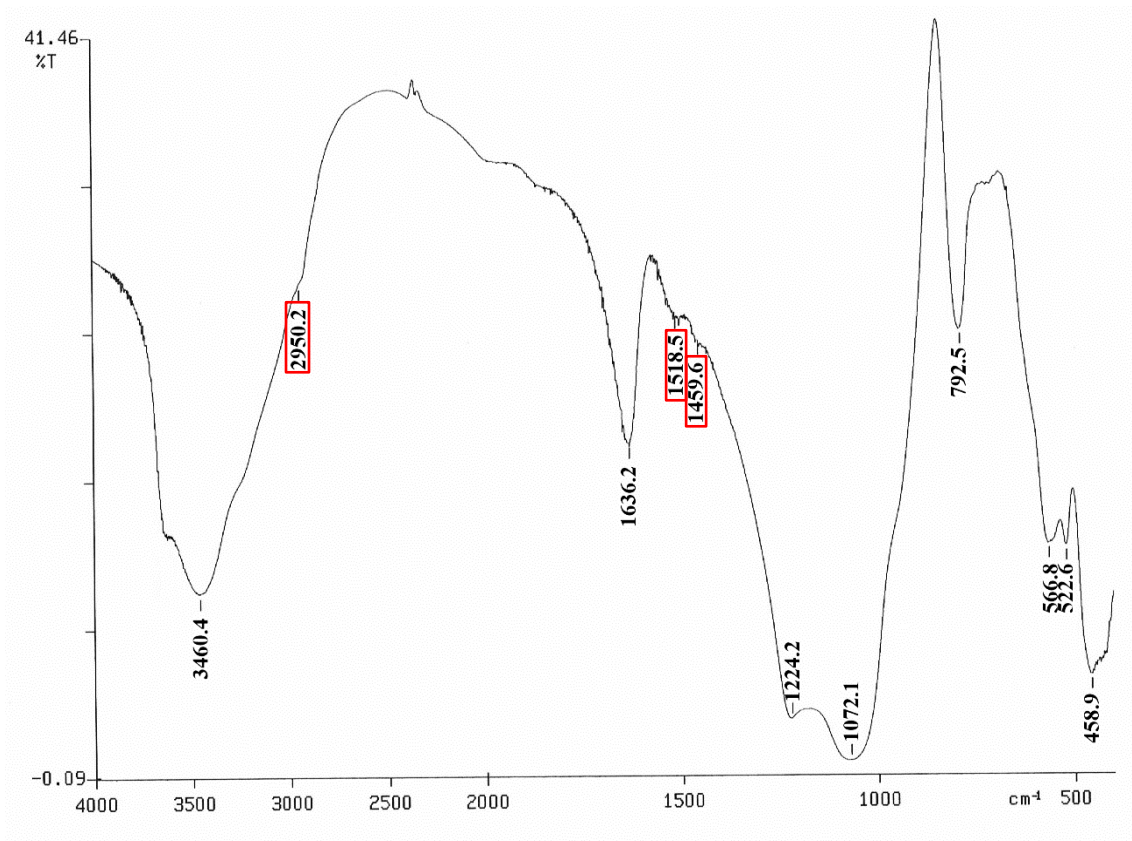


Figura 21. Modo de unirse la PAH a la nanozeolita H-Beta-Cd.

## Capítulo 2

Dado que la polialilamina comercial está disponible como poli(cloruro de alilamonio), PAH, que no podría reaccionar con la zeolita, ya que todos los grupos aminos están protonados, se llevó a cabo la reacción en un medio neutro. Para lograrlo, se empleó como disolvente una mezcla 1/1 en volumen de agua mQ y una disolución tampón PBS a pH 7.1. En particular, se sometió a ultrasonidos una suspensión de 60 mg de la nanozeolita H Beta-Cd en una mezcla de 6 ml de H<sub>2</sub>O mQ y 6 ml de una disolución de PAH en PBS con una concentración de 5 mg/ml ( $2 \cdot 10^{-3}$  mmol de PAH). El sólido obtenido, H-Beta-Cd-2-PAH, se aisló siguiendo el procedimiento habitual, centrifugando y dispersando en agua miliQ. Finalmente se secó a vacío.

El espectro de FTIR de la H-Beta-Cd-PAH (Ver *Figura 22*), revela la presencia de la banda a  $1519 \text{ cm}^{-1}$  típica de los grupos amonio ( $\text{RNH}_3^+$ )<sup>50</sup>, y las señales a 2950 y  $1460 \text{ cm}^{-1}$  características de los grupos CH<sub>2</sub> y CH del polímero parcial o totalmente protonado, lo que implica que el polímero se ha anclado en la zeolita.



*Figura 22. Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH.*

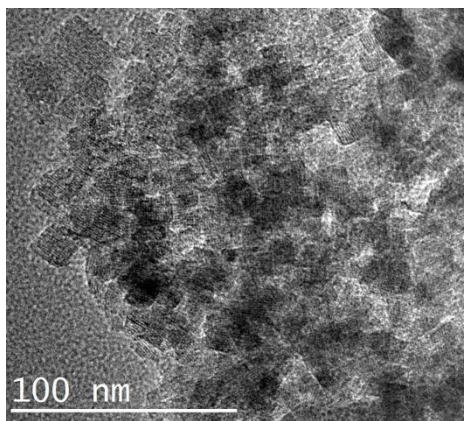
Como se puede observar, tanto el espectro de FTIR (Ver *Figura 22*, en la zona de  $1200\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) como el difractograma de rayos X de la zeolita (Ver *Apéndice 6*), confirman que la H-Beta-Cd-PAH tiene la misma estructura que la zeolita de partida.

### **2.2.5. Discusión del HR-TEM de los derivados de la nanozeolita H-Beta**

Tal y como se indicó anteriormente, es posible que la polialilamina se una a varias nanozeolitas y forme agregados (Ver *Figura 21 II*). Para comprobarlo, se registraron micrografías HR-TEM de la H Beta-Cd-PAH.

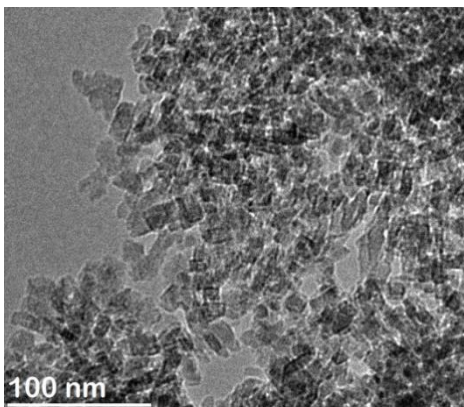
En la *Figura 23* se muestra una micrografía representativa de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH. Como puede apreciarse en la imagen, la aglomeración es evidente, a pesar de haber estado sometida la muestra a 10 minutos en ultrasonidos justo antes de realizar las medidas de HR-TEM.

## Capítulo 2



*Figura 23. Micrografía HR-TEM de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH.*

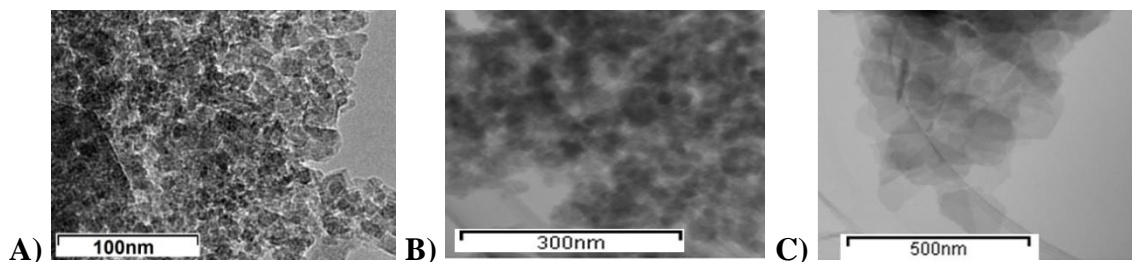
Sin embargo, para llegar a una conclusión más precisa, es necesario comparar la micrografía de la **Figura 23** con una micrografía similar de, al menos, la zeolita de partida. Pues bien, la micrografía HR-TEM de la H Beta mostrada en la **Figura 24** exhibe un grado de aglomeración similar.



*Figura 24. Micrografía HR-TEM de la nanozeolita H-Beta.*

Aparentemente, lo que ha ocurrido es que la aglomeración inicial no se ha roto a lo largo de las reacciones llevadas a cabo. Para confirmar esta hipótesis, se llevaron a cabo medidas HR-TEM de las distintas nanozeolitas restantes obtenidas a partir de la H-Beta. El resultado se muestra en la **Figura 25**.





**Figura 25.** Micrografías HR-TEM de A) H Beta-Cd, B) H-Beta-Cd-ODA y C) H-Beta-Cd-TREN.

En todas ellas se aprecia, que, a pesar de ser sometidas a ultrasonidos antes de llevar a cabo las mediciones, las nanopartículas permanecen aglomeradas entre sí y que la funcionalización no sirve para separarlas.

Las aglomeraciones de las nanozeolitas podrían dificultar su posterior dispersión, y, por tanto, su eficiente homogeneización para poder llevar a cabo las medidas electroquímicas de manera reproducible.

Es conocido que la neutravidina puede ayudar a solubilizar las nanopartículas a las que se une, por lo que en el siguiente apartado intentaremos evaluar si su incorporación puede favorecer su dispersabilidad en el medio. Ahora bien, si tal dispersión no sucediera, es previsible que las medidas electroquímicas no sean reproducibles, tal como se ha señalado anteriormente. Además, la agregación de nanozeolitas, dado su tamaño, dificultaría por razones puramente estéricas la unión de la neutravidina (enlazada a parte de las zeolitas que conforman el aglomerado) a la biotina anclada en el electrodo y, como consecuencia, las medidas de afinidad podrían resultar negativas en muchos casos.

Por otro lado, la agregación de nanozeolitas podría llegar a impedir la preparación de marcas de pequeño tamaño. Este hecho podría limitar la utilidad de las nanozeolitas como marcas, ya que éstas, para ser útiles, deben ser de escaso diámetro. En efecto, las marcas de cierto tamaño comprometen la movilidad (y por ello la utilidad) de las plataformas de las que forman parte.

## Capítulo 2

### 2.3. Incorporación de la neutravidina

A continuación, se decidió incorporar la neutravidina a la nanozeolita H-Beta, en parte para comprobar si mejora la dispersión de los cristales de la nanozeolita, y en parte para completar la experiencia adquirida al funcionalizar dicha nanozeolita. En concreto, se intentó unirla a la NAV, bien directamente, o bien, utilizando glutaraldehído como puente entre la amina unida previamente a la nanozeolita y la neutravidina.

#### 2.3.1. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-NAV

Inicialmente se hizo reaccionar la zeolita H-Beta cargada con cadmio con la neutravidina, esperando que ésta se uniera directamente a la H-Beta-Cd como lo hizo la n-octilamina, pues la NAV dispone de suficientes aminas primarias en su superficie.

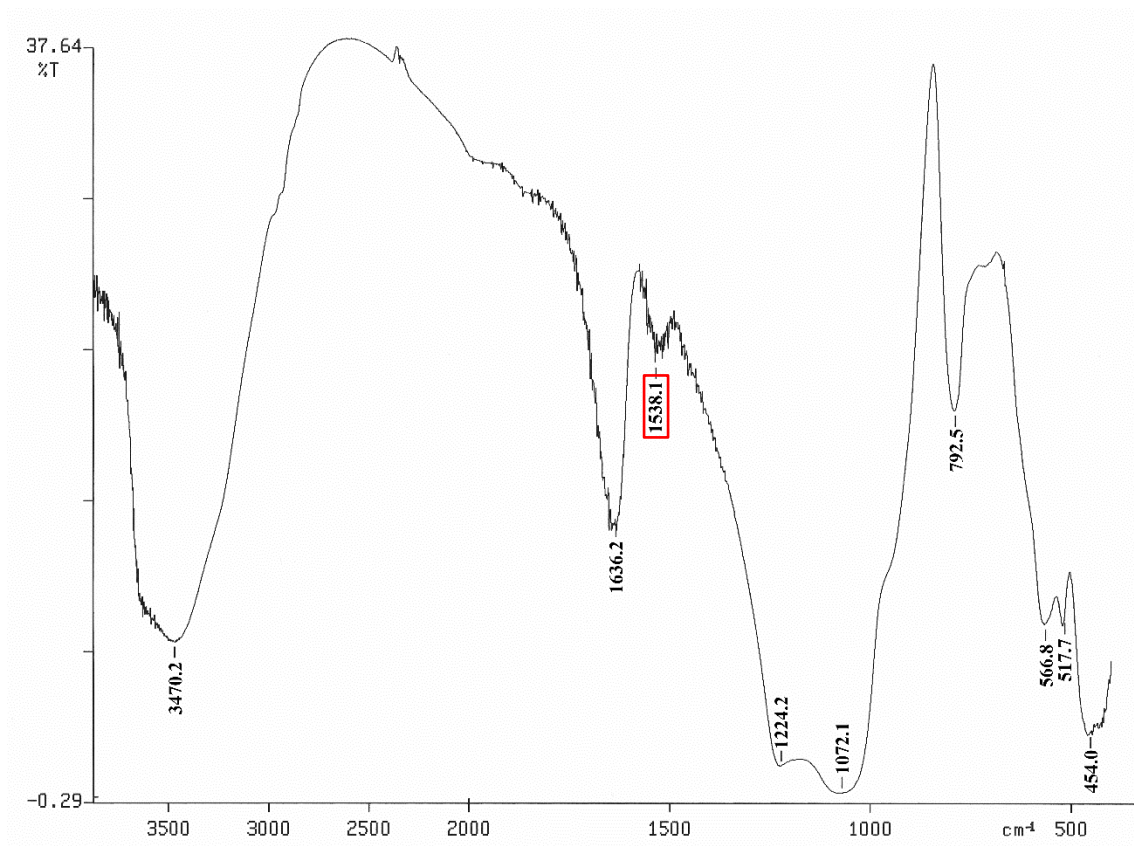
La reacción se llevó a cabo preparando una suspensión de 5 mg de nanozeolita H-Beta-Cd en 150  $\mu\text{l}$  de una disolución acuosa de neutravidina con una concentración de 1 mg/ml ( $2.5 \times 10^{-6}$  mmol de NAV), agitando la suspensión resultante en un vórtex a temperatura ambiente durante 24 horas. La relación estimada de ( $n^\circ$  moléculas de NAV) / ( $n^\circ$  partículas de zeolita con Cd\*) fue 1.26. El sólido obtenido, H-Beta-Cd-NAV, se aisló y purificó mediante el método habitual de centrifugación y redispersión en agua miliQ y, finalmente, se secó a vacío.

Del espectro de infrarrojo de la H-Beta-Cd-NAV (Ver **Figura 26**) se deduce que la NAV se ha incorporado con éxito a la nanozeolita H-Beta-Cd, como sugiere la aparición de la banda a  $1538\text{ cm}^{-1}$ , atribuible a la NAV. Como se indica en la bibliografía<sup>56, 57</sup>, las bandas más intensas de la neutravidina aparecen a  $1660$  y  $1540\text{ cm}^{-1}$  y corresponden a las bandas I y II de las amidas secundarias,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{NHR}-$ , tan abundantes

---

\* Se tuvieron en cuenta las siguientes suposiciones: a)  $\emptyset$  = promedio de nanopartícula calculado a partir de las micrografías del TEM; b) Nanopartículas = esferas  $\rightarrow V = 4/3 \pi r^3$ ; c) Densidad =  $1\text{ g/cm}^3$ . Estas aproximaciones se utilizaron en el resto de los resultados que aparecen en la presente tesis doctoral.

en las proteínas. La primera es debida a la tensión C=O mientras que la segunda es atribuible al acoplamiento de las vibraciones de deformación NH y de tensión C-N<sup>58</sup>. La banda I estaría oculta por la absorción de la banda de deformación H-O-H del agua a 1636 cm<sup>-1</sup>.



**Figura 26.** Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-NAV.

Dado que la zona del espectro de FTIR sensible a los cambios estructurales de las zeolitas (zona de 850-400 cm<sup>-1</sup> del espectro de FTIR de la **Figura 26**) permanece prácticamente inalterada, debe suponerse que la NAV queda adherida a la superficie de las nanozeolitas. En este punto es difícil aseverar si la unión entre la NAV y la zeolita es electrostática, tal y como ocurría anteriormente en el caso de la OA, ya que la banda debida a los iones alquilamonio formados quedaría tapada por la señal II de las amidas.

## Capítulo 2

### 2.3.2. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu

A continuación, se hizo reaccionar la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA con glutaraldehído seguida de una segunda reacción con NAV.

En primer lugar, se suspendieron 30 mg de la nanozeolita ya funcionalizada con 1,8-octanodiamina, H-Beta-Cd-ODA, en 3 ml de una disolución acuosa de glutaraldehído 423.49 mM (1.27 mmol de glutaraldehído), sometiendo la suspensión resultante a ultrasonidos durante 5 minutos. La relación estimada de (n° moléculas de Glu) / (n° partículas de zeolita con ODA) fue  $10^5$ . El sólido resultante, H-Beta-Cd-ODA-Glu, de color rojizo, se aisló y purificó mediante el método habitual de centrifugación y redispersión en agua miliQ y, finalmente, fue secado a vacío.

Al comparar el espectro de FTIR de la H-Beta-Cd-ODA-Glu (Ver *Figura 27*) con el espectro de infrarrojo de la nanozeolita de partida (Ver *Figura 14*), se observa la desaparición de la banda a  $1528\text{ cm}^{-1}$ , atribuida a la presencia de iones alquilamonio, la aparición de un hombro a  $1720\text{ cm}^{-1}$ , debido sin duda a la banda de tensión C=O del glutaraldehído, y la permanencia de las señales a  $2931$ ,  $2862$  y  $1460\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a los grupos  $\text{CH}_2$  de la amina y del glutaraldehído. Todo ello puede interpretarse como la formación de un grupo imina,  $-\text{CH}=\text{N}-$ , a partir de un grupo amonio de la ODA unida a la zeolita y el glutaraldehído añadido, lo que explicaría la coloración amarillo-rojiza de la zeolita resultante (se ha comprobado por experimentos efectuados en el laboratorio que la 1,8-octanodiamina se colorea de amarillo en presencia de glutaraldehído) (Ver *Figura 28 I*).

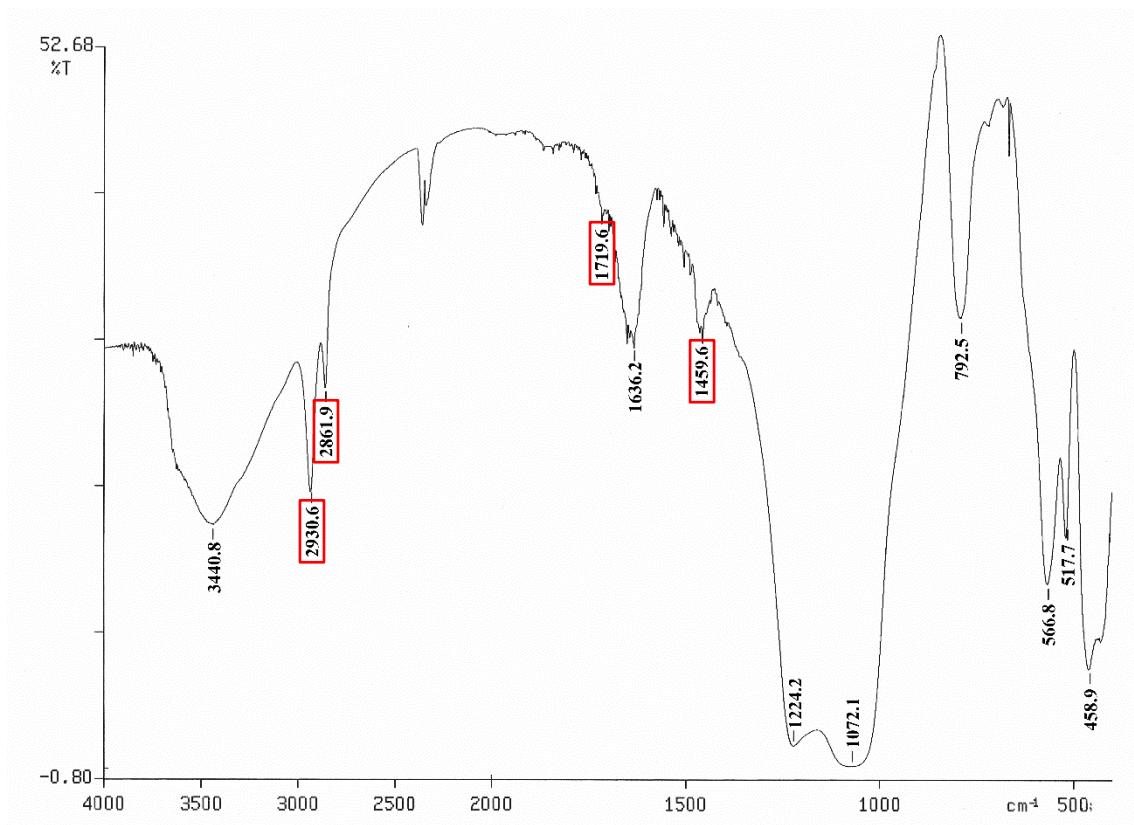


Figura 27. Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu.

Además, es posible que el grupo imina formado pueda coordinarse al cadmio. La banda propia de la imina (libre o coordinada a un metal), que aparece hacia  $1630\text{ cm}^{-1}$ , estaría oculta por la banda de deformación H-O-H del agua <sup>59</sup>.

Por otro lado, el grupo amino libre de la ODA también podría haber reaccionado, como cabría esperar, con otro glutaraldehído (Ver **Figura 28 II**). En todo caso, es seguro que quedan libres grupos aldehídos capaces de enlazarse a la neutravidina.

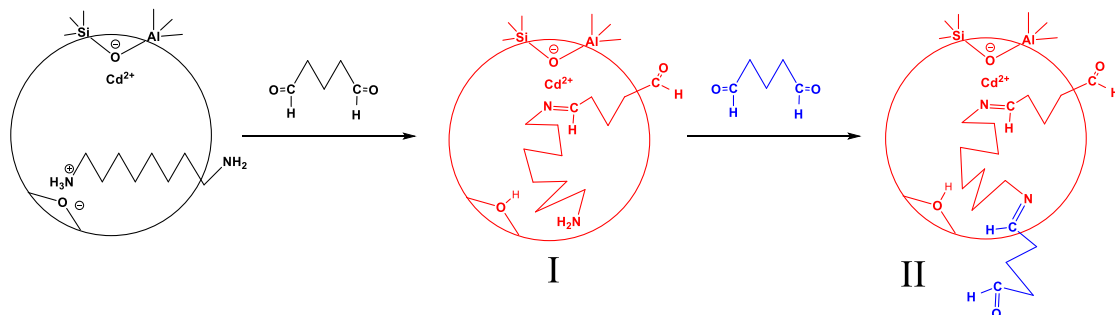


Figura 28. Formación de grupos imina en la síntesis de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu.

## Capítulo 2

### 2.3.3. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu-NAV

Tras la reacción de la H-Beta-Cd-ODA con el glutaraldehído y subsiguiente formación de la zeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu, se hizo reaccionar esta última zeolita con neutravidina.

Se dispersaron 5 mg de la zeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu en 150  $\mu$ l de una disolución acuosa de neutravidina con una concentración de 1 mg/ml ( $2.5 \times 10^{-6}$  mmol de neutravidina), agitando a en un vórtex a temperatura ambiente durante 24 horas. La relación estimada de (n° moléculas de NAV) / (n° partículas de zeolita con Glu) fue 1.26. El sólido obtenido, H-Beta-Cd-ODA-Glu-NAV, de color rojizo, se aisló y purificó mediante el método habitual de centrifugación y redispersión en agua miliQ y, finalmente, se secó a vacío.

El espectro de IR de la H-Beta-Cd-ODA-Glu-NAV (Ver **Figura 29**), muestra una banda a  $1529 \text{ cm}^{-1}$  característica de los grupos amida,  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ , que junto a la desaparición de la señal a  $1720 \text{ cm}^{-1}$ , típica del grupo aldehído,  $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$ , sugiere que la neutravidina se unió con éxito al glutaraldehído. En el espectro, se continúan observando las señales a  $2931$ ,  $2862$  y  $1465 \text{ cm}^{-1}$  debidas a la tensión C-H, lo que sugiere la persistencia de los grupos alquílicos de la ODA y/o del glutaraldehído, porque ni en el espectro de la NAV <sup>56, 57</sup>, ni en los espectros de la H-Beta-Cd-NAV (Ver **Figura 26**), las señales de los grupos alquílicos que tiene la NAV dan picos agudos en esa zona del infrarrojo. En definitiva, se demuestra que la NAV no se une directamente, sino a través del puente ODA-Glu.

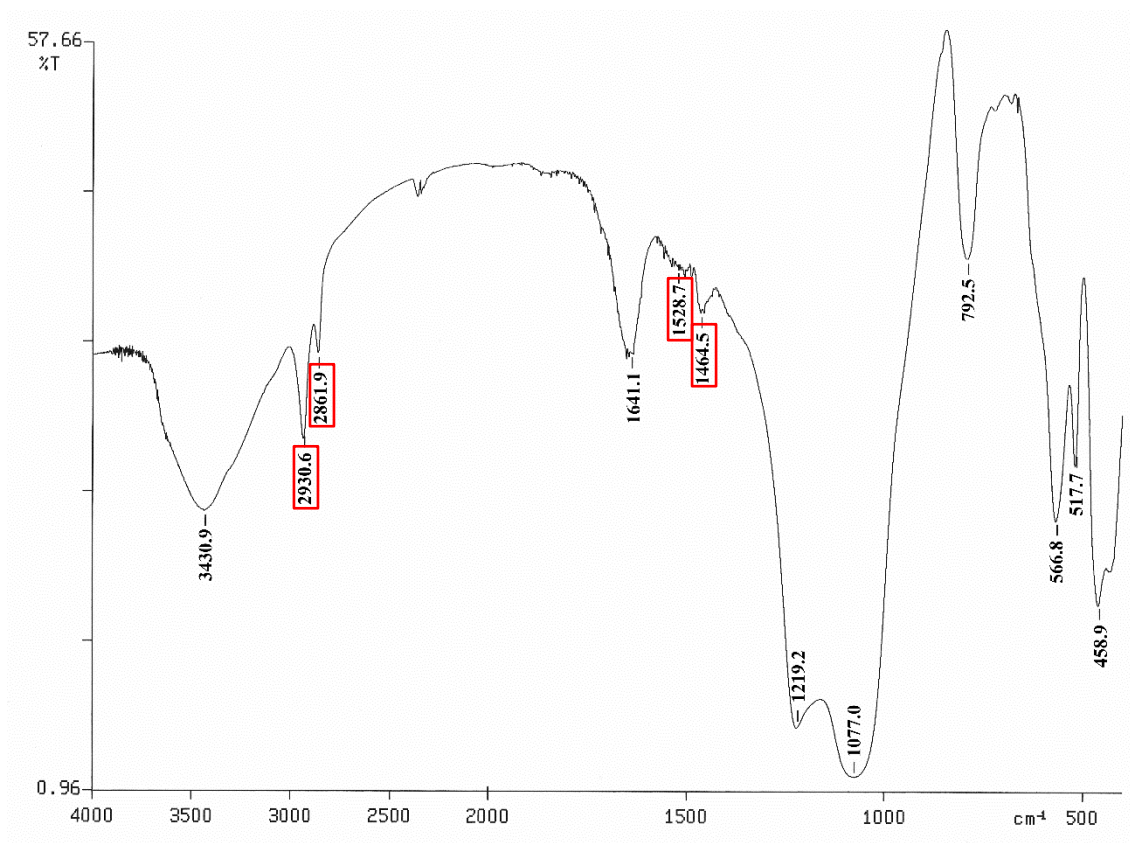


Figura 29. Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu-NAV.

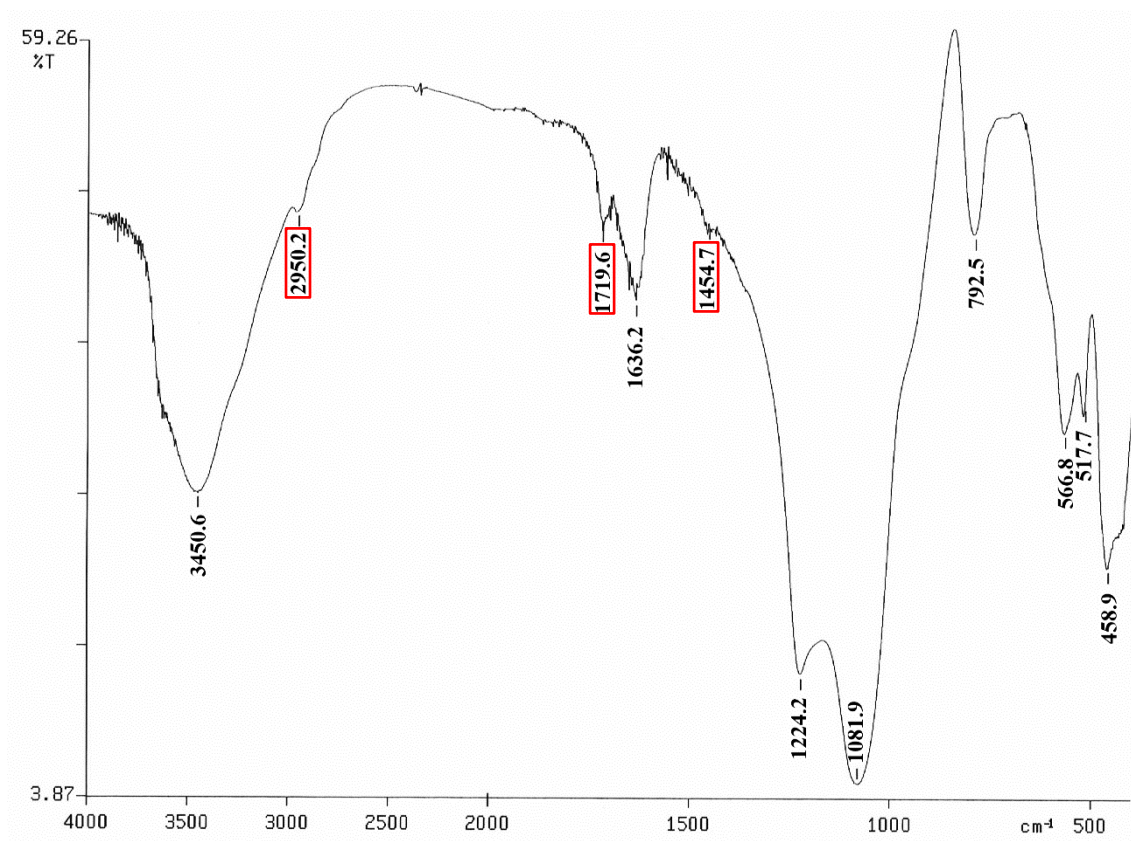
### **2.3.4. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu**

Finalmente, se llevó a cabo la reacción de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH primero con glutaraldehído y posteriormente con NAV.

Se dispersaron 30 mg de la nanozeolita con polialilamina, H-Beta-Cd-PAH, en 3 ml de una disolución acuosa de glutaraldehído 423.49 mM (1.27 mmol de glutaraldehído), sometiendo la suspensión resultante a ultrasonidos durante 5 minutos. La relación estimada de ( $n^{\circ}$  moléculas de Glu) / ( $n^{\circ}$  partículas de zeolita con PAH) fue  $10^5$ . El sólido resultante, H-Beta-Cd-PAH-Glu, de color rojizo, se aisló y purificó mediante el método habitual de centrifugación y redispersión en agua miliQ y, finalmente, fue secado a vacío.

## Capítulo 2

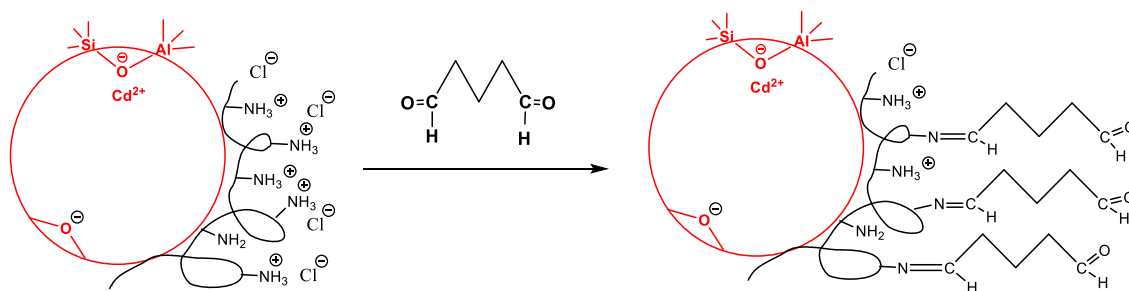
El espectro de FTIR de la zeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu (Ver **Figura 30**) indica que el glutaraldehído se ha anclado a la zeolita al observarse una banda nueva a  $1720\text{ cm}^{-1}$ , típica de los grupos  $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$  y que se atribuye a un grupo aldehído libre del glutaraldehído.



**Figura 30.** Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu.

La desaparición de la banda a  $1519\text{ cm}^{-1}$ , característica de los grupos amonio ( $\text{RNH}_3^+$ ) y que se observaba en el espectro de H-Beta-Cd-PAH (Ver **Figura 22**), junto a la coloración amarillo-rojiza de la zeolita resultante, sugieren la formación de grupos imina,  $-\text{CH}=\text{N}-$ , por acoplamiento de uno de los extremos del glutaraldehído con los grupos amonio de la PAH (Ver **Figura 31**). Es importante indicar que la PAH disuelta en agua se vuelve amarilla tras reaccionar con glutaraldehído. Por otro lado, la intensidad de las señales a  $2950$  y  $1455\text{ cm}^{-1}$ , propias de los grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}$  del resto alquílico de la amina y del glutaraldehído apoyan la asignación anteriormente expuesta.





**Figura 31.** Formación de grupos imina en la síntesis de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu.

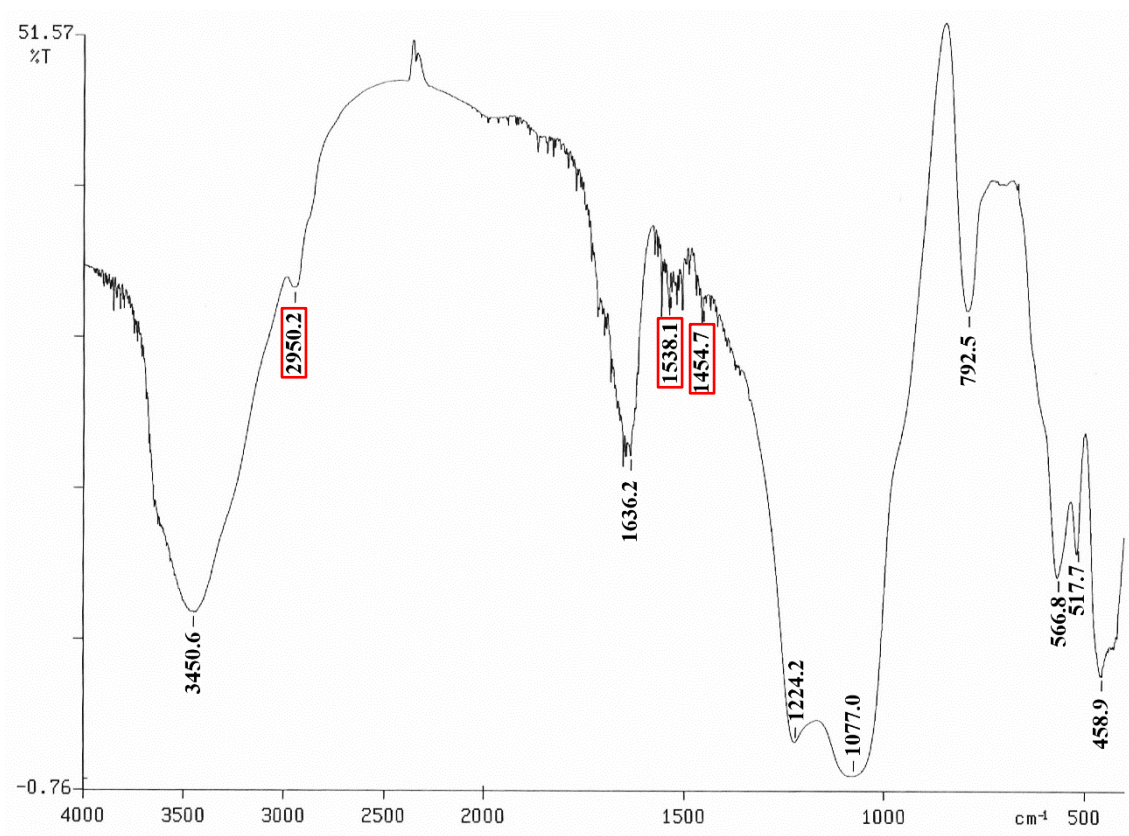
A continuación, se hizo reaccionar la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu con neutravidina.

### **2.3.5. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu-NAV**

Se dispersaron 5 mg de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu en 150  $\mu$ l de una disolución acuosa de neutravidina con una concentración de 1 mg/ml ( $2.5 \times 10^{-6}$  mmol de neutravidina), agitando la suspensión resultante en un vórtex a temperatura ambiente durante 24 horas. La relación estimada de (n° moléculas de NAV) / (n° partículas de zeolita con Glu) fue 1.26. El sólido obtenido, H-Beta-Cd-PAH-Glu-NAV, de color rojizo, se aisló y purificó mediante el método habitual de centrifugación y redispersión en agua miliQ y, finalmente, se secó a vacío.

El espectro de FTIR de la H-Beta-Cd-PAH-Glu-NAV (Ver **Figura 32**) muestra una banda a  $1538 \text{ cm}^{-1}$  característica de los grupos amida,  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ , lo que respalda la presencia de la neutravidina en dicha zeolita. La desaparición de la banda a  $1720 \text{ cm}^{-1}$  característica de los grupos aldehído,  $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$ , parece indicar que la incorporación de la NAV se realizó a través de la formación de nuevos grupos imina entre los carbonilos terminales del dialdehído en la H-Beta-Cd-PAH-Glu y los grupos amino de la superficie de la NAV. En el espectro, se continúan observando las señales a  $2950$  y  $1455 \text{ cm}^{-1}$ , típicas de los grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}$  del resto alquílico formado por la amina y el glutaraldehído previamente añadidos.

## Capítulo 2



**Figura 32.** Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu-NAV.

Todas las medidas de afinidad llevadas a cabo con las nanozeolitas bioconjugadas con neutravidina resultaron irreproducibles o nulas, confirmando así las previsiones fundamentadas en las micrografías de HR-TEM de las nanozeolitas cargadas con cadmio (II) y funcionalizadas con distintas aminas, tal y como se comentó al final de la sección 2.2.5.





# 3

---

*Funcionalización  
superficial de las zeolitas y  
posterior bioconjugación*



Dado que la funcionalización de los centros activos presentes en los canales de las zeolitas con poliaminas no impide su aglomeración, pareció interesante estudiar el anclaje de grupos amino sobre su superficie recurriendo al (3-aminopropil)triétoxosilano (APTES), puesto que existen referencias en la bibliografía que sugieren que las nanozeolitas recubiertas con grupos orgánicos superficiales favorecen la dispersión de los cristales<sup>60</sup>.

La funcionalización con APTES supone ciertas ventajas adicionales. En primer lugar, se puede introducir un mayor número de cationes en la zeolita, pues al no necesitarse centros ácidos para anclar las aminas, todos los protones de los grupos Si-OH ácidos pueden sustituirse por cationes metálicos. Por otro lado, los grupos alcoxisilano de las moléculas APTES se anclarán preferentemente en la superficie externa de los cristales, favoreciendo la interacción posterior con las moléculas orgánicas voluminosas necesarias para formar los biosensores.

En el capítulo anterior, se describió como el contenido de metal incorporado en las zeolitas se obtuvo mediante medidas electroquímicas en el laboratorio del Profesor Agustín Costa. Sin embargo, dado que la incorporación de metales y posterior funcionalización con APTES que se describen en este capítulo se realizaron en Valencia, en esta ocasión, la concentración de metal se midió mediante ICP-MS.

En primer lugar, se escogió una nanobeta comercial, CP814E, que presenta una relación de Si/Al similar a la preparada en el capítulo anterior (Si/Al ~ 11), con un tamaño de cristal ligeramente mayor (~ 30 nm) al obtenido con la nanozeolita H-Beta (~ 15 nm). A la zeolita comercial CP814E se le realizaron varias pruebas preliminares para optimizar el proceso de inclusión del cadmio, antes de anclar el APTES a su superficie. En concreto, se estudió la posible diferencia en la proporción final de cadmio intercambiado tras una

### **Capítulo 3**

sustitución previa de los  $H^+$  por iones  $Na^+$  respecto a la incorporación directa del cadmio.

Para intercalar los cationes  $Cd^{2+}$  en la CP814E se empleó acetato de cadmio (II).



### 3.1. Funcionalización y bioconjugación de la nanozeolita Beta comercial

#### 3.1.1. Incorporación del catión cadmio a la nanozeolita CP814E

La primera prueba realizada fue la incorporación directa de los cationes  $\text{Cd}^{2+}$ . Para ello, se dispersaron 4 g de la CP814E en 9.78 g de una disolución acuosa de  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  375.21 mM. La suspensión resultante se diluyó en 400 g de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El producto obtenido se lavó sucesivamente con agua destilada y acetona, y secado bajo una fuente de calor para eliminar la humedad restante. El rendimiento fue prácticamente cuantitativo.

Finalmente, para asegurar la completa eliminación de impurezas, el sólido se calcinó, sometiéndolo a una rampa de calentamiento de  $5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta llegar a una temperatura de  $150\text{ }^\circ\text{C}$ , permaneciendo a esta temperatura durante 1 hora, seguido de otra rampa de calentamiento de  $1.5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta alcanzar los  $500\text{ }^\circ\text{C}$  y manteniendo fija esta temperatura durante 2 horas más para completar el proceso de calcinación.

La cuantificación del  $\text{Cd}^{2+}$  intercambiado se mide mediante la técnica ICP-MS. Dado que los grupos silanoles ácidos son aquellos en los que el grupo OH hace puente entre un átomo de silicio y uno de aluminio y puesto que cada catión de cadmio (II) desplaza dos protones, la máxima proporción  $\text{Cd}^{2+}/\text{Al}$  será 0.5. El análisis de los resultados se muestra en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Análisis de los resultados obtenidos a partir del ICP-MS de la nanozeolita CP814E-Cd.

Muestra	Si/Al	Cd/Al	% $\text{Cd}^{2+}$ sustituido
CP814E-Cd	10.1	0.24	48 %

### Capítulo 3

Como se señaló al inicio de este capítulo, se decidió probar a continuación el intercambio de los protones de la CP814E por cationes de sodio ( $\text{Na}^+$ ), previamente a la incorporación de los cationes de cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) en la zeolita, para analizar y comparar los resultados obtenidos por ICP-MS y determinar que método era el mejor.

Para la incorporación de los cationes  $\text{Na}^+$  a la nanozeolita, se filtran 5 g de la nanobeta comercial, lavando con 400 g de una disolución acuosa de  $\text{NaCl}$  1M. El producto resultante, CP814E-Na, fue aislado mediante sucesivos lavados con agua destilada y acetona, y secado bajo una fuente de calor para eliminar la humedad restante. El rendimiento fue prácticamente cuantitativo.

Los resultados obtenidos a partir del ICP-MS se muestran a continuación (Ver *Tabla 8*).

*Tabla 8. Análisis de los resultados obtenidos a partir del ICP-MS de la nanozeolita CP814E-Na.*

Muestra	Si/Al	Na/Al	% $\text{Na}^+$ sustituido
CP814E-Na	10.1	0.38	38 %

A continuación, se intercambiarán los iones de sodio, y probablemente algunos protones que no fueron sustituidos en la etapa anterior, por los cationes de cadmio.

La zeolita CP814E-Na-Cd se obtuvo tras preparar una suspensión de 4 g del producto anterior, CP814E-Na, en 9.78 g de una disolución acuosa de  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  375.21 mM. A continuación, la suspensión se diluyó en 400 g de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ y agitada a temperatura ambiente durante una noche. El sólido resultante se aisló mediante sucesivos lavados con agua destilada y acetona, y secado bajo una fuente de calor para eliminar la humedad restante. El rendimiento fue prácticamente cuantitativo.

El ICP-MS de la CP814E-Na-Cd permite determinar cuánto cadmio ha sido incorporado a la zeolita CP814E-Na (Ver **Tabla 9**).

**Tabla 9.** Análisis de los resultados obtenidos a partir del ICP-MS de la nanozeolita CP814E-Na-Cd.

Muestra	Si/Al	Na/Al	Cd/Al	% Cd <sup>2+</sup> sustituido
CP814E-Na-Cd	10.0	0.04	0.30	59 %

Comparando los resultados de la **Tabla 9** con los de la **Tabla 7**, se dedujo que se había intercambiado una mayor cantidad de cadmio en la preparación de la zeolita CP814E-Na-Cd, es decir, aquella cuyo proceso de preparación incluye una etapa adicional intermedia en la que se sustituyeron los protones por los cationes de sodio.

Antes de pasar a la fase de anclaje de APTES en la zeolita, se decidió probar una segunda etapa de sustitución con cadmio con la CP814E-Na-Cd para comprobar si se lograba incorporar más cadmio a la CP814E-Na-Cd.

Para lograrlo, se dispersaron 3.5 g del producto CP814E-Na-Cd en 8.55 g de una disolución acuosa de Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 375.21 mM. Después, la suspensión se diluyó en 350 g de H<sub>2</sub>O miliQ y sometida a agitación a temperatura ambiente durante una noche. El sólido resultante se aisló mediante sucesivos lavados con agua destilada y acetona, y secado bajo una fuente de calor para eliminar la humedad restante. El rendimiento fue prácticamente cuantitativo.

El producto final se caracteriza por ICP-MS para comprobar si se ha intercambiado más cadmio tras el segundo ciclo (Ver **Tabla 10**).

**Tabla 10.** Análisis de los resultados obtenidos a partir del ICP-MS de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2.

Muestra	Si/Al	Na/Al	Cd/Al	% Cd <sup>2+</sup> sustituido
CP814E-Na-Cd2	10.3	0.02	0.40	80 %

### Capítulo 3

Analizando los resultados de la *Tabla 10* y comparándolos con los de la *Tabla 9*, se demostró que se logra incorporar una mayor cantidad de cadmio a la zeolita CP814E mediante una segunda reacción de sustitución.

Como consecuencia, se eligió el método de preparación de la CP814E-Na-Cd<sub>2</sub> como el método más adecuado para incorporar el cadmio durante el resto de la investigación, y, por tanto, para anclar el APTES sobre su superficie, tal y como se indicó previamente.

#### **3.1.2. Funcionalización de la nanozeolita CP814E con APTES**

Antes de incorporar el APTES a la zeolita, se deshidrataron 2 g de la CP814E-Na-Cd<sub>2</sub> a 200 °C durante 2 horas haciendo vacío, para eliminar completamente la humedad que podría favorecer la hidrólisis y reactividad del grupo alcóxilano del APTES, dando un producto entrecruzado indeseado.

A continuación, se añadieron 0.498 g de APTES y 20 ml de tolueno anhidro sobre el sólido totalmente seco y se agitó la suspensión resultante a 85 °C en atmósfera de argón durante una noche. La relación de mmol APTES/g zeolita fijada es ~ 1. El sólido resultante se aisló mediante sucesivos lavados con tolueno y cloroformo, y secado bajo una fuente de calor para eliminar la humedad restante. El rendimiento fue prácticamente cuantitativo.

La zeolita CP814E-Na-Cd<sub>2</sub>-APTES se caracteriza mediante espectroscopía infrarroja, registrándose el espectro que aparece en la *Figura 33*, donde se observa la señal a 1515 cm<sup>-1</sup> atribuible a los grupos NH<sub>2</sub>, protonados posteriormente al proceso de funcionalización con APTES, y las bandas a 2980, 2931 y 1450 cm<sup>-1</sup> características de los grupos CH<sub>2</sub> del resto alquílico del APTES. El resto de las señales se corresponden con las bandas típicas de una zeolita de tipo Beta, discutidas anteriormente.

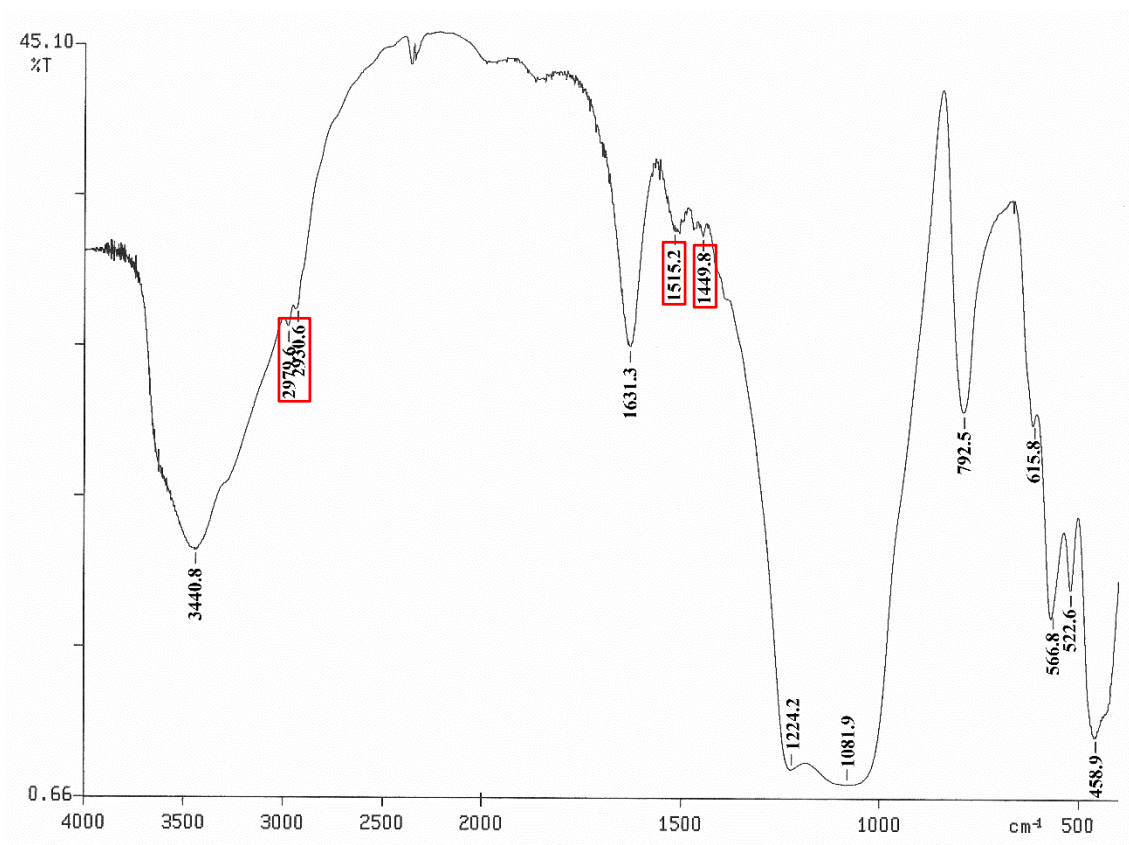
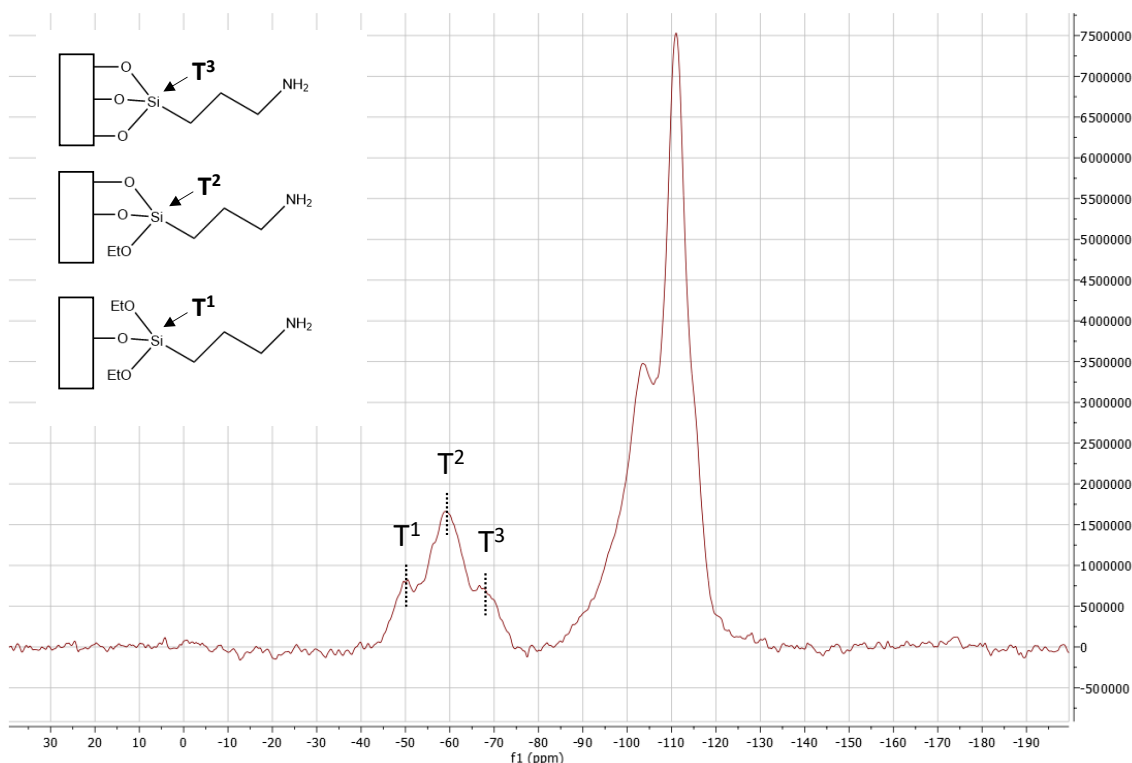


Figura 33. Espectro de FTIR de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2-APTES.

Para comprobar que la funcionalización del APTES se ha llevado a cabo de manera eficiente en la superficie de la zeolita, se ha estudiado el material funcionalizado por RMN de Si-29 en sólido, utilizando tanto polarización cruzada con protón (CP-MAS, Ver *Figura 34*) como sin polarización cruzada (BD-MAS, Ver *Figura 35*). En el caso del RMN de Si-29 en sólido (CP-MAS), se puede ver claramente la presencia de tres señales a -69, -59 y -49 ppm, que se han asignado en la literatura a especies Si-C conectadas a tres Si-O (T3), a dos Si-O (T2) o un Si-O (T1), tal y como se describe en la *Figura 34*<sup>61</sup>. Este resultado claramente demuestra que los grupos funcionales aminopropil se han anclado covalentemente a la superficie de los cristales de la nanozeolita comercial CP814E.

### Capítulo 3



**Figura 34.** RMN de Si-29 en sólido (CP-MAS) de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2-APTES.

Para cuantificar la cantidad anclada de grupos APTES a la nanozeolita CP814E-Na-Cd2-APTES, dicho material funcionalizado se ha medido por RMN de Si-29 en sólido sin polarización cruzada con protón (BD-MAS), obteniéndose una relación de señales  $T^n/Q^n \sim 0.08$  (Ver **Figura 35**). Este valor calculado a partir del espectro RMN de Si-29 en sólido (BD-MAS), confirmaría una relación de 1.2 mmol Si-C/g totales, que es un valor análogo al valor teórico introducido en el proceso de anclaje (1.0 mmol APTES/g zeolita).

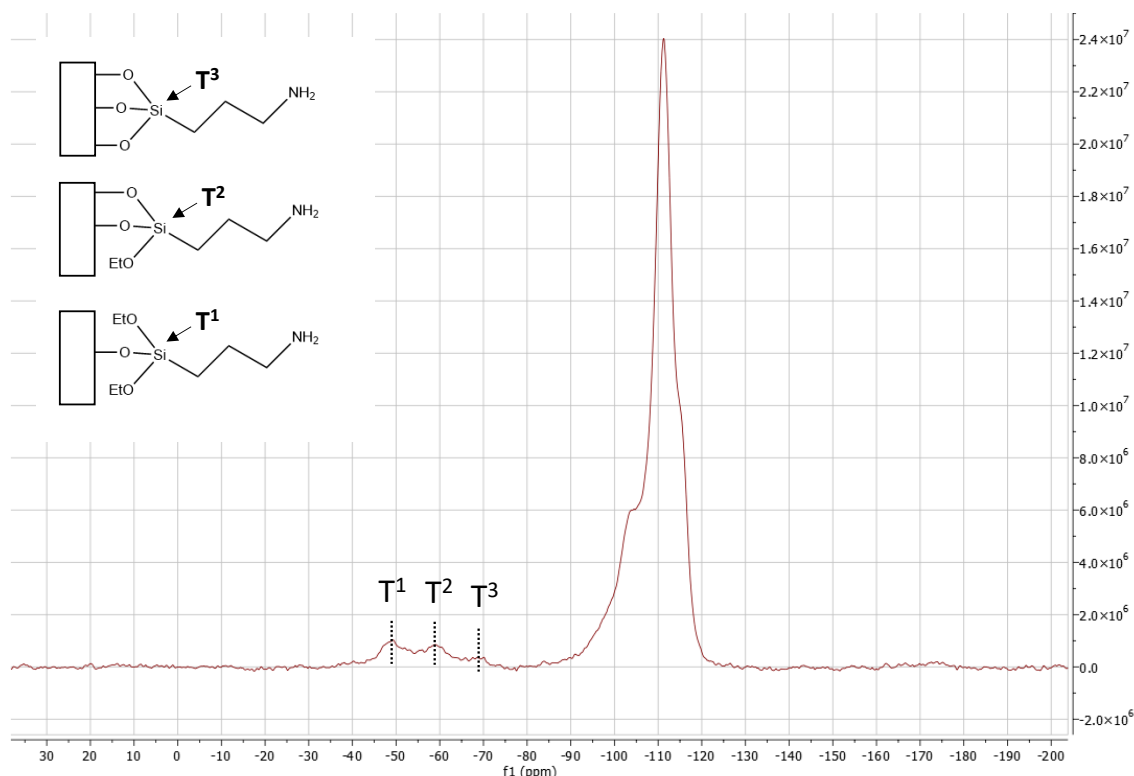


Figura 35. RMN de Si-29 en sólido (BD-MAS) de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2-APTES.

### **3.1.3. Incorporación del glutaraldehído a la nanozeolita CP814E**

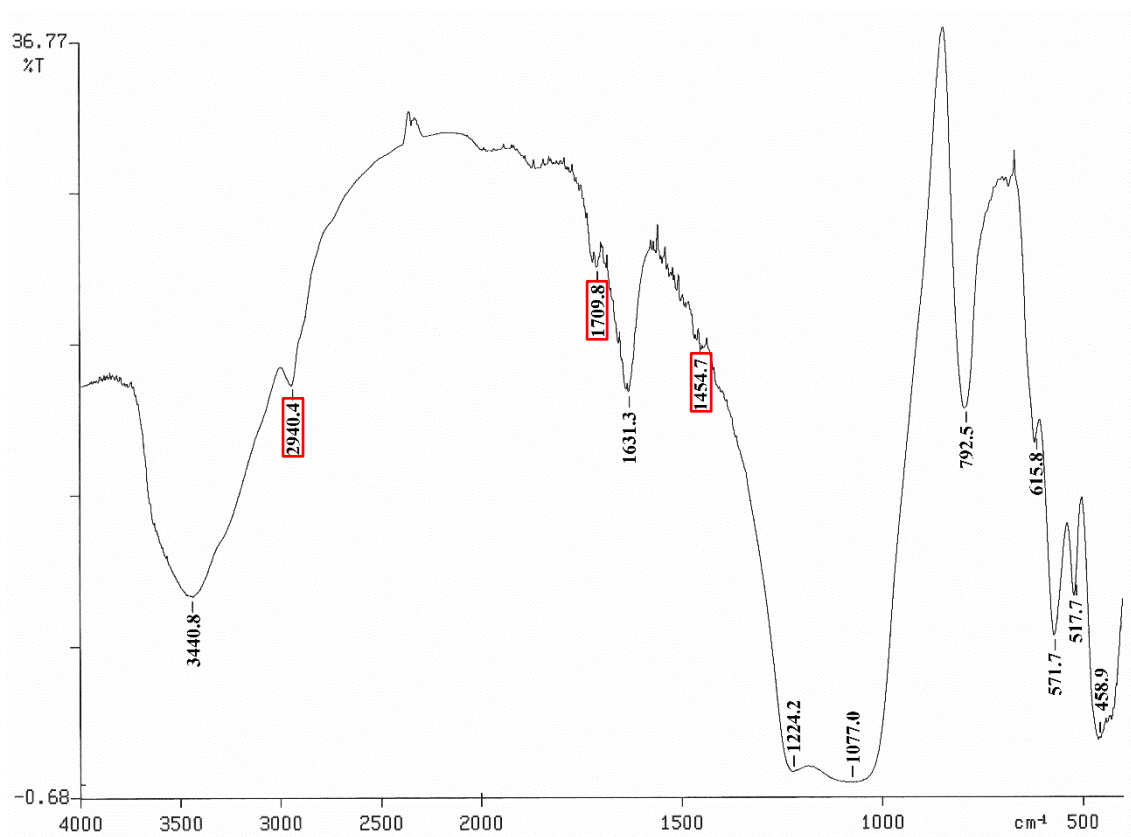
A continuación, se decidió incorporar glutaraldehído a la CP814E-Na-Cd2-APTES como puente de unión entre el APTES y la neutravidina agregada en una etapa posterior.

Para ello, se dispersaron 200 mg del producto CP814E-Na-Cd2-APTES en 20 ml de una disolución acuosa de glutaraldehído de concentración 423.49 mM (8.47 mmol de glutaraldehído) y la suspensión resultante se sometió a ultrasonidos durante 5 minutos. La relación estimada de ( $n^\circ$  moléculas de Glu) / ( $n^\circ$  partículas de la zeolita CP814E-Na-Cd2-APTES) resultó ser  $2.35 \times 10^5$  (los cálculos de dicha proporción se realizaron a posteriori cuando se dispuso del tamaño de las nanozeolitas mediante HR-TEM, Ver *Figura 36*). El sólido resultante adquirió un color rojo y se aisló mediante sucesivos

### Capítulo 3

lavados con agua destilada y acetona, y secado bajo una fuente de calor para eliminar la humedad restante. El rendimiento fue prácticamente cuantitativo.

Al analizar el espectro de FTIR de la CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu (Ver **Figura 36**), se observa a  $1710\text{ cm}^{-1}$  una banda de tensión C=O característica del glutaraldehído y conservación de las señales a  $2940$  y  $1455\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los grupos  $\text{CH}_2$  del APTES y del glutaraldehído.



**Figura 36.** Espectro de FTIR de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu.

#### **3.1.4. Bioconjugación de la nanozeolita CP814E con neutravidina**

Finalmente, tras la unión del glutaraldehído, se llevó a cabo la bioconjugación de la zeolita con la neutravidina.

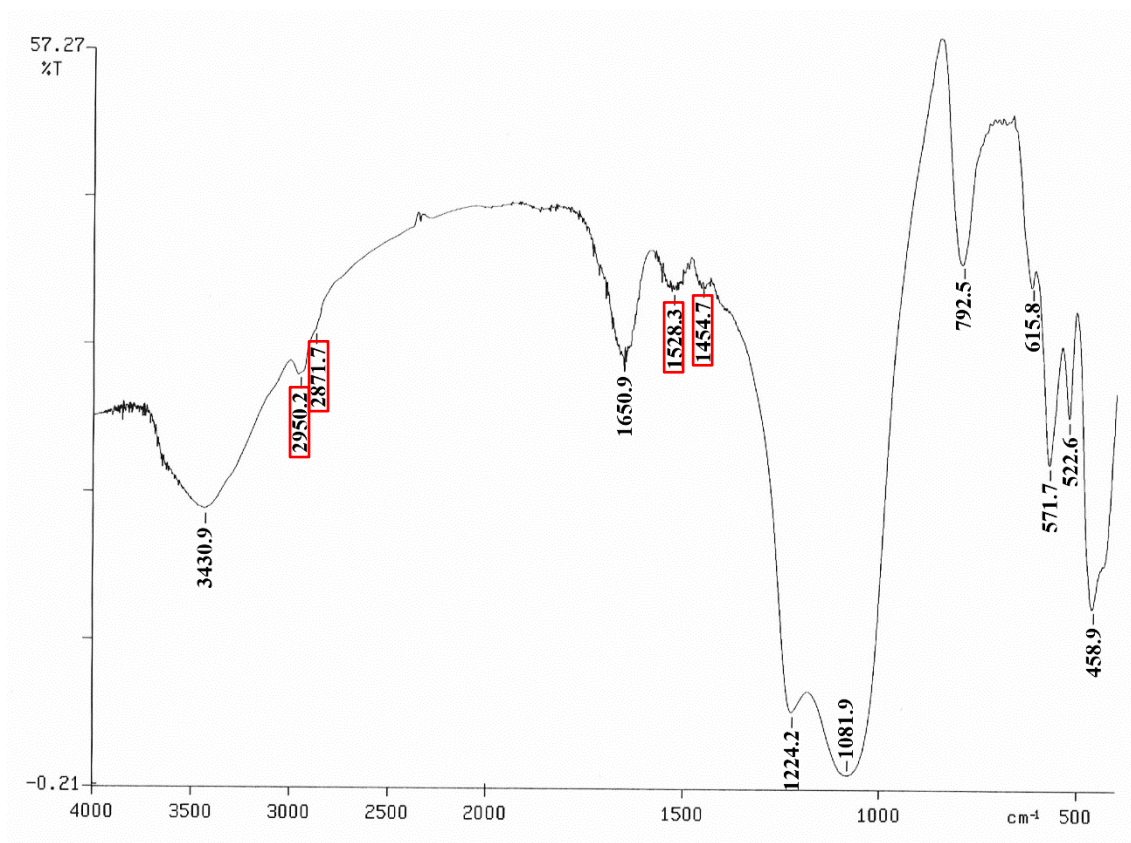
Para anclar la neutravidina al producto CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu, se suspendieron 5 mg de éste en  $150\ \mu\text{l}$  de una disolución acuosa de neutravidina con una



concentración de 1 mg/ml ( $2.5 \times 10^{-6}$  mmol de neutravidina), agitando la suspensión resultante en un vórtex a temperatura ambiente durante 24 horas. La relación estimada de ( $n^\circ$  moléculas de NAV) / ( $n^\circ$  partículas de la zeolita CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu) resultó ser 2.7 (los cálculos se realizaron a posteriori cuando se dispuso del tamaño de las nanozeolitas mediante HR-TEM, Ver *Figura 37*). El producto se aisló de la mezcla final mediante un proceso de centrifugación a 8000 rpm durante 2 minutos. El sólido separado se redispersó en 4 ml de H<sub>2</sub>O miliQ y se centrifugó nuevamente. Se repitió esta operación dos veces adicionales. Finalmente, el sólido se secó a vacío y a 20 °C durante una noche. El rendimiento fue prácticamente cuantitativo.

El espectro de FTIR (Ver *Figura 37*), muestra la aparición de una nueva señal a  $1528 \text{ cm}^{-1}$  típica de los grupos amida,  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ , que junto a la desaparición de la banda a  $1710 \text{ cm}^{-1}$  típica del grupo aldehído,  $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$ , sugiere que la incorporación de la neutravidina al glutaraldehído se realizó satisfactoriamente. En el espectro también se observa que persisten las señales a 2950, 2872 y  $1455 \text{ cm}^{-1}$ , típicas de los grupos CH<sub>2</sub> del APTES y del glutaraldehído.

### Capítulo 3



*Figura 37. Espectro de FTIR de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu-NAV.*

A partir de los resultados obtenidos con la nanobeta comercial, se decidió realizar las mismas operaciones con la zeolita estudiada en el capítulo anterior, la H-Beta, con el objetivo de ver si el método de anclaje superficial favorece la dispersión de los cristales. Cabe destacar que la nanozeolita H-Beta sintetizada en el ITQ presenta una mayor área externa que la nanobeta comercial (Ver *Tabla 11*), y, por tanto, se podría funcionalizar su superficie de una manera más eficiente.

*Tabla 11. Valores de área BET, área externa y volumen de microporo medidos por adsorción de N<sub>2</sub> para las dos nanobetas.*

Muestra	Área BET (m <sup>2</sup> /g)	Área externa (m <sup>2</sup> /g)	V <sub>microporo</sub> (cm <sup>3</sup> /g)
CP814E	580	203	0.18
H-Beta	757	440	0.15

## 3.2. Funcionalización y bioconjugación de la nanozeolita H-Beta

Primeramente, se filtró 1 g de la zeolita H-Beta que, a continuación, se lavó con 400 g de una disolución acuosa de NaCl 1M. Después, la zeolita se aisló mediante sucesivos lavados con agua destilada y acetona, y finalmente, se secó bajo una fuente de calor para eliminar la humedad restante. El rendimiento fue prácticamente cuantitativo.

A continuación, para incorporar el cadmio a la zeolita H-Beta-Na, se siguió el procedimiento utilizado con la H-Beta-Na. En primer lugar, se suspendieron 976 mg del producto H-Beta-Na en 1.51 g de una disolución acuosa de  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  de concentración 375.21 mM. A continuación, se diluyó la suspensión final con 98 g de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El sólido resultante se aisló mediante sucesivos lavados con agua destilada y acetona, y a continuación, se secó bajo una fuente de calor para eliminar la humedad restante. El rendimiento fue prácticamente cuantitativo.

De la misma manera, en la segunda etapa de intercambio se dispersaron 879 mg de la H-Beta-Na-Cd en 1.37 g de una disolución acuosa de  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  de concentración 375.21 mM. Posteriormente, la suspensión se diluyó en 88 g de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ y se sometió a agitación constante a temperatura ambiente durante una noche. El material preparado se aisló mediante sucesivos lavados con agua destilada y acetona, y a continuación, se secó bajo una fuente de calor para eliminar la humedad restante. El rendimiento fue prácticamente cuantitativo. El ICP-MS de la muestra H-Beta-Na-Cd2 revela un intercambio de Cd en el sólido final de un 68 % (Ver *Tabla 12*).

### Capítulo 3

*Tabla 12. Análisis de los resultados obtenidos a partir del ICP-MS de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2.*

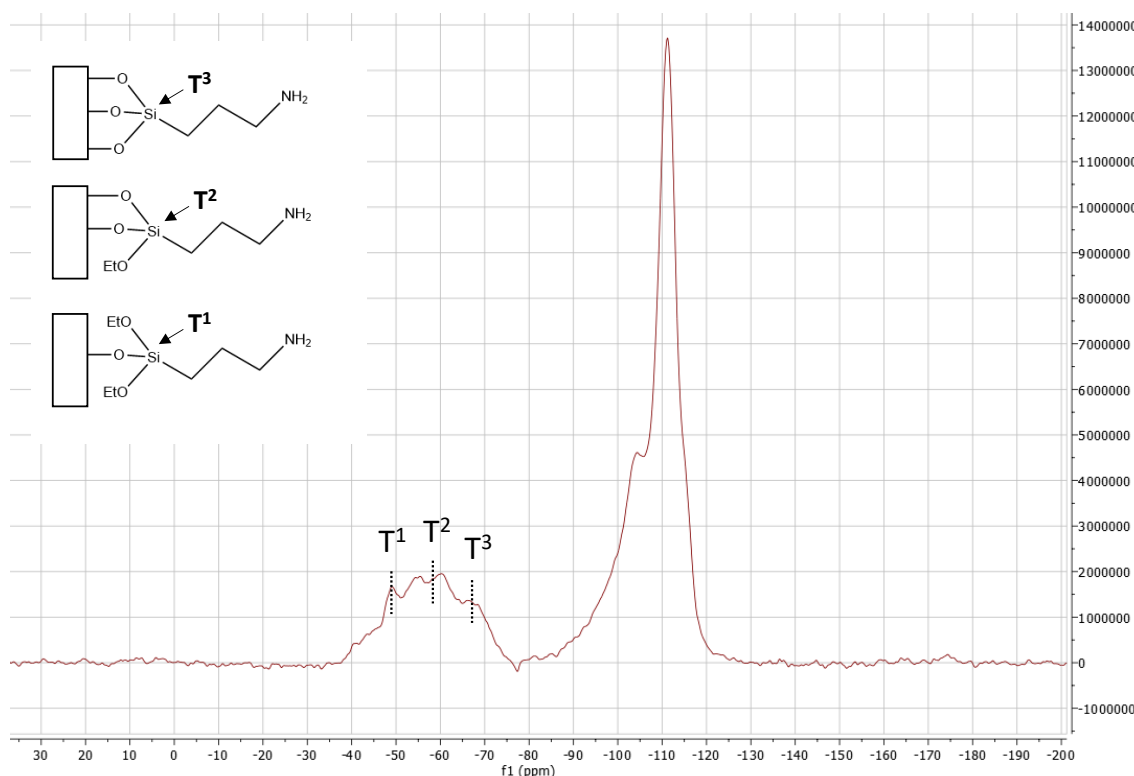
Muestra	Si/Al	Cd/Al	% Cd <sup>2+</sup> sustituido
H-Beta-Na-Cd2	10.9	0.34	68 %

Después, se llevó a cabo la unión de APTES sobre la superficie de la H-Beta-Na-Cd2.

De nuevo, antes de efectuar el anclaje del APTES sobre la superficie, la zeolita H-Beta-Na-Cd2 se deshidrata siguiendo el mismo método utilizado en la preparación de la CP814E-Na-Cd2-APTES.

A continuación, la zeolita deshidratada se redispersó en 0.360 g de APTES y 6 ml de tolueno anhidro y la suspensión resultante se agitó a 85 °C en atmósfera de argón durante una noche. La relación de mmol APTES/g zeolita se fijó en ~ 2. Finalmente, la zeolita se aisló mediante sucesivos lavados con tolueno y cloroformo, y a continuación, se secó bajo una fuente de calor para eliminar la humedad restante. El rendimiento fue prácticamente cuantitativo.

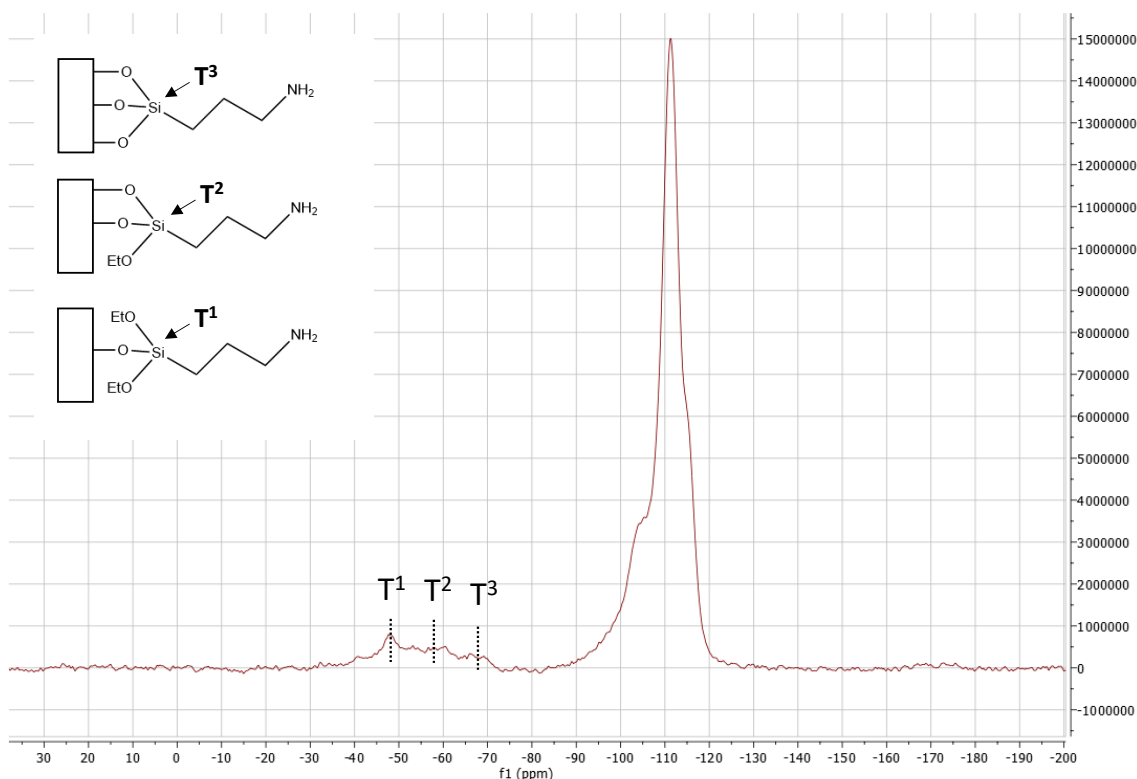
Para comprobar que la funcionalización del APTES se ha llevado a cabo de manera eficiente en la superficie de la zeolita, se ha estudiado el material funcionalizado por RMN de Si-29 en sólido, tanto CP-MAS (Ver **Figura 38**) como BD-MAS (Ver **Figura 39**). En el caso del RMN de Si-29 en sólido (CP-MAS), se observan tres señales centradas a -69, -59 y -49 ppm, que se han asignado en la literatura a especies T<sup>3</sup>, T<sup>2</sup> y T<sup>1</sup>, respectivamente, tal y como se describe en la **Figura 38**<sup>61</sup>. Este resultado claramente demuestra que los grupos funcionales aminopropil se han anclado covalentemente a la superficie de los cristales de la nanozeolita H-Beta.



**Figura 38.** RMN de Si-29 en sólido (CP-MAS) de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES.

Para cuantificar la cantidad anclada de grupos APTES a la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES, dicho material funcionalizado se ha medido por RMN de Si-29 en sólido (BD-MAS), obteniéndose una relación de señales  $T^n/Q^n \sim 0.11$  (Ver **Figura 39**). Este valor calculado a partir del espectro RMN de Si-29 en sólido (BD-MAS) confirmaría una relación de 1.6 mmol Si-C/g totales, que es un valor cercano al valor teórico introducido en el proceso de anclaje (2.0 mmol APTES/g zeolita).

### Capítulo 3

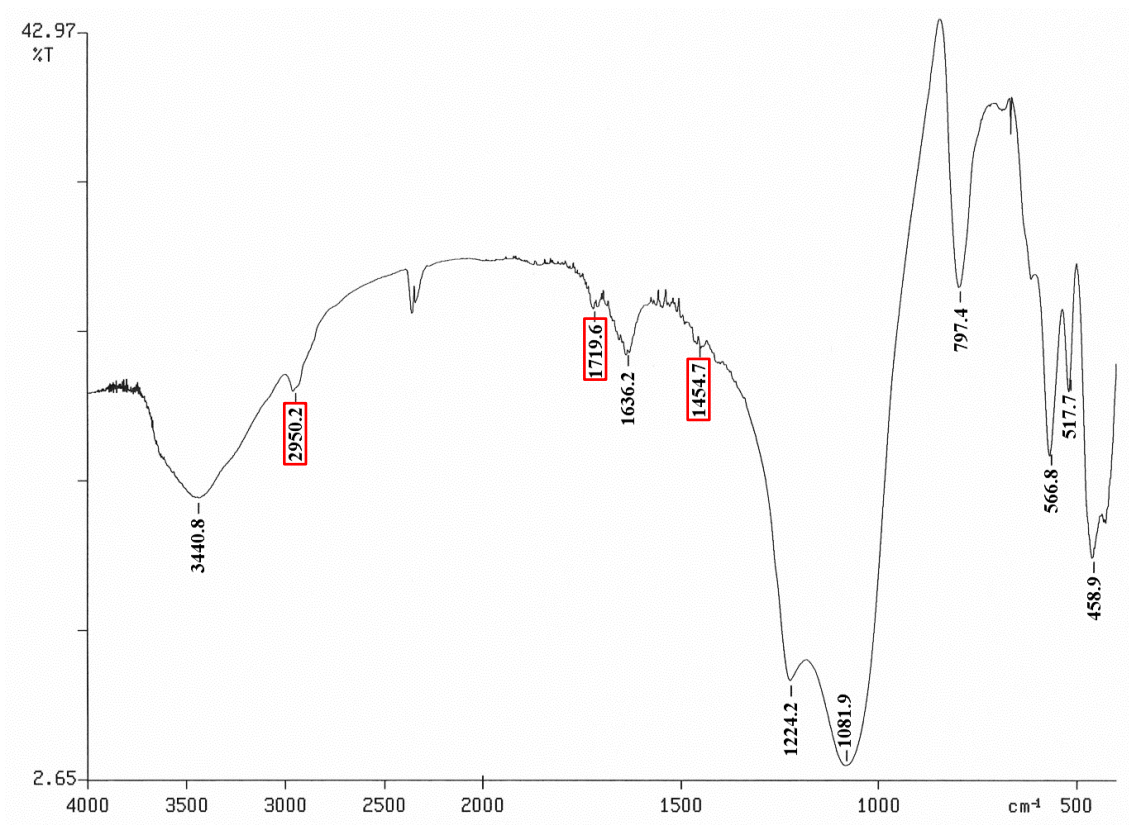


**Figura 39.** RMN de Si-29 en sólido (BD-MAS) de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES.

Para unir el glutaraldehído al APTES coordinado previamente en la superficie de la zeolita, se suspendieron 200 mg de la H-Beta-Na-Cd2-APTES en 20 ml de una disolución acuosa de glutaraldehído de concentración 423.49 mM (8.47 mmol de glutaraldehído) y la suspensión resultante se somete a ultrasonidos durante 5 minutos. La relación estimada de (n° moléculas de Glu) / (n° partículas de la zeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES) resultó ser  $2.5 \times 10^5$  (los cálculos se realizaron a posteriori cuando se dispuso del tamaño de las nanozeolitas mediante HR-TEM, Ver **Figura 40**). El producto resultante pasó a tener un color rojo y se aisló mediante sucesivos lavados con agua destilada y acetona. Finalmente, se secó bajo una fuente de calor para eliminar la humedad restante. El rendimiento fue prácticamente cuantitativo.

En el espectro de FTIR (Ver **Figura 40**), se observa una señal a  $1720 \text{ cm}^{-1}$  atribuible a la banda de tensión C=O característica del grupo aldehído, y la permanencia

de las señales a 2950 y 1455  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los grupos  $\text{CH}_2$  del APTES y del glutaraldehído. El resto de las señales se corresponden con las bandas típicas de una zeolita de tipo Beta, discutidas anteriormente.



**Figura 40.** Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu.

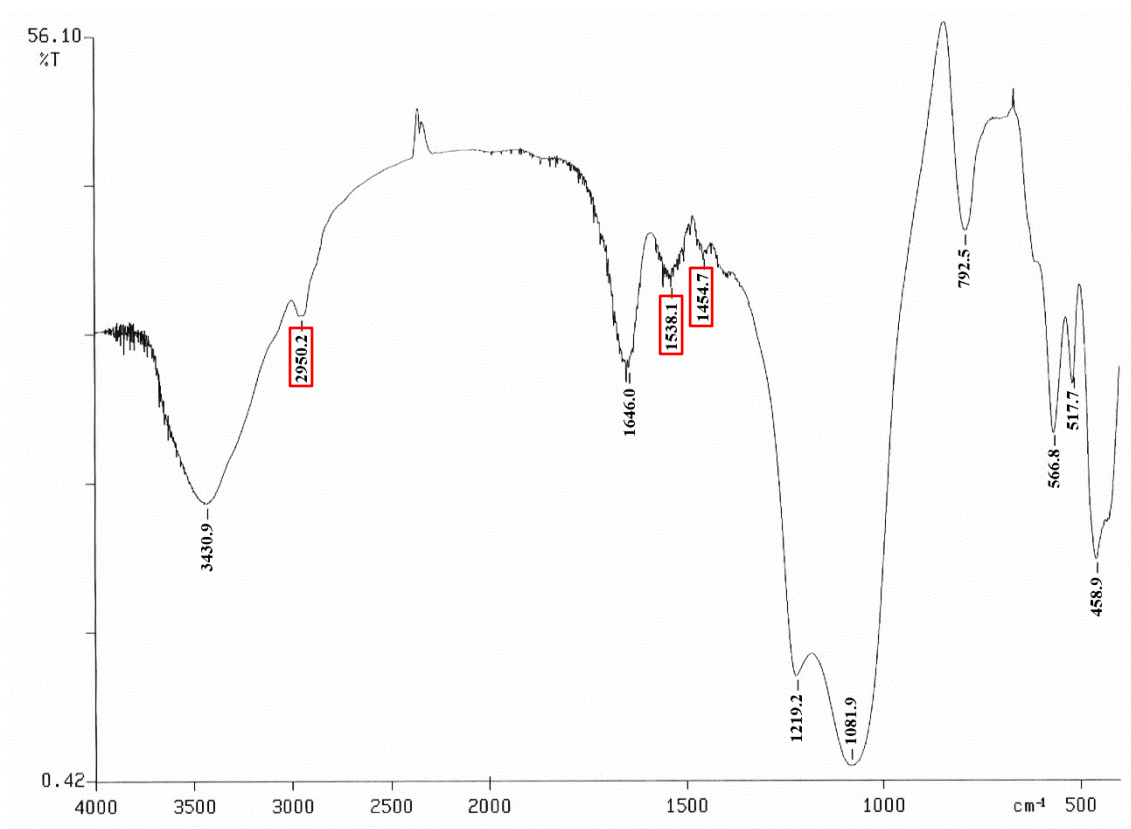
Finalmente, se incorpora la neutravidina a la zeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu.

Para ello, se dispersaron 5 mg de la H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu en 150  $\mu\text{l}$  de una disolución acuosa de neutravidina con una concentración de 1 mg/ml ( $2.5 \times 10^{-6}$  mmol de neutravidina), agitando la suspensión resultante en un vórtex a temperatura ambiente durante 24 horas. La relación estimada de ( $n^\circ$  moléculas de NAV) / ( $n^\circ$  partículas de la zeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu) resultó ser 2.4 (los cálculos se realizaron a posteriori cuando se dispuso del tamaño de las nanozeolitas mediante HR-TEM, Ver **Figura 41**). El sólido se aisló siguiendo el mismo procedimiento utilizado en la

### Capítulo 3

preparación de la CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu-NAV. El rendimiento fue prácticamente cuantitativo.

El FTIR de la H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu-NAV (Ver **Figura 41**), muestra una nueva señal a  $1538\text{ cm}^{-1}$  típica de los grupos amida,  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ , que junto a la desaparición de la banda a  $1720\text{ cm}^{-1}$ , típica del grupo aldehído,  $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$ , supone que la neutravidina se ha unido al glutaraldehído. Por otra parte, se continúan observando las bandas a  $2950$  y  $1455\text{ cm}^{-1}$ , típicas de los grupos  $\text{CH}_2$  del APTES y del glutaraldehído.



**Figura 41.** Espectro de FTIR de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu-NAV.

Una vez incorporado el APTES a las zeolitas, era necesario comprobar si, al menos en algún caso, se había logrado evitar la aglomeración de las nanopartículas. Para ello se llevaron a cabo las medidas de HR-TEM de muestras de las dos zeolitas tipo “APTES-Glu”. La elección de estas muestras, y no de las nanozeolitas con solo APTES incorporado, ha sido debido a que la adición del glutaraldehído entraña un riesgo

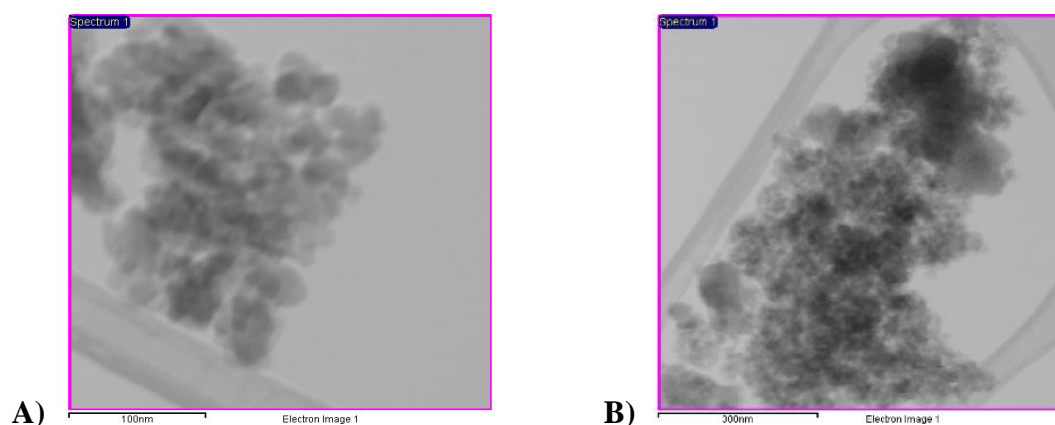


adicional, ya que una misma molécula de glutaraldehído puede unirse a dos grupos amino anclados en dos nanopartículas diferentes formando aglomeraciones. Este problema es inherente al empleo del dialdehído, aunque se ha procurado minimizar ese riesgo añadiendo un exceso de glutaraldehído (del orden de  $10^5$  moléculas de dialdehído por nanopartícula). Para mayor seguridad, se ha comprobado que doblando la cantidad de glutaraldehído añadido a la H-Beta-Na-Cd<sub>2</sub>-APTES para preparar las nanopartículas H-Beta-Na-Cd<sub>2</sub>-APTES-Glu, no aumenta la intensidad de la banda a  $1720\text{ cm}^{-1}$ , atribuible al grupo aldehído libre, en sus espectros de infrarrojo.

## Capítulo 3

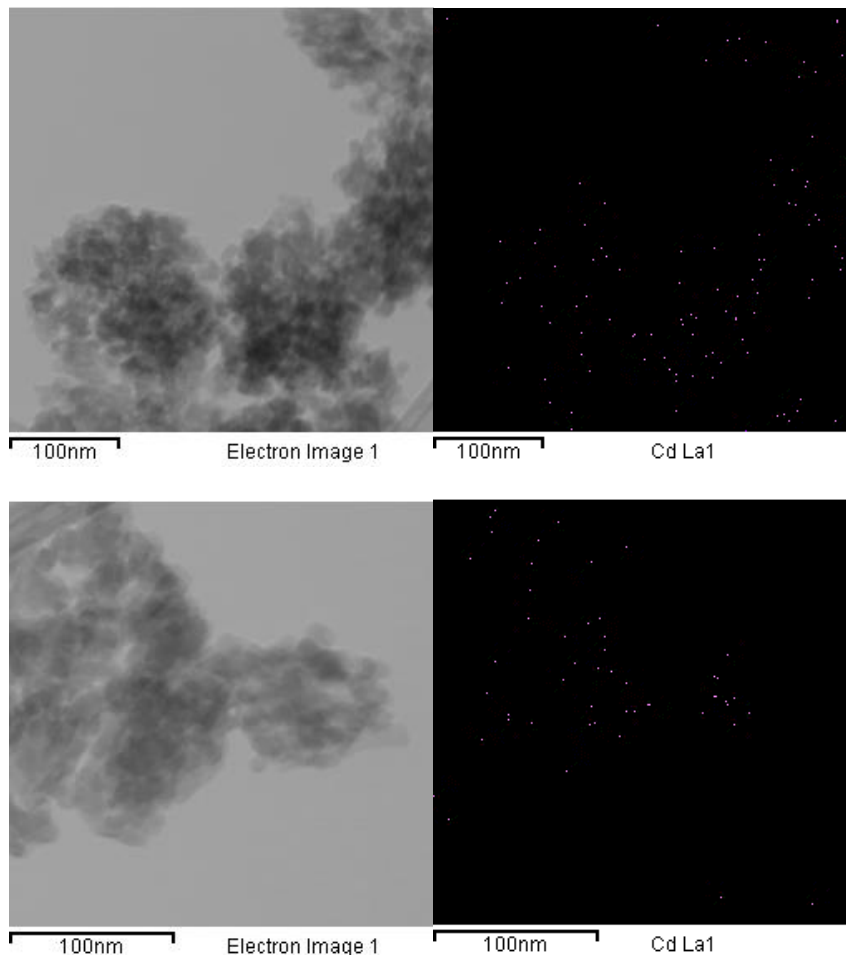
### 3.3. Discusión del HR-TEM de los derivados de las nanozeolitas CP814E y H-Beta

A continuación, en la **Figura 42** se muestran las micrografías correspondientes al HR-TEM de la CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu y la H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu. En las imágenes se observa que la aglomeración es evidente en ambos casos.



**Figura 42.** Micrografías HR-TEM de A) CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu, B) H-Beta- Na-Cd2-APTES-Glu.

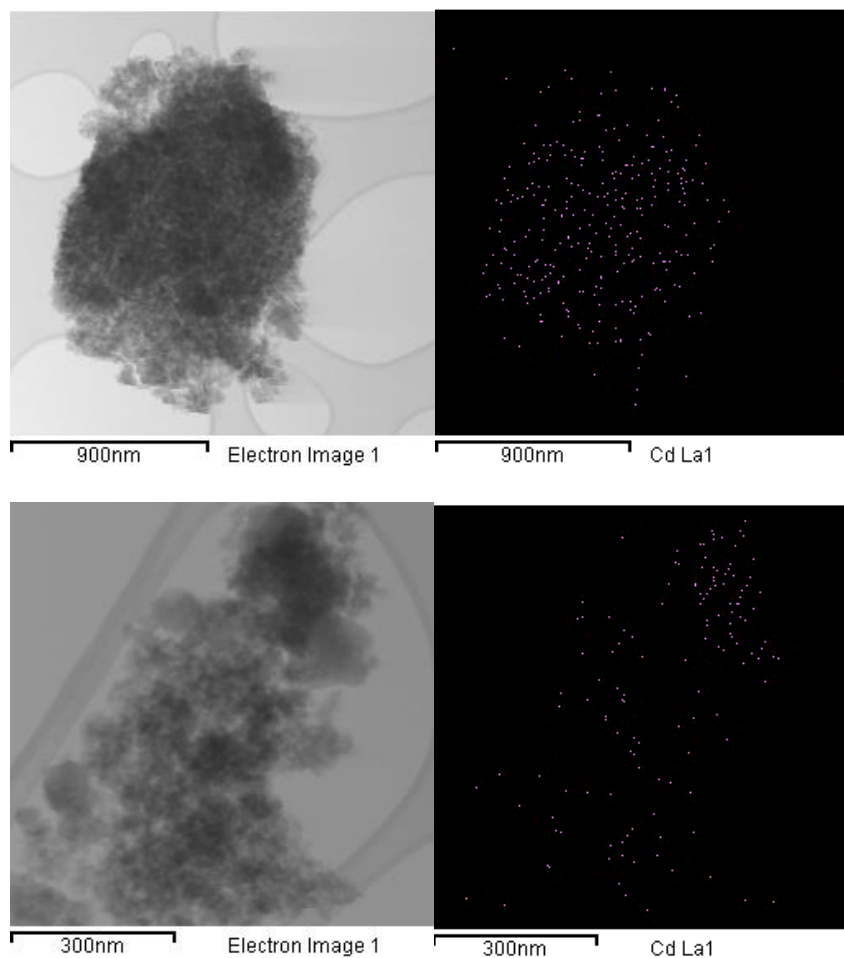
Por otra parte, se decidió también realizar un “*elemental mapping*” para estudiar la distribución del cadmio en las zeolitas anteriores. En la **Figura 43** se muestran las imágenes correspondientes al “*mapping*” de la CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu.



**Figura 43.** Distribución del Cd en diferentes áreas de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu.

La figura anterior sugiere que el cadmio no parece estar del todo homogéneamente distribuido en la nanozeolita CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu. Una tendencia similar se observa en la muestra H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu (Ver **Figura 44**).

### Capítulo 3



**Figura 44.** Distribución del Cd en diferentes áreas de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd<sub>2</sub>-APTES-Glu.

Las imágenes recogidas en la **Figura 43** y **Figura 44** ponen de manifiesto que la heterogénea distribución de los cationes Cd a lo largo de los nanocristales de las zeolitas Betas puede tener un efecto negativo en las medidas electroquímicas, mientras que la aglomeración de las nanopartículas puede dificultar la interacción entre la neutravidina y la biotina. Esto explicaría que, finalmente, al llevar a cabo los ensayos de afinidad sobre las zeolitas bioconjugadas en este capítulo, no se detectó una buena señal electroquímica.





# 4

---

*Funcionalización y  
bioconjugación de las  
nanozeolitas CuBeta  
preparadas por síntesis  
directa*





Tal y como se indicó en el apartado anterior, la distribución heterogénea del cadmio en las zeolitas puede suponer un problema para la realización de las medidas electroquímicas. Para intentar solventar esta dificultad, se pensó que la incorporación directa del metal en la estructura de las zeolitas durante su proceso de síntesis podría mejorar la distribución del catión metálico en el material final. Se escogió el cobre para la preparación de estas zeolitas debido a la experiencia previa del grupo del Dr. Manuel Moliner en la síntesis de zeolitas de cobre, y en el hecho de que este metal es también electroquímicamente activo <sup>62, 63</sup>.

Así pues, durante mi estancia en el ITQ de Valencia, se sintetizaron diversos tipos de nanobetas de cobre, utilizando dos tipos de ADEO, la molécula comercial tetraetilamonio (TEA) y la molécula N-butil-N,N-dimetilciclohexilamonio (BDMC6).

Para la preparación de estas nuevas zeolitas, se emplearon multiautoclaves (Ver *Figura 45*), cada uno con espacio para 15 cápsulas de teflón, en las que se mezclaron los reactivos en diferentes proporciones siguiendo los datos detallados a lo largo del presente capítulo.



*Figura 45. Multiautoclave con 15 mezclas de reactivos diferentes.*

A continuación, se sellaron los autoclaves y se situaron durante 10 días, uno en una estufa a 140 °C (CuBetas empleando TEA), y el otro en una estufa a 150 °C (CuBetas

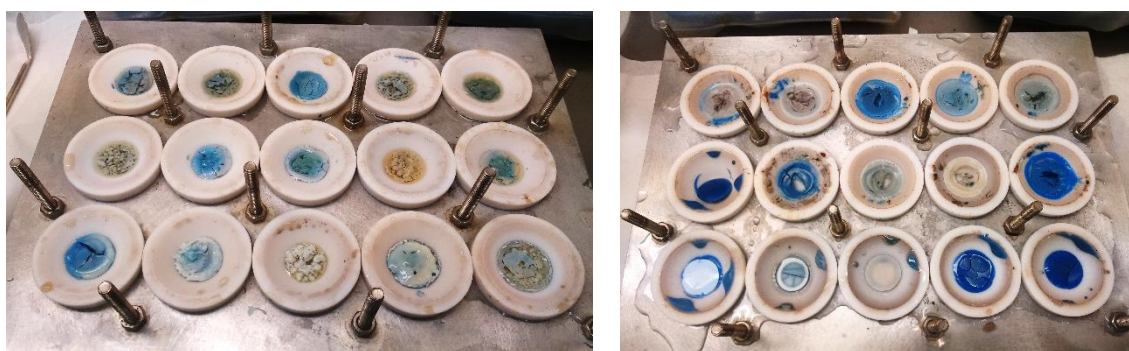
#### Capítulo 4

empleando BDMC6), para que se produjera la síntesis hidrotermal de las nanozeolitas (Ver *Figura 46*).



*Figura 46. Multiautoclave completamente sellado.*

Transcurrido ese tiempo, se retiraron las autoclaves de la estufa, se enfriaron con agua y después se abrieron para recuperar las cápsulas de teflón con los nuevos materiales (Ver *Figura 47*).



*Figura 47. Multiautoclaves con las nanozeolitas CuBeta sintetizadas.*

Posteriormente, se estudiaron las características de cada una de estas nanozeolitas para seleccionar las más adecuadas para los objetivos de la presente tesis doctoral. Para ello, se emplearon distintas técnicas de caracterización como la difracción de rayos X

(DRX), la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) y la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM).

## 4.1. Síntesis de nanozeolitas CuBeta utilizando tetraetilamonio (TEA) como ADEO

La síntesis de la zeolita Beta en su forma nanocristalina se describió por primera vez utilizando tetraetilamonio (TEA) como agente director de estructura orgánico (ADEO) en condiciones muy alcalinas (pH elevados, como por ejemplo OH/Si ~ 0.65)<sup>45</sup>. Estas condiciones de síntesis limitan la preparación de la zeolita Beta en su forma nanocristalina a relaciones de Si/Al relativamente bajas (menores de 10), ya que, al intentar incrementar dicha relación, los rendimientos globales de síntesis son muy bajos. No obstante, dado que queremos introducir una cantidad de cationes relativamente alta en la zeolita final, como por ejemplo cobre o cadmio, las relaciones de Si/Al menores de 10 serían adecuadas, ya que con un mayor contenido de aluminio favoreceremos la presencia de cargas negativas que permitan estabilizar dichos cationes.

Como posible desventaja de esta metodología de síntesis, podríamos decir que el elevado pH en las condiciones de síntesis de la zeolita Beta nanocristalina con TEA, podría favorecer la descomposición del complejo de Cu (Cu-TEPA, Cu<sup>2+</sup> con tetraetilenepentamina) en las condiciones hidrotermales necesarias para llevar a cabo la cristalización, pudiendo resultar en la precipitación de partículas grandes de óxido de cobre.

Durante mi estancia en el ITQ, propusimos distintas condiciones de síntesis con el fin de sintetizar en una única etapa la zeolita CuBeta nanocristalina utilizando TEA como ADEO. En este sentido, se varió la relación Si/Al (6, 8, 11), la relación Cu-TEPA/Si (0.025, 0.05), y la presencia de otros cationes en el medio de síntesis, como por ejemplo Na, de manera que el valor final de OH/Si fuera siempre el mismo (~ 0.65). El resumen con las relaciones molares para cada uno de los geles se encuentra en la **Tabla 13**, así

como la cantidad exacta adicionada de cada uno de los componentes de la síntesis en la **Tabla 14**. Los geles se mantuvieron en la estufa a 140 °C durante 10 días.

**Tabla 13.** Relaciones molares escogidas para llevar a cabo el estudio de la síntesis de la zeolita CuBeta en su forma nanocrystalina utilizando TEA como ADEO.

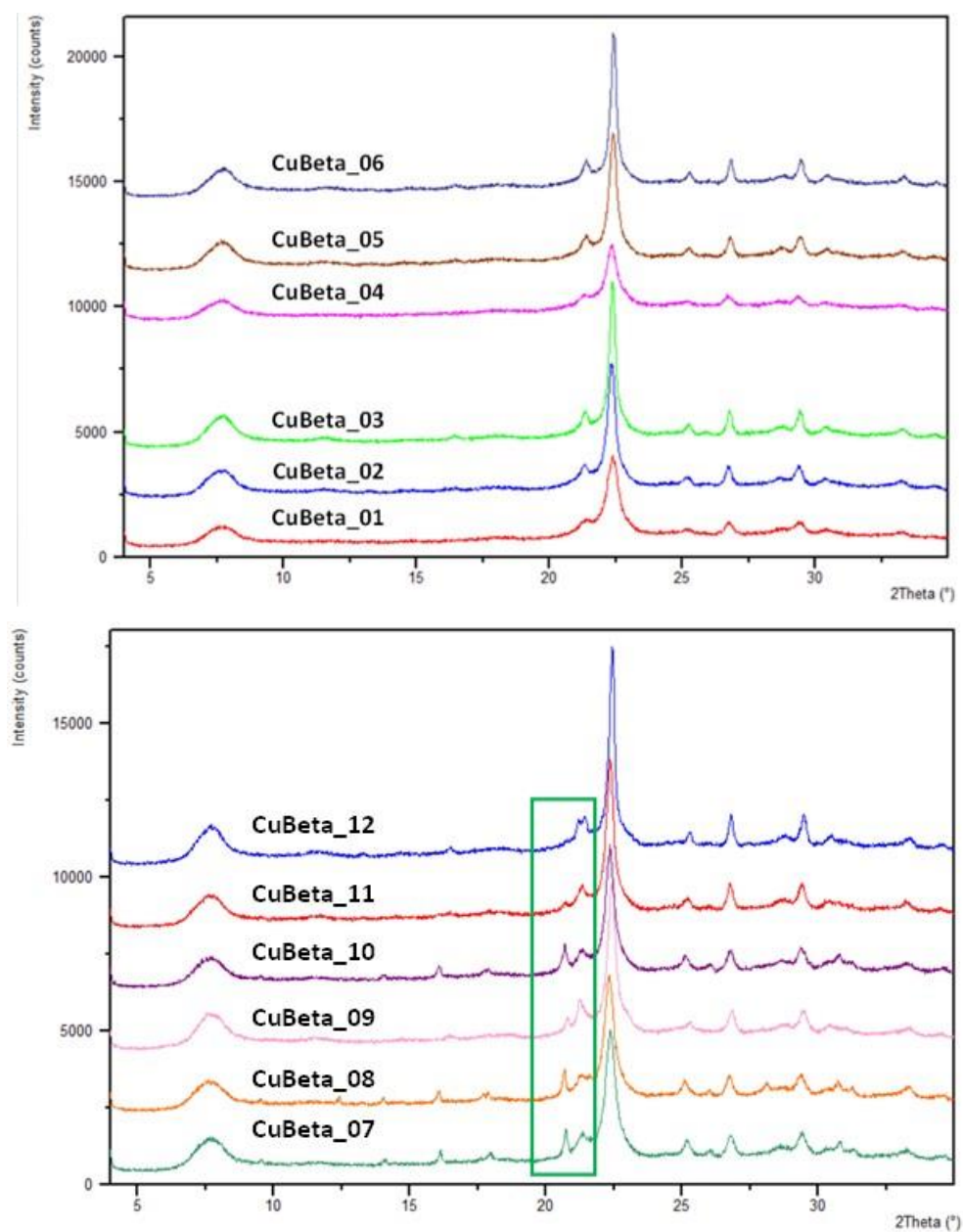
<b>Muestra</b>	<b>Si/Al</b>	<b>TEA/Si</b>	<b>Cu-TEPA/Si</b>	<b>NaOH/Si</b>	<b>H<sub>2</sub>O/Si</b>
CuBeta_01	6	0.65	0.025	0	20
CuBeta_02	8	0.65	0.025	0	20
CuBeta_03	11	0,65	0.025	0	20
CuBeta_04	6	0.65	0.05	0	20
CuBeta_05	8	0.65	0.05	0	20
CuBeta_06	11	0.65	0.05	0	20
CuBeta_07	6	0.5	0.025	0.15	20
CuBeta_08	8	0.5	0.025	0.15	20
CuBeta_09	11	0.5	0.025	0.15	20
CuBeta_10	6	0.5	0.05	0.15	20
CuBeta_11	8	0.5	0.05	0.15	20
CuBeta_12	11	0.5	0.05	0.15	20

## Capítulo 4

*Tabla 14. Composición de las nanozeolitas CuBeta usando TEA como ADEO.*

Muestra	Ludox	Al(OH) <sub>3</sub>	TEA	CuSO <sub>4</sub> + TEPA	NaOH	KOH	H <sub>2</sub> O
CuBeta_01	618.1	49.3	1102.6	116.5	0	0	293.0
CuBeta_02	607.6	39.1	1096.6	113.3	0	0	310.8
CuBeta_03	619.5	28.5	1101.2	114.4	0	0	316.0
CuBeta_04	601.9	49.0	1110.5	217.4	0	0	250.4
CuBeta_05	602.5	39.3	1112.0	209.7	0	0	229.3
CuBeta_06	614.6	28.2	1108.7	206.1	0	0	232.2
CuBeta_07	616.2	49.3	959.8	107.2	135.6	0	399.5
CuBeta_08	611.6	39.1	865.7	106.5	138.0	0	368.0
CuBeta_09	617.3	28.4	846.1	107.3	129.9	0	366.6
CuBeta_10	607.0	49.0	851.1	218.5	131.8	0	298.7
CuBeta_11	606.7	39.5	864.0	217.0	137.8	0	316.7
CuBeta_12	617.1	28.2	848.2	211.8	134.7	0	307.3

Una vez transcurrido el tiempo de síntesis, los sólidos obtenidos se filtraron, lavándolos con abundante agua, y se caracterizaron por difracción de rayos X. Los patrones de difracción obtenidos se muestran en la *Figura 48*.



**Figura 48.** Patrones de difracción de los sólidos obtenidos utilizando Cu-TEPA y TEA en el medio de síntesis.

A la vista de los patrones de DRX, se observa que la introducción de Na (muestras 7 a 12) resulta en general en la formación de otra fase cristalina como impureza (ver rectángulo verde). En ausencia de Na, los patrones de difracción que presentan una menor intensidad de los picos, y por tanto, podrían presentar un menor tamaño de cristal, son las muestras 1 y 4, que son las que se han sintetizado con una menor relación Si/Al en el medio de síntesis ( $\sim 6$ ).

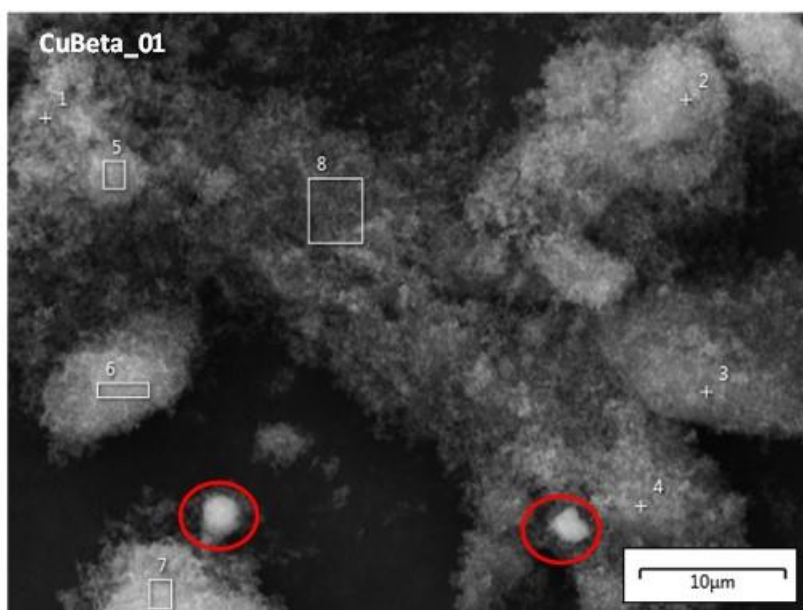
## Capítulo 4

Las medidas de ICP-MS revelan la composición química de estas dos muestras (Ver **Tabla 15**).

**Tabla 15.** ICP-MS de las muestras seleccionadas en el estudio de la síntesis directa de las nanozeolitas CuBeta utilizando TEA y Cu-TEPA.

Muestra	Si/Al	% Cu
CuBeta_01	7.4	2.2
CuBeta_04	7.4	3.2

Para ver la morfología de los cristales y la distribución de cobre en dichos cristales, se han estudiado estas dos muestras por FE-SEM, donde se ha medido por EDX la composición química en distintas zonas de la muestra (**Figura 49** y **Figura 50**).



**Figura 49.** Micrografía FE-SEM de la nanozeolita CuBeta\_01 caracterizada por EDX.

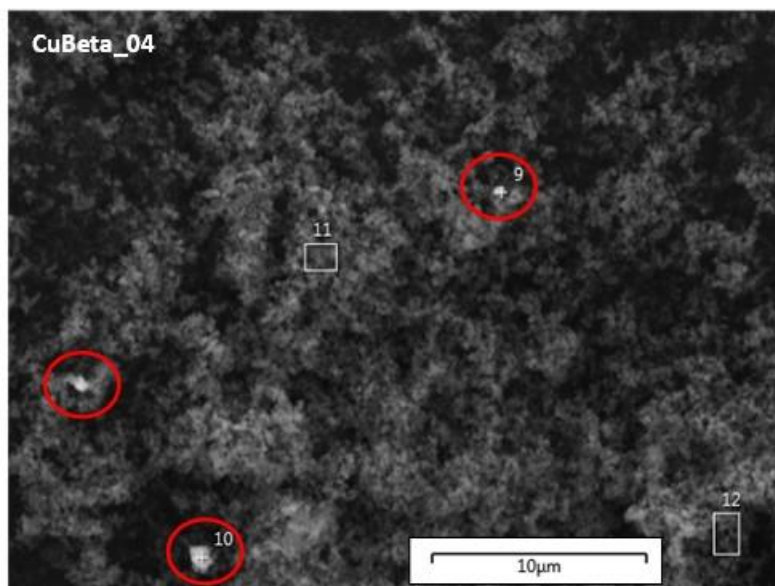
En la **Tabla 16** se muestra la relación de Si/Al y el % de Cu en los diferentes puntos que aparecen resaltados en la micrografía anterior y que han sido analizados por EDX.



**Tabla 16.** Relación de Si/Al y % de Cu en diferentes puntos de la nanozeolita CuBeta\_01.

Zonas	Si/Al	% Cu
Punto 1	9.23	0.69
Punto 2	9.07	1.03
Punto 3	9.38	0.93
Punto 4	9.65	1.32
Punto 5	9.66	0.72
Punto 6	9.13	0.53
Punto 7	9.17	1.03
Punto 8	10.82	0

Vemos que el porcentaje de cobre en cada punto es menor que el medido en el total de la muestra caracterizada por ICP-MS (% Cu ~ 2.2), incluso hay una medida que no detecta contenido de Cu (punto 8). Esto quiere decir que debe haber zonas ricas en cobre, que seguramente serán las partículas marcadas en rojo.



**Figura 50.** Micrografía FE-SEM de la nanozeolita CuBeta\_04 caracterizada por EDX.

## Capítulo 4

A continuación, se indica la relación de Si/Al y el % de Cu en los diferentes puntos de la muestra CuBeta\_04 que ha sido caracterizada por EDX (Ver **Tabla 17**).

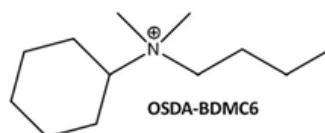
**Tabla 17.** Relación de Si/Al y % de Cu en diferentes puntos de la nanozeolita CuBeta\_04.

Zonas	Si/Al	% Cu
Punto 9	6.68	53.1
Punto 10	6.08	68.1
Punto 11	9.67	1.06
Punto 12	9.03	2.63

Las medidas de EDX de la zeolita CuBeta\_04, claramente muestran la presencia de zonas ricas en cobre. Esto significa que durante la síntesis hidrotérmica de las zeolitas CuBeta, utilizando TEA como ADEO, el complejo de cobre Cu-TEPA no es completamente estable, pudiendo precipitar partículas grandes de óxido de cobre. Un posible motivo puede ser el elevado pH que se necesita para la cristalización de la zeolita Beta nanocristalina con TEA.

## 4.2. Síntesis de nanozeolitas CuBeta utilizando N-butil-N,N-dimetilciclohexilamonio (BDMC6) como ADEO

Con el fin de intentar prevenir la precipitación del cobre, se ha intentado la síntesis directa de la zeolita CuBeta utilizando otro procedimiento de síntesis alternativo <sup>46</sup>. Este procedimiento permite sintetizar la zeolita Beta en su forma nanocrystalina con un amplio rango de Si/Al y buenos rendimientos de síntesis utilizando la siguiente molécula como ADEO (Ver **Figura 51**), siempre con relaciones OH/Si menores que las descritas en la **Tabla 13** para el caso del TEA. Este punto será importante, ya que permitirá llevar a cabo la síntesis hidrotérmal de las zeolitas a menores pHs, y, por tanto, la estabilidad de los complejos de Cu podría incrementarse notoriamente durante las etapas de nucleación y cristalización de las zeolitas. De esta manera, se podría reducir la precipitación no deseada de especies de óxido de cobre en los sólidos finales.



**Figura 51.** Estructura del N-butil-N,N-dimetilciclohexilamonio (BDMC6).

Análogamente, se propusieron también distintas condiciones de síntesis con el fin de sintetizar en una única etapa la zeolita CuBeta nanocrystalina utilizando BDMC6 como ADEO, utilizando relaciones de Si/Al (8, 11, 15), de Cu-TEPA/Si (0.025, 0.05), e incorporando otros cationes en el medio de síntesis, como Na, de manera que el valor final de OH/Si fuera siempre el mismo (~ 0.4). El resumen con las relaciones molares para cada uno de los geles se encuentra en la **Tabla 18**, así como la cantidad exacta adicionada de cada uno de los componentes de la síntesis en la **Tabla 19**. Los geles se mantuvieron en la estufa a 150 °C durante 10 días.

## Capítulo 4

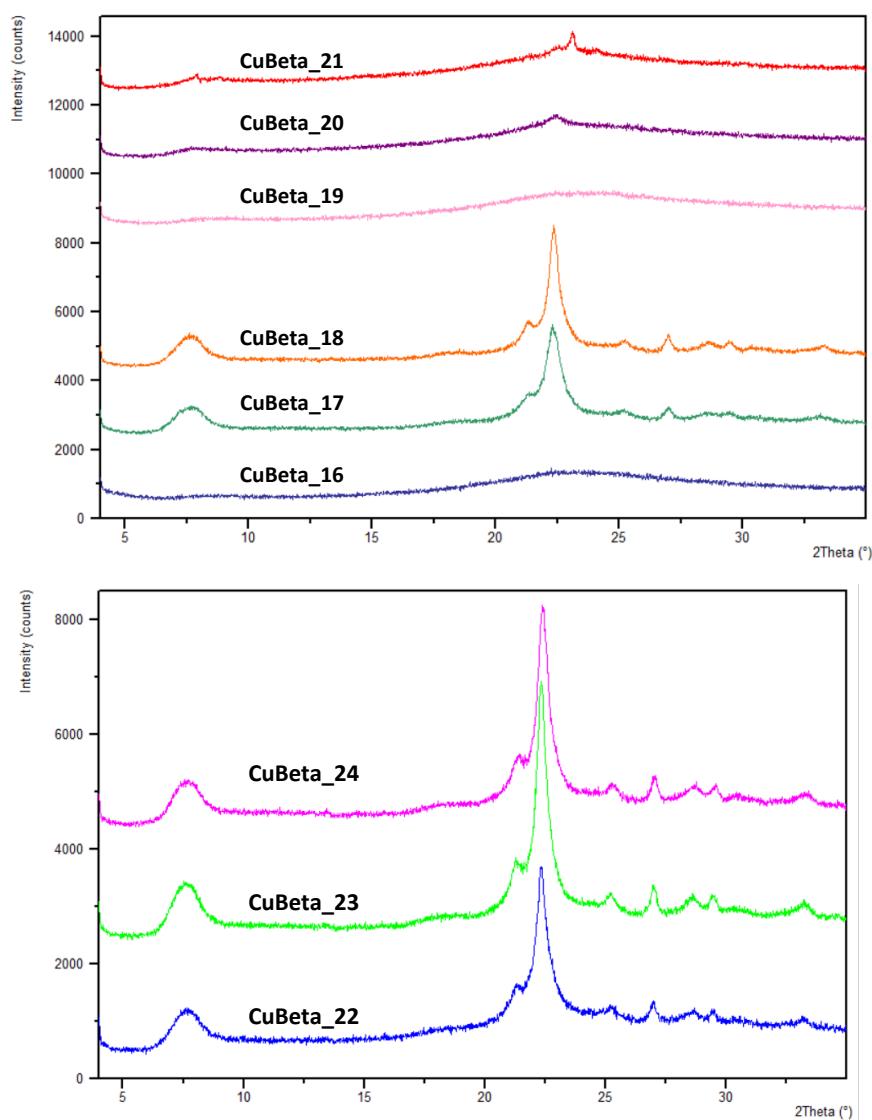
**Tabla 18.** Relaciones molares escogidas para llevar a cabo el estudio de la síntesis de la zeolita CuBeta en su forma nanocrystalina utilizando TEA como ADEO.

Muestra	Si/Al	BDMC6/Si	Cu-TEPA/Si	NaOH/Si	H <sub>2</sub> O/Si
CuBeta_16	8	0.4	0.025	0	15
CuBeta_17	11	0.4	0.025	0	15
CuBeta_18	15	0.4	0.025	0	15
CuBeta_19	8	0.4	0.05	0	15
CuBeta_20	11	0.4	0.05	0	15
CuBeta_21	15	0.4	0.05	0	15
CuBeta_22	8	0.25	0.025	0.15	15
CuBeta_23	11	0.25	0.025	0.15	15
CuBeta_24	15	0.25	0.025	0.15	15

**Tabla 19.** Composición de las nanozeolitas CuBeta usando BDMC6 como ADEO.

Muestra	Ludox	Al(OH) <sub>3</sub>	BDMC6	CuSO <sub>4</sub> + TEPA	NaOH	KOH	H <sub>2</sub> O
CuBeta_16	620.8	39.6	2610.0	125.3	0	0	0
CuBeta_17	605.0	28.3	2583.2	105.2	0	0	0
CuBeta_18	610.0	21.3	2580.4	111.6	0	0	0
CuBeta_19	602.5	39.3	2594.0	212.3	0	0	0
CuBeta_20	618.8	28.5	2588.6	213.0	0	0	0
CuBeta_21	618.6	21.5	2582.8	214.8	0	0	0
CuBeta_22	615.8	39.5	1619.0	104.4	123.8	0	0
CuBeta_23	618.9	28.4	1624.1	103.4	129.7	0	0
CuBeta_24	623.1	21.4	1613.1	117.3	127.0	0	0

Una vez transcurrido ese tiempo, los sólidos obtenidos se filtraron, se lavaron con abundante agua, y se caracterizaron por difracción de rayos X (DRX). Los patrones de difracción obtenidos se muestran en la **Figura 52**.



**Figura 52.** Patrones de difracción de los sólidos obtenidos utilizando Cu-TEPA y BDMC6 en el medio de síntesis.

A la vista de los patrones de DRX, se observa que se han sintetizado muestras amorfas (16, 19, 20 y 21), que se descartaron para la presente investigación, y muestras con naturaleza cristalina (17, 18, 22, 23 y 24), que se caracterizaron posteriormente por ICP-MS para conocer su composición química (Ver **Tabla 20**).

## Capítulo 4

Tabla 20. ICP-MS de las muestras seleccionadas en el estudio de la síntesis directa de las nanozeolitas

CuBeta utilizando BDMC6 y Cu-TEPA.

Muestra	Si/Al	% Cu
CuBeta_17	10.0	3.4
CuBeta_18	12.6	2.4
CuBeta_22	9.7	2.0
CuBeta_23	13.5	2.4
CuBeta_24	17.0	2.4

Estas muestras se han estudiado por FE-SEM para determinar la morfología de los cristales y la distribución de cobre en dichos cristales, analizando por EDX la composición química en distintas zonas de las muestras (Ver *Figura 53*, *Figura 54*, *Figura 55* y *Figura 56*). La CuBeta\_18 no se ha caracterizado por EDX dado que su composición química es prácticamente similar a la CuBeta\_23.

La muestra CuBeta\_17, sintetizada en ausencia de NaOH y con una relación de Si/Al = 11, presenta una morfología nanocristalina (Ver *Figura 53*, izquierda)

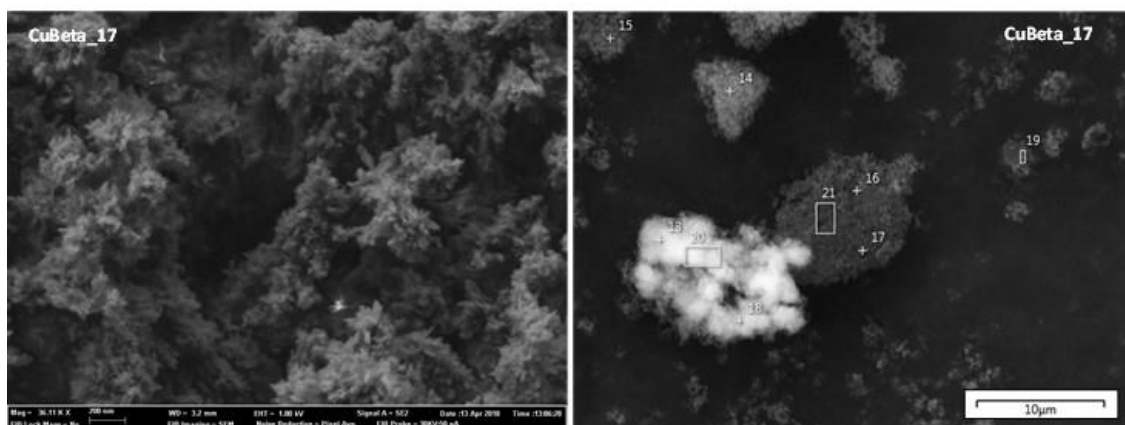


Figura 53. Micrografías FE-SEM de la nanozeolita CuBeta\_17 caracterizada por EDX.

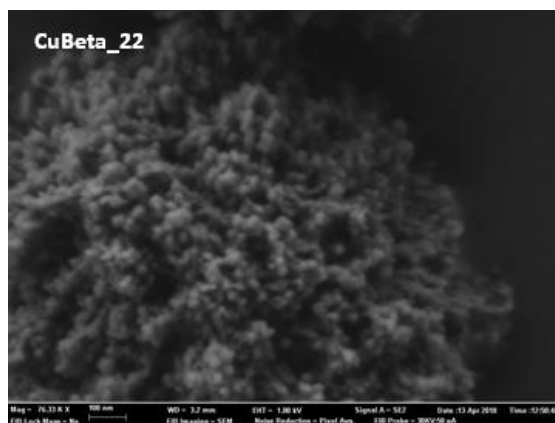
Con el fin de evaluar la dispersión de cobre a lo largo de los cristales de la muestra CuBeta\_17, se evaluó la composición química de la misma en distintas zonas mediante EDX (Ver *Tabla 21*).

*Tabla 21. Relación de Si/Al y % de Cu en diferentes puntos de la nanozeolita CuBeta\_17.*

<b>Zonas</b>	<b>Si/Al</b>	<b>% Cu</b>
Punto 13	15.62	3.51
Punto 14	16.51	1.28
Punto 15	17.01	0.89
Punto 16	15.78	2.58
Punto 17	15.34	2.29
Punto 18	16.05	3.67
Punto 19	6.09	0.00
Punto 20	14.84	3.93
Punto 21	5.72	3.01

Tal y como se observa en la *Tabla 21*, el contenido de cobre es bastante heterogéneo en distintas partes del material, alternándose zonas ricas en cobre con otras partes en las que la presencia de cobre es significativamente menor.

A continuación, se ha estudiado por microscopía la muestra CuBeta\_22, sintetizada con NaOH en el medio de síntesis ( $\text{NaOH/Si} = 0.15$ ), con una relación teórica de Si/Al en el gel de síntesis de aprox. 8. La morfología de la zeolita es nanocristalina (Ver *Figura 54*).



*Figura 54. Micrografía FE-SEM de la nanozeolita CuBeta\_22 caracterizada por EDX.*

La relación de Si/Al y el % de Cu obtenido por EDX en diferentes puntos de la zeolita CuBeta\_22, se muestra en la **Tabla 22**.

*Tabla 22. Relación de Si/Al y % de Cu en diferentes puntos de la nanozeolita CuBeta\_22.*

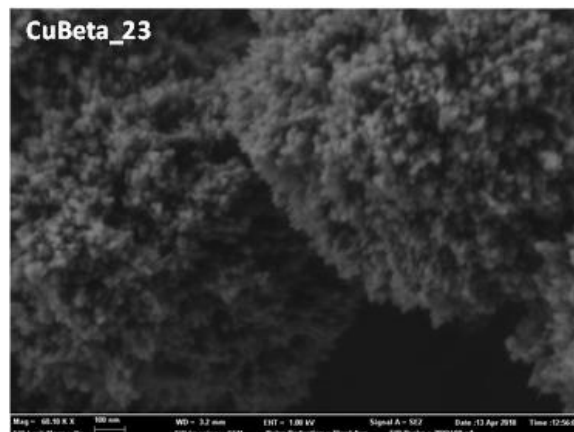
Zonas	Si/Al	%Cu
Punto 22	12.13	2.81
Punto 23	10.14	3.30
Punto 24	11.78	2.38
Punto 25	5.95	1.00
Punto 44	12.53	4.23
Punto 45	11.90	2.96
Punto 46	10.56	2.72
Punto 47	10.75	2.97
Punto 48	10.24	2.53
Punto 49	10.37	3.76

En el caso de la CuBeta\_22, se aprecia una menor variación en el % de Cu después de haber analizado diferentes zonas de la muestra que la observada anteriormente para la zeolita CuBeta\_17. A pesar de que en este momento no tenemos una explicación definitiva para esta mejor distribución de Cu, es posible que la presencia de NaOH en el



medio de síntesis permita acelerar los mecanismos de nucleación de la zeolita Beta, permitiendo una rápida incorporación y encapsulamiento de los complejos de Cu, y, por tanto, facilitando no sólo su estabilidad sino también su distribución a lo largo de los cristales.

La nanozeolita CuBeta\_23 también presenta una morfología nanocrystalina (Ver *Figura 55*), y, además, la composición química a lo largo de la muestra presenta una menor variación que en las muestras anteriores (Ver *Tabla 23*).



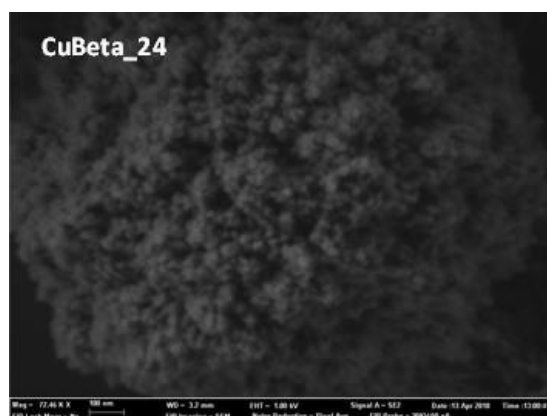
*Figura 55.* Micrografía FE-SEM de la nanozeolita CuBeta\_23 caracterizada por EDX.

## Capítulo 4

**Tabla 23.** Relación de Si/Al y % de Cu en diferentes puntos de la nanozeolita CuBeta\_23.

Zonas	Si/Al	% Cu
Punto 26	10.69	1.87
Punto 27	15.07	1.04
Punto 28	16.21	4.34
Punto 29	14.59	1.57
Punto 30	15.16	0.99
Punto 40	14.83	1.22
Punto 41	14.35	0.83
Punto 42	15.93	1.53
Punto 43	14.77	0.90

Finalmente, la CuBeta\_24, sintetizada con una mayor relación Si/Al, a pesar de mostrar una buena morfología nanocrystalina (Ver **Figura 56**), presenta una mala distribución de Cu a lo largo de sus partículas (Ver **Tabla 24**). La mayor relación Si/Al obtenida en el sólido final, puede ser un problema para estabilizar las especies catiónicas ocluidas en sus poros, resultando en una peor incorporación de los cationes Cu-TEPA.



**Figura 56.** Micrografías FE-SEM de la nanozeolita CuBeta\_24 caracterizada por EDX.

**Tabla 24.** Relación de Si/Al y % de Cu en diferentes puntos de la nanozeolita CuBeta\_24.

Zonas	Si/Al	% Cu
Punto 31	21.32	0.51
Punto 32	18.16	0.27
Punto 33	18.31	0.29
Punto 34	20.26	2.34
Punto 35	20.87	0.00
Punto 36	10.00	6.93
Punto 37	19.64	0.51
Punto 38	20.58	0.00
Punto 39	20.34	0.01

De todas las muestras analizadas, parece que la CuBeta que presenta una mejor dispersión de cobre es la CuBeta\_23. Con el fin de continuar con la investigación, se escaló la síntesis de esta zeolita.

Para ello, se han utilizado las condiciones de síntesis resumidas en la siguiente tabla, empleando BDMC6 como agente director de estructura orgánico (ADEO) (Ver **Tabla 25**). El gel de síntesis resultante se mantuvo a 150 °C durante 10 días para proceder a la cristalización del material.

**Tabla 25.** Relaciones molares escogidas para escalar la síntesis de la zeolita CuBeta\_23 en su forma nanocristalina utilizando BDMC6 como ADEO.

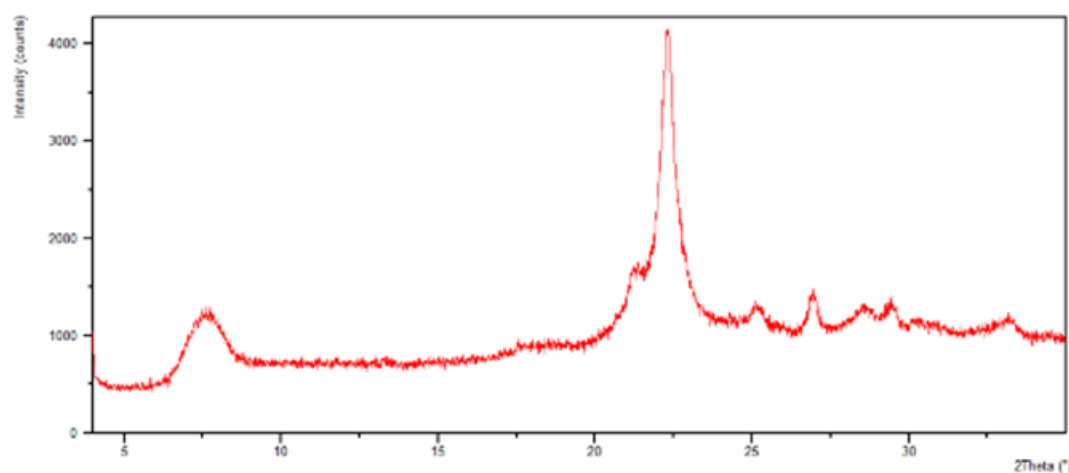
Al/Si	Si/Al	BDMC6/Si	Cu-TEPA/Si	NaOH/Si	H <sub>2</sub> O/Si
CuBeta_23	11	0.25	0.025	0.15	15

La síntesis hidrotermal de una zeolita en cantidades significativas se realiza en un autoclave individual como la que se muestra en la **Figura 57**.



*Figura 57. Autoclave individual utilizada en la síntesis de la CuBeta\_23.*

El patrón de difracción del sólido resultante muestra la cristalización de la estructura zeolítica Beta (Ver *Figura 58*).



*Figura 58. Patrón de difracción de la nanozeolita escalada CuBeta\_23.*

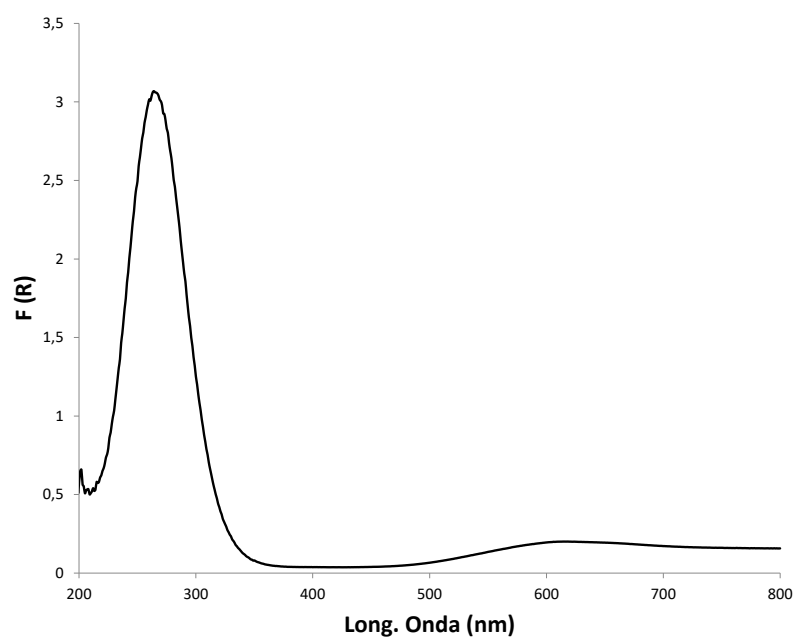
El análisis químico por ICP-MS revela la siguiente composición (Ver *Tabla 26*):

*Tabla 26. ICP-MS de la nanozeolita escalada CuBeta\_23.*

Muestra	Si/Al	% Cu
CuBeta_23	10.6	3.0

El material CuBeta\_23 sin calcinar se ha caracterizado por UV-Vis para comprobar si el complejo de cobre utilizado en la síntesis ( $\text{Cu}^{2+}$ -tetraetilenpentamina, Cu-

TEPA) se mantiene intacto. El complejo organometálico Cu-TEPA en disolución muestra una banda centrada en torno a  $\sim 260 - 270$  nm, la cual se observa claramente también en el sólido CuBeta\_23 obtenido (Ver **Figura 59**). Este dato es importante porque indica que durante el proceso de síntesis de la zeolita Beta, el complejo de Cu-TEPA se mantiene mayoritariamente intacto, evitando la precipitación de partículas de óxido de cobre, y, por tanto, manteniendo, a priori, una buena distribución de cationes  $\text{Cu}^{2+}$  a lo largo de los cristales de la zeolita Beta.



**Figura 59.** UV-Vis de la nanozeolita CuBeta\_23 sintetizada a mayor escala.

La distribución del cobre en los cristales de la zeolita CuBeta\_23 sintetizada a mayor escala se ha estudiado por EDX (Ver **Tabla 27**), donde se observa una excelente distribución de Cu.

## Capítulo 4

**Tabla 27.** Relación de Si/Al y % de Cu en diferentes puntos de la nanozeolita escalada CuBeta\_23.

Zonas	Si/Al	Cu/Al
Punto 1	13.6	0.25
Punto 2	12.9	0.26
Punto 3	13.2	0.25
Punto 4	11.5	0.32
Punto 5	11.4	0.52
Punto 6	13.0	0.29
Punto 7	13.7	0.30
Punto 8	12.9	0.35

La muestra CuBeta\_23 se calcinó en aire a 580 °C durante seis horas para eliminar los componentes orgánicos ocluidos en los poros.

Llegado a este punto, la CuBeta\_23 se caracterizó por espectroscopía infrarroja para poder seguir con facilidad las posteriores funcionalizaciones llevadas a cabo sobre esta zeolita con distintos grupos amonio, como por ejemplo APTES y PAH. El espectro de infrarrojo muestra las señales típicas de una zeolita tipo Beta discutidas anteriormente en el capítulo de la presente tesis doctoral (Ver **Figura 60**).

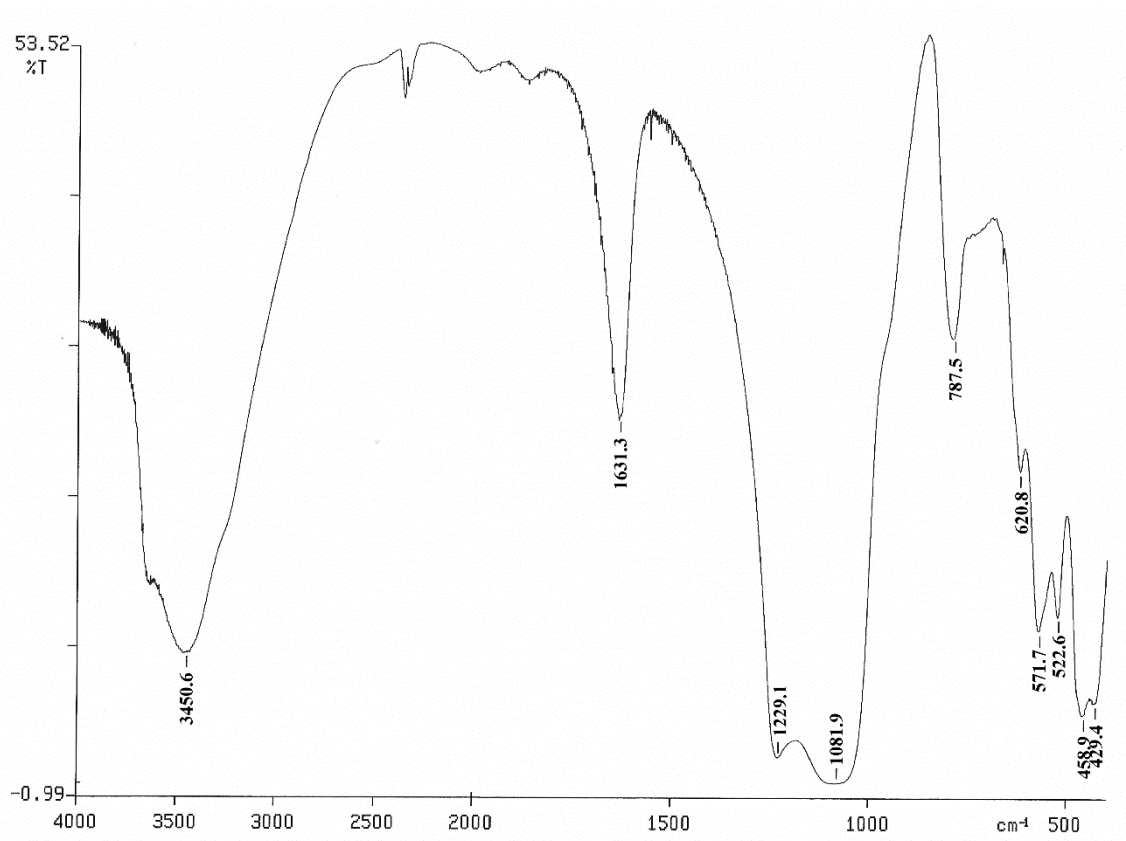


Figura 60. Espectro de FTIR de la nanozeolita CuBeta\_23.

### 4.3. Funcionalización con grupos NH<sub>2</sub>

Con el fin de evaluar la capacidad de la CuBeta\_23 como biosensor, se procedió a estudiar distintos métodos para incorporar grupos aminos en la misma. Los grupos aminos escogidos fueron (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES) y poli(hidrocloruro de alilamina) (PAH), para incorporarlos directamente en la superficie externa de las zeolitas.

#### **4.3.1. Preparación de la nanozeolita CuBeta 23-PAH**

Para la preparación de este material, se suspendieron 60 mg del producto de partida en 6 ml de H<sub>2</sub>O miliQ y en 6 ml de disolución de PAH en PBS con una concentración de 5 mg/ml ( $2 \cdot 10^{-3}$  mmol de PAH), sometiendo la suspensión resultante a ultrasonidos durante 30 minutos. La zeolita se aisló centrifugando la mezcla final a 8000 rpm durante 2 minutos. El sólido separado se redispersó en 4 ml de H<sub>2</sub>O miliQ y se centrifugó nuevamente. Esta operación se repitió dos veces adicionales. Finalmente, el sólido se secó a vacío a 20 °C durante una noche. El rendimiento fue prácticamente cuantitativo.

A continuación, en la **Figura 61**, se observa una señal a 1509 cm<sup>-1</sup> característica de los grupos amonio (RNH<sup>3+</sup>) indicando que la PAH se ha unido a la CuBeta\_23<sup>50</sup>.



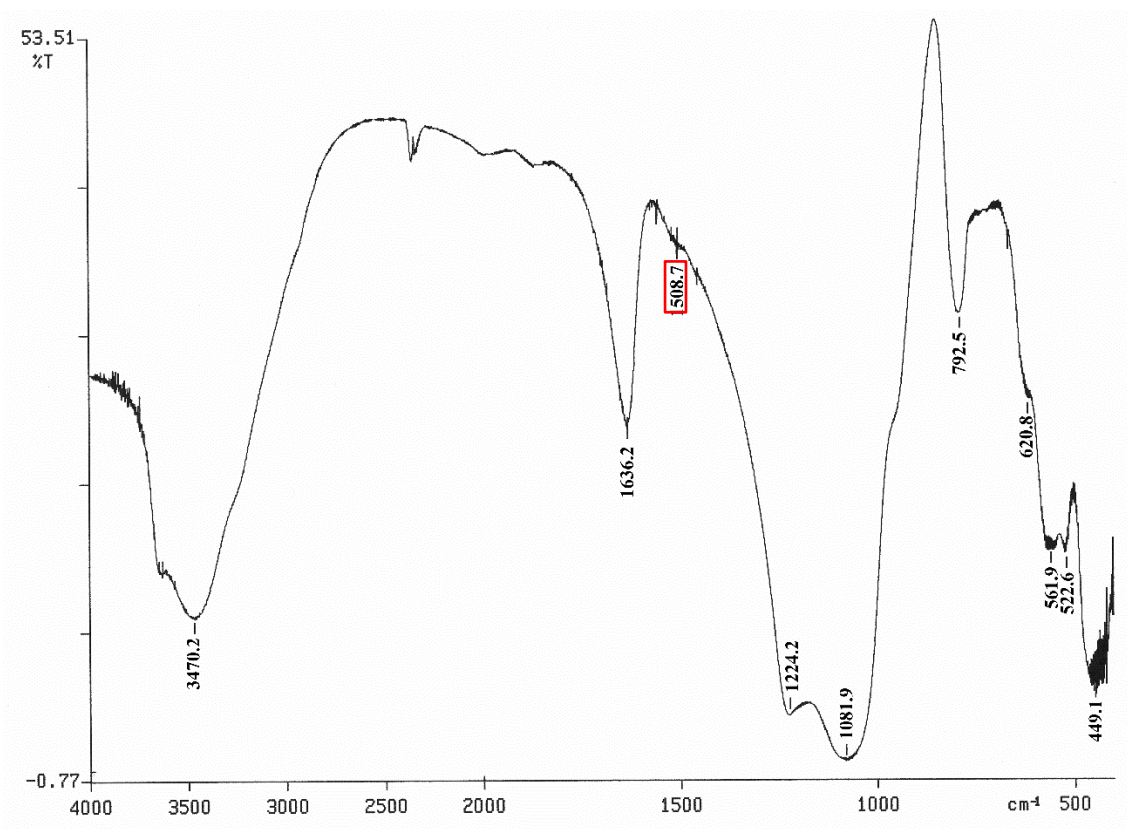


Figura 61. Espectro de FTIR de la nanozeolita CuBeta\_23-PAH.

### **4.3.2. Preparación de la nanozeolita CuBeta\_23-APTES**

Por otro lado, también se funcionalizó la CuBeta\_23 con APTES para completar el estudio. Para ello, se fijó el contenido total de grupos amino en la muestra en 1 mmol  $\text{NH}_2$  por gramo de zeolita.

En el espectro de la **Figura 62** se observa la banda a  $1514 \text{ cm}^{-1}$  característica de las vibraciones de deformación de los grupos amonio, resultantes de la protonación accidental del grupo  $\text{NH}_2$  del APTES que concuerdan con la unión del APTES a la CuBeta\_23, así como las señales típicas de los grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  del resto alquílico del APTES <sup>50</sup>.

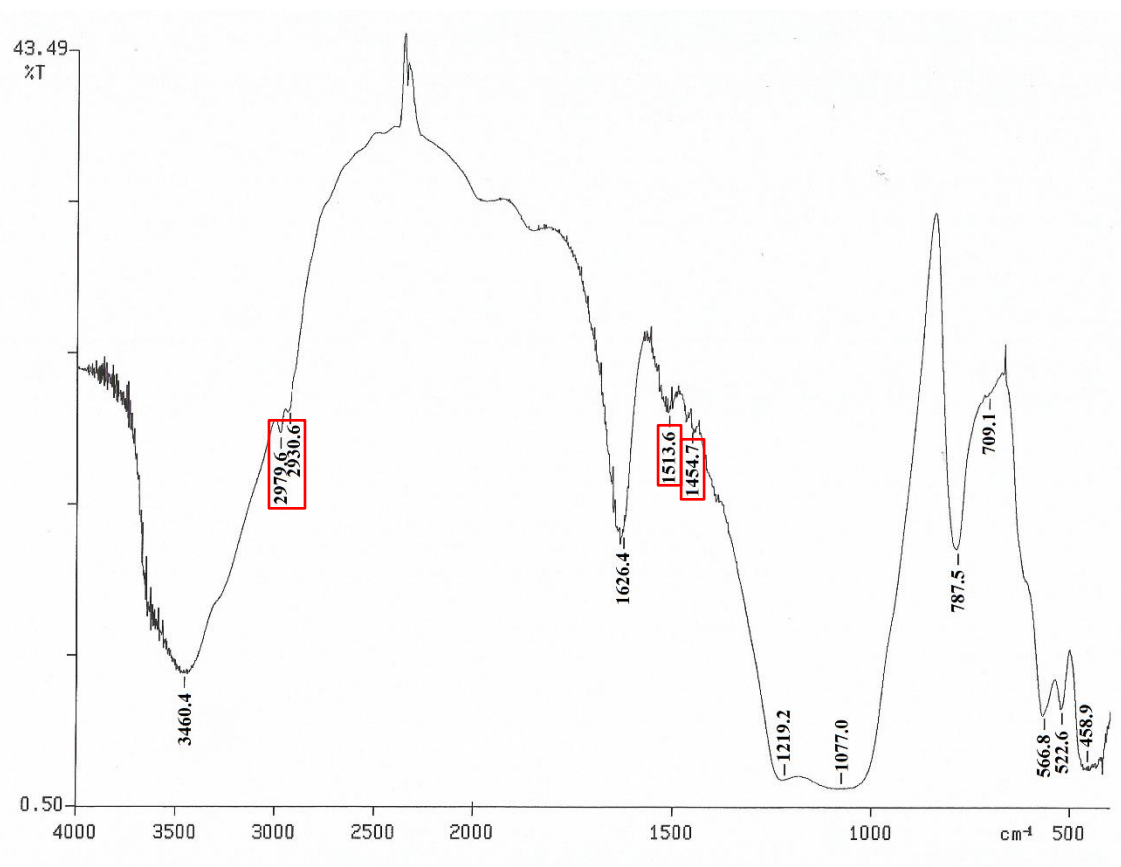


Figura 62. Espectro de FTIR de la nanozeolita CuBeta\_23-APTES.

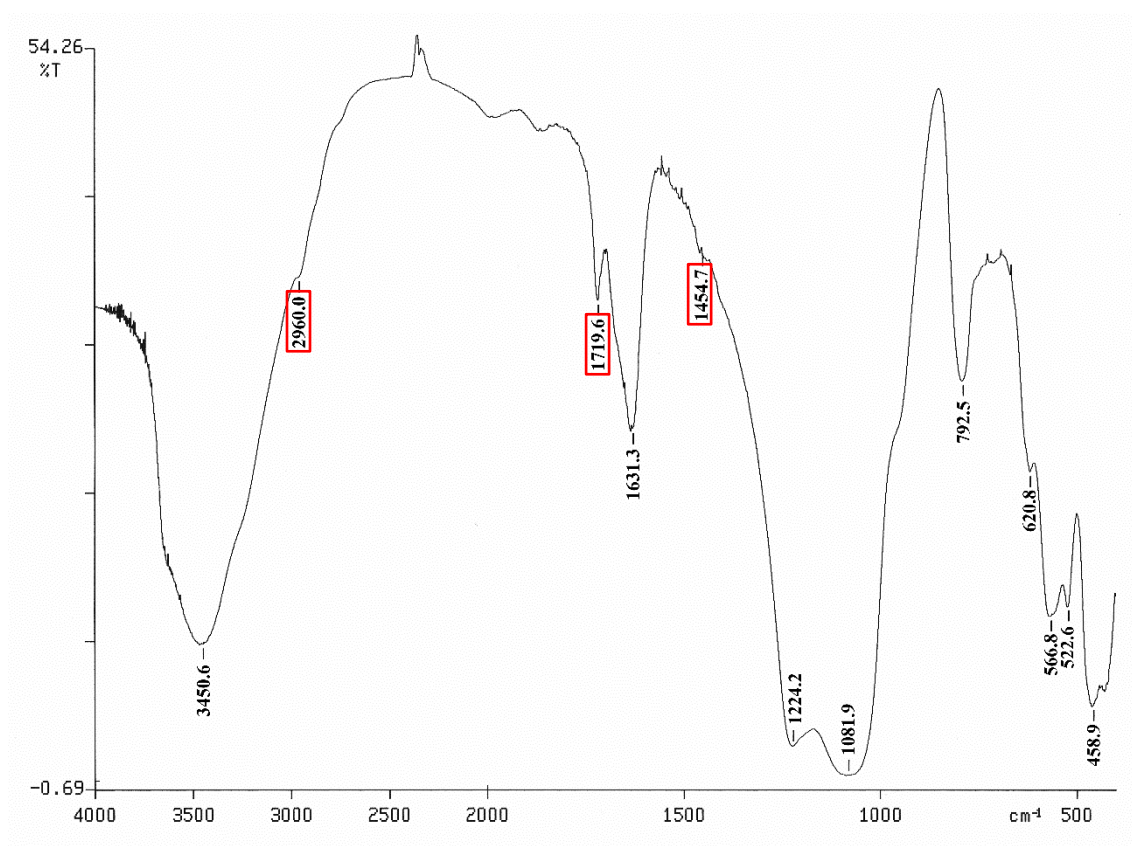
## **4.4. Incorporación del glutaraldehído**

A continuación, se decidió incorporar el glutaraldehído para formar un puente entre las aminas unidas previamente a la nanozeolita y la neutravidina.

### **4.4.1. Preparación de las nanozeolitas CuBeta 23-PAH-Glu y CuBeta 23-APTES-Glu**

Para ello, se dispersaron 50 mg de zeolita en 5 ml de una disolución acuosa de glutaraldehído 423.49 mM (2.12 mmol de glutaraldehído), y se somete la suspensión a ultrasonidos durante 5 minutos. La relación estimada de (n° moléculas de Glu) / (n° partículas de zeolita) resultó ser  $4 \times 10^5$ . El color del sólido resultante ha cambiado a rojo al unirse el glutaraldehído. Los productos obtenidos se aislaron mediante sucesivas redispersiones en agua y posteriores centrifugaciones. Finalmente se secaron a vacío.

Al estudiar el FTIR de la CuBeta\_23-PAH-Glu, se distingue una nueva señal a  $1720 \text{ cm}^{-1}$  típica de los grupos carbonilo (RCOH) y que se atribuye al grupo aldehído libre del glutaraldehído, que junto a la desaparición de la banda a  $1509 \text{ cm}^{-1}$ , típica de los grupos amonio ( $\text{RNH}^{3+}$ ), que aparecía en el FTIR de la CuBeta\_23-PAH, demuestra que el glutaraldehído se ha acoplado a la PAH del producto de partida. Además, continúan apareciendo las señales a  $2960$  y  $1455 \text{ cm}^{-1}$  propias de los grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  del resto alquílico de la amina y del glutaraldehído (Vease *Figura 63*).



*Figura 63. Espectro de FTIR de la nanozeolita CuBeta\_23-PAH-Glu.*

En el FTIR de la CuBeta\_23-APTES-Glu se identifica una banda a  $1710\text{ cm}^{-1}$  típica de los grupos carbonilo (RCOH) y que se atribuye al grupo aldehído libre del glutaraldehído. Se observan también las señales a 2970, 2940 y  $1455\text{ cm}^{-1}$  características de los grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  del resto alquílico del APTES y del glutaraldehído (Ver *Figura 64*).

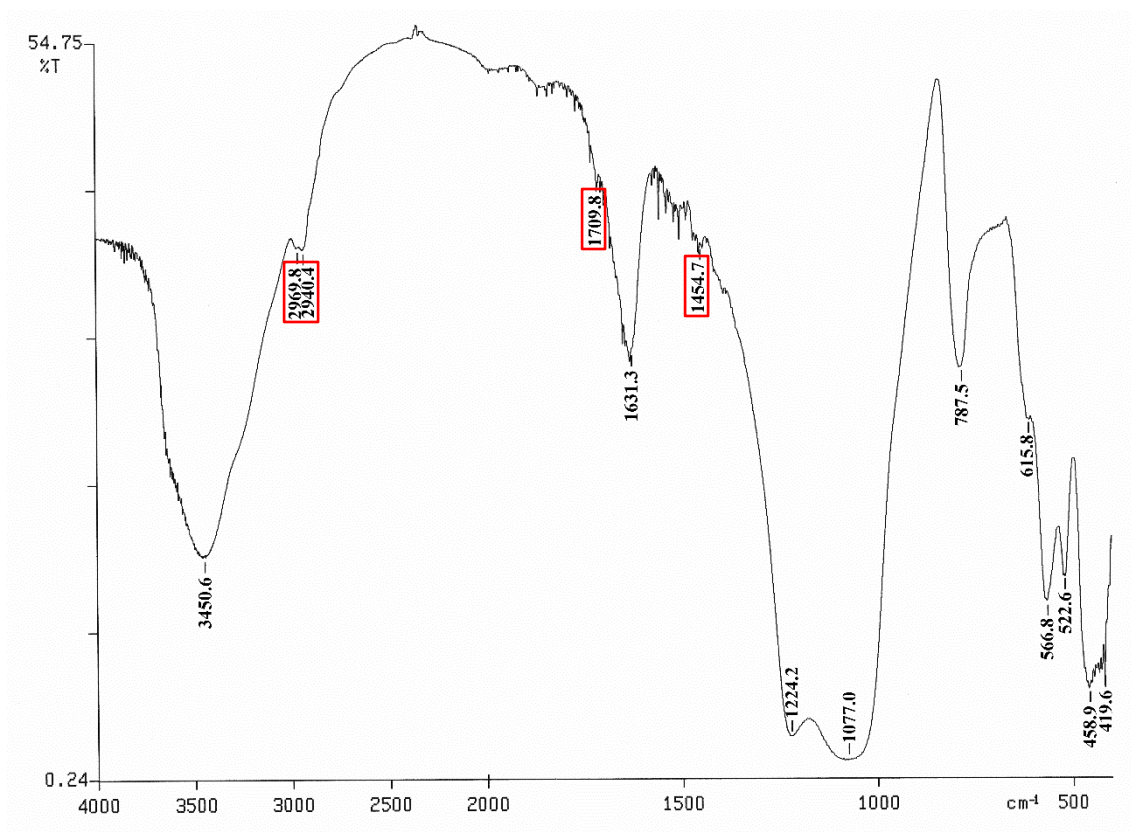
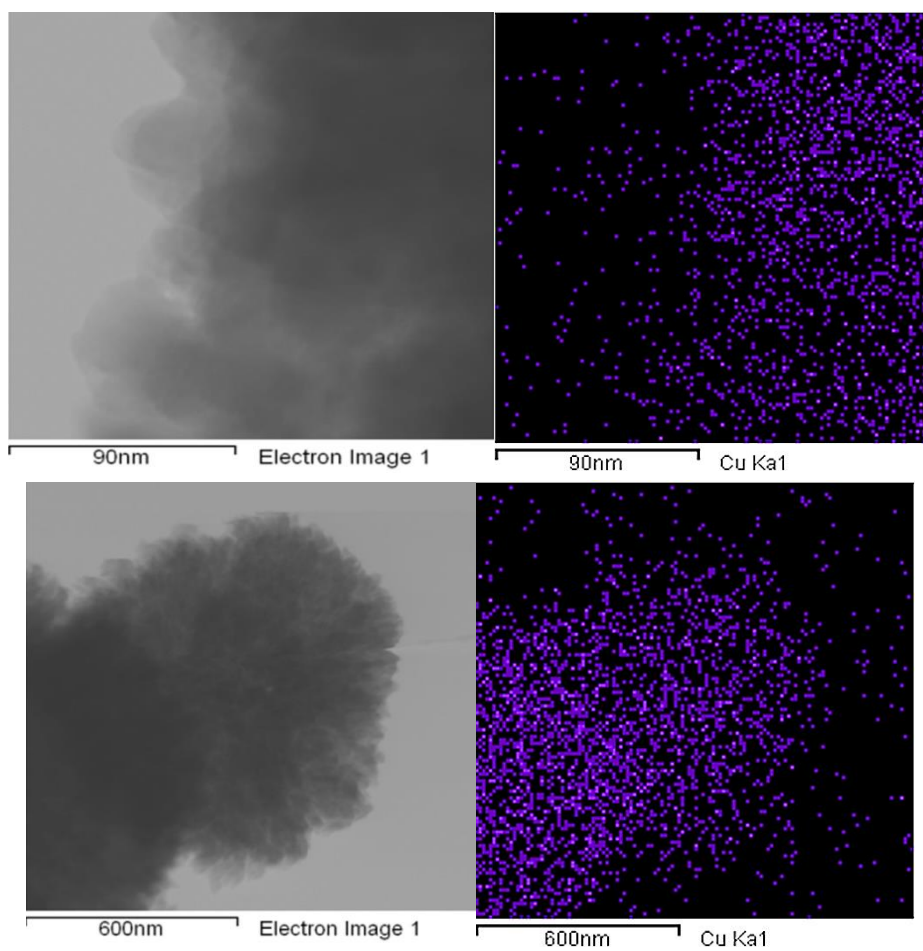


Figura 64. Espectro de FTIR de la nanozeolita CuBeta\_23-APTES-Glu.

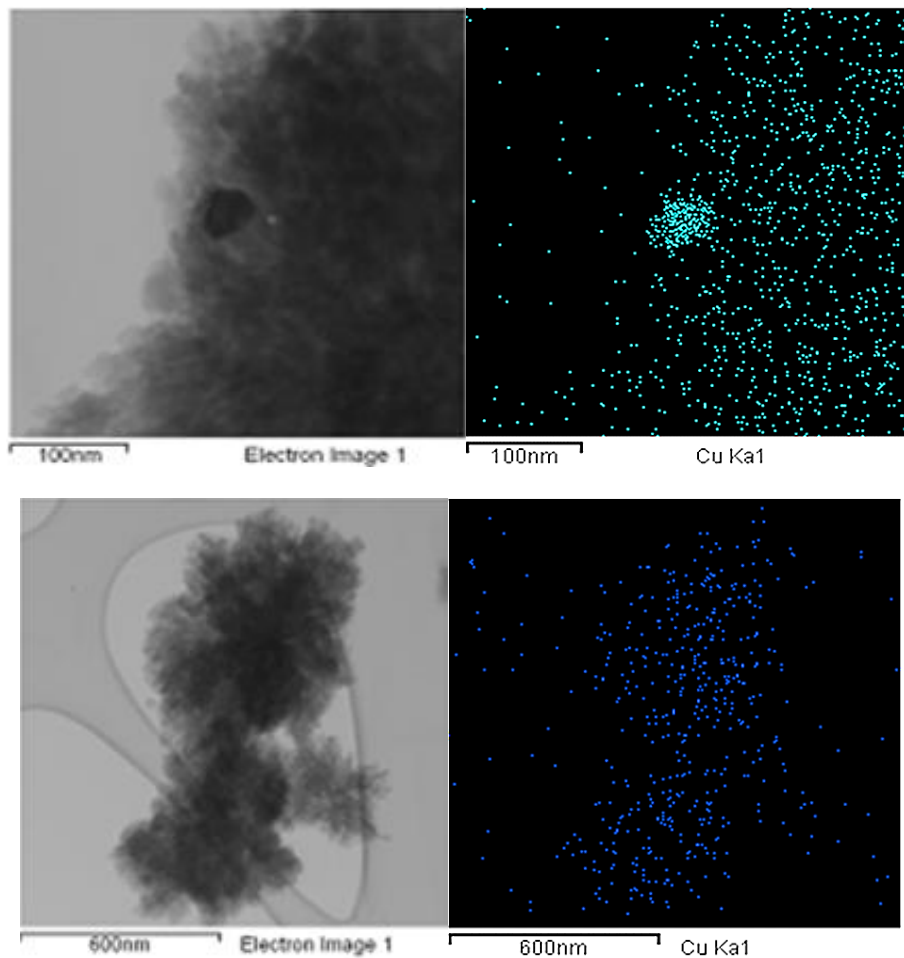
#### **4.4.2. Discusión del HR-TEM de los derivados de la nanozeolita CuBeta 23 con Glu**

Las muestras CuBeta\_23-PAH-Glu y CuBeta\_23-APTES-Glu se estudiaron por HR-TEM para evaluar no sólo la distribución del cobre sino también la morfología de los cristales tras la funcionalización de los grupos amino.

En la *Figura 65* y en la *Figura 66* se muestran las imágenes correspondientes a las micrografías de las zeolitas de la CuBeta\_23-PAH-Glu y de la CuBeta\_23-APTES-Glu y a la correspondiente distribución de centros metálicos, (“mapping”).



*Figura 65. Distribución del Cu en diferentes áreas de la nanozeolita CuBeta\_23-PAH-Glu.*



*Figura 66. Distribución del Cu en diferentes áreas de la nanozeolita CuBeta\_23-APTES-Glu.*

Como puede apreciarse en las figuras anteriores, ambos materiales presentan un grado de agregación de sus nanopartículas considerable.

Por otro lado, la distribución del metal en estas zeolitas sintetizadas por métodos directos es considerablemente superior a la observada en los anteriores capítulos de la presente tesis doctoral, donde el metal se incorporaba por métodos post-sintéticos de intercambio catiónico.

## 4.5. Incorporación de la neutravidina

A pesar de que las micrografías TEM de las muestras de las zeolitas CuBeta\_23-PAH-Glu y CuBeta\_23-APTES-Glu muestran un considerable grado de agregación, se decidió incorporar la neutravidina a la CuBeta\_23-APTES-Glu y hacer un ensayo de afinidad, pues se había encontrado en la bibliografía que las nanopartículas podían dispersarse en una suspensión de agarosa <sup>64</sup>.

### **4.5.1. Preparación de la nanozeolita CuBeta 23-APTES-Glu-NAV**

Se dispersaron 5 mg de la CuBeta\_23-APTES-Glu en 150  $\mu$ l de una disolución acuosa de neutravidina con una concentración de 1 mg/ml ( $2.5 \times 10^{-6}$  mmol de neutravidina), y se agitó la suspensión resultante en un vórtex a temperatura ambiente durante 24 horas. La relación estimada de (n° moléculas de NAV) / (n° partículas de la zeolita CuBeta\_23-APTES-Glu) fue 1.26. La zeolita se aisló mediante sucesivas redispersiones en agua y posteriores centrifugaciones, y, finalmente, se secó a vacío.

El espectro de FTIR se muestra en la **Figura 67**, observándose una nueva señal a  $1528 \text{ cm}^{-1}$ , característica de los grupos amida,  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ , que junto a la desaparición de la banda a  $1710 \text{ cm}^{-1}$  típica del grupo aldehído,  $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$ , sugiere que la interacción de la neutravidina con el glutaraldehído ha sido satisfactoria. También se observan las bandas a  $2960$ , y  $1450 \text{ cm}^{-1}$ , típicas de los grupos  $\text{CH}_2$  del APTES y del glutaraldehído.



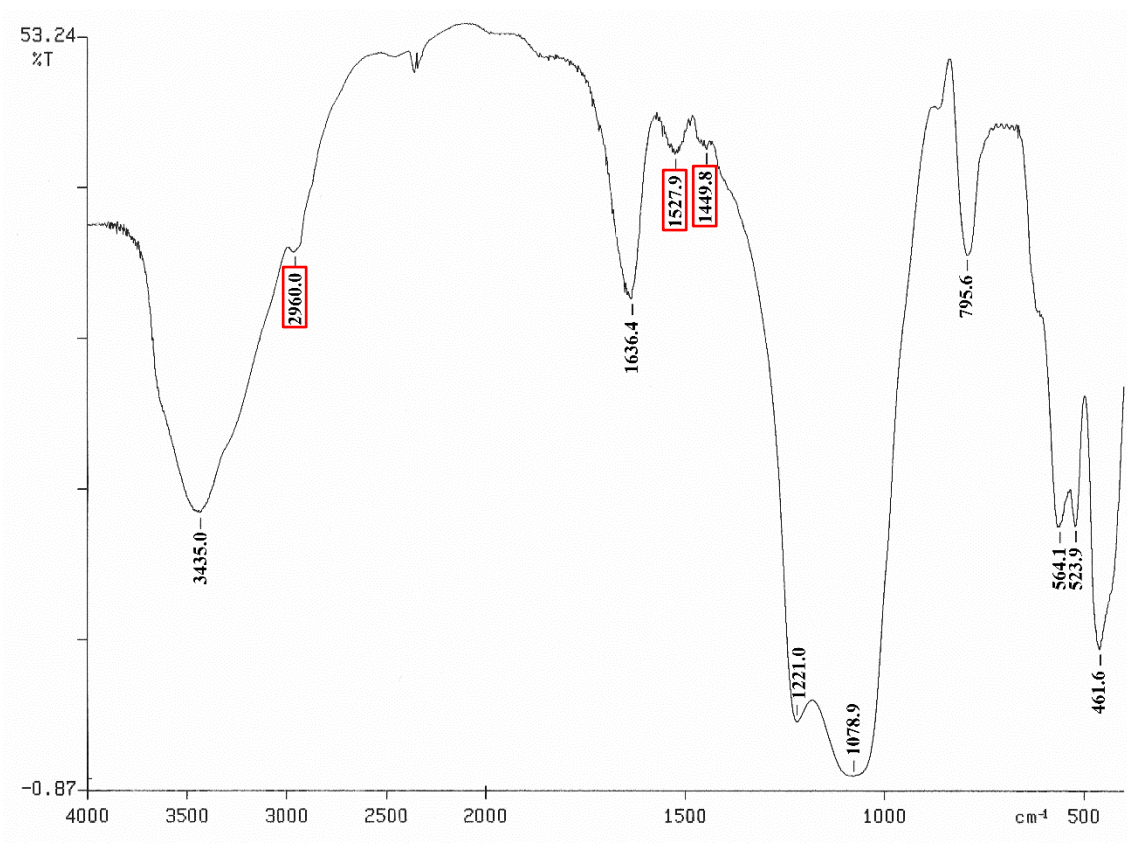


Figura 67. Espectro de FTIR de la nanozeolita CuBeta\_23-APTES-Glu-NAV.

## 4.6. Ensayo de afinidad de la nanozeolita CuBeta\_23-APTES-Glu-NAV

Tras varias pruebas, se encontró que la zeolita CuBeta\_23-APTES-Glu-NAV daba dispersiones estables en una suspensión de agarosa al 0.05% (no se observaba ningún precipitado transcurridos varios minutos después de ser preparada). Los ensayos de afinidad se llevaron a cabo utilizando esta dispersión.

A continuación, en la *Figura 68*, se describe gráficamente el procedimiento seguido para realizar los ensayos de afinidad (Una versión esquemática y simplificada de los mismos fue mostrada con anterioridad en la *Figura 8*).

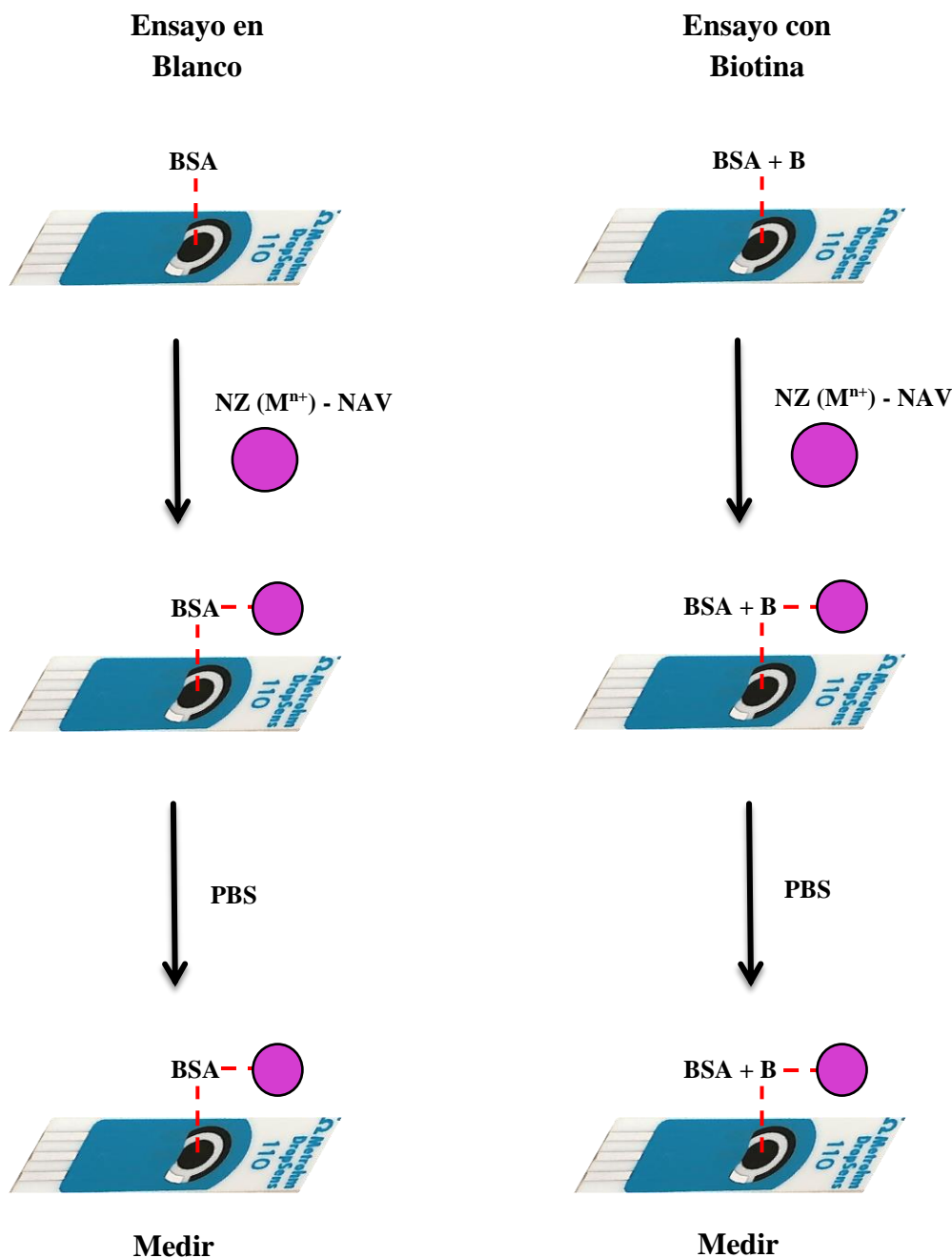


Figura 68. Esquema general de las etapas previas al ensayo de afinidad.

Los ensayos se llevaron a cabo en paralelo en sendos electrodos; un ensayo usando un electrodo recubierto con albumina (BSA), al que se denomina “*ensayo en blanco*”, y otro ensayo, usando un electrodo en el que primero se ancló la biotina y después se recubrió con albúmina, al que se denomina “*ensayo con biotina*”. En principio, los electrodos se recubren de albúmina para que al añadir sobre ellos la muestra de

#### Capítulo 4

CuBeta\_23-APTES-Glu-NAV, y a continuación, lavarlos con la disolución tampón de fosfatos (PBS, a pH 7.4), la superficie recubierta no retenga la neutravidina unida a la zeolita. En la práctica, puede retenerse parte de la neutravidina sobre el electrodo, y por eso hay que hacer las medidas en paralelo, para poder asegurar que parte de la señal que da el electrodo con la biotina realmente viene de la neutravidina unida a la zeolita, y que parte de la señal viene de la neutravidina retenida sobre el electrodo.

Los ensayos de afinidad que aparecen en la presente tesis doctoral fueron realizados en el grupo de investigación del profesor Agustín Costa García por Alba Iglesias Mayor. En cada ensayo de afinidad se midieron dos muestras de CuBeta\_23-APTES-Glu-NAV en cada electrodo (las medidas se repitieron dos veces por cada muestra).

Las medidas registradas en los ensayos de afinidad se resumen en la **Tabla 28**.

**Tabla 28.** Resumen de las medidas de afinidad de la nanozeolita CuBeta\_23-APTES-Glu-NAV.

Ensayos de Afinidad	Ensayo en Blanco		Ensayo con Biotina	
	E (V)	I ( $\mu$ A)	E (V)	I ( $\mu$ A)
Primera Serie	- 0.173	9.420	- 0.188	24.255
Segunda Serie	- 0.217	9.870	- 0.192	12.761

Los datos registrados en la tabla anterior se han calculado promediando las dos réplicas realizadas para cada muestra. En la tabla aparece en primer lugar el voltaje al que tiene lugar la reducción de Cu (II) de la zeolita, y, en segundo lugar, la intensidad de corriente de la medida, proporcional a la concentración de cobre detectado.

Como se puede observar, la intensidad de las medidas en el “*ensayo con biotina*” es mayor en los dos casos que la intensidad de las medidas en el “*ensayo en blanco*”, lo que quiere decir que el sistema NZ ( $M^{n+}$ ) – NAV se ha unido específicamente a la biotina

y por tanto el ensayo de afinidad ha resultado positivo. No obstante, dichas medidas presentan un cierto nivel de irreproducibilidad, hecho que puede ser atribuible a la alta aglomeración de los nanocristales de la zeolita Beta.

Estos resultados preliminares son muy alentadores, ya que se puede observar una clara afinidad del sistema desarrollado basado en nanozeolitas con la biotina. El siguiente gran objetivo será lograr medidas con una mayor reproducibilidad.



# 5

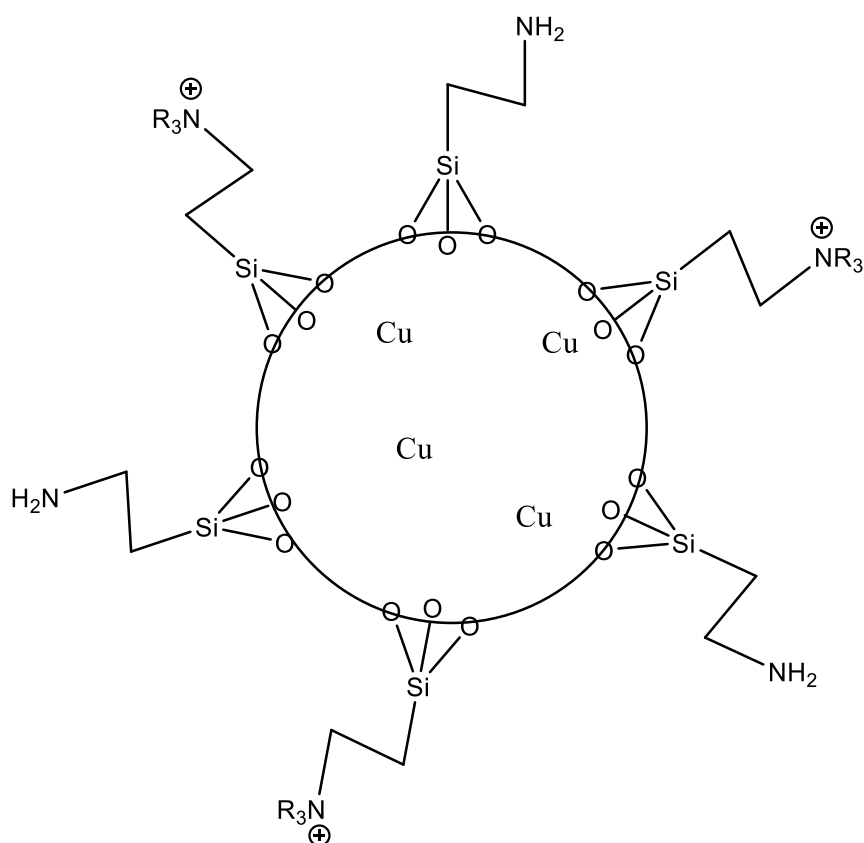
---

## *Perspectivas Futuras*





A la vista de los problemas de agregación y subsiguiente dispersión de las muestras en agua que hemos detectado en la presente investigación, el grupo del Dr. Manuel Moliner Marín en el ITQ (Valencia) se encuentra diseñando unas nuevas nanozeolitas de cobre, similares a las CuBeta, en cuanto a que el metal se incorpora a la zeolita durante el proceso de síntesis, pero de menor tamaño y a las que se han incorporado grupos amino y grupos tetralquilamonio en su superficie (Ver **Figura 69**).



**Figura 69.** Esquema general de las nuevas nanozeolitas en fase de preparación.

La idea general es que los grupos amino servirán para anclar glutaraldehídos que puedan unirse a proteínas (neutravidina o anticuerpos), mientras que la carga de los grupos alquilamonio (junto con el menor tamaño de las zeolitas), evitarán la agregación y mejorarán la dispersión de las zeolitas en medios altamente polares, como el requerido en este caso (medio acuoso). El contenido de cada uno de los grupos anclados definirá la

## **Capítulo 5**

capacidad de los nanocristales de zeolita para ser dispersados en medios polares y para facilitar el anclaje de las proteínas.





# 6

---

*Procedimiento*  
*Experimental*



## **6.1. Zeolitas y Reactivos**

### **6.1.1. Reactivos**

- Sigma-Aldrich
  - Nitrato de cadmio (II) tetrahidratado,  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
  - Acetato de cadmio (II) dihidratado,  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 99 %
  - n-octilamina,  $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}$
  - Neutravidina
  - 1,8-octanodiamina,  $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{N}_2$
  - Tris(2-aminoetil)amina,  $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{N}_3$
  - Poli(hidrocloruro de alilamina) (PM = 17500),  $\text{C}_3\text{H}_8\text{ClN}$
  - (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES),  $\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$
  - Sílica coloidal (Ludox AS-40), 40 %
  - Hidróxido de aluminio,  $\text{Al}(\text{OH})_3$
  - Tetraetilenpentamina (TEPA), 99 %
  - Hidróxido de tetraetilamonio (TEAOH), 35 %
- Merck
  - Glutaraldehído,  $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$
- Alfa Aesar
  - Sulfato de cobre (II),  $\text{CuSO}_4$
- Scharlau
  - Hidróxido de sodio,  $\text{NaOH}$ , 99 %
  - Hidróxido de potasio,  $\text{KOH}$ , 99 %

## Capítulo 6

### **6.1.2. Síntesis de las nanozeolitas**

#### ***6.1.2.1. Zeolita nanocrystalina H-Beta***

##### ➤ **Síntesis del ADEO (N-butil-N,N-dimetilciclohexilamonio, BDMC6)**

Se disuelven 8.2 g (0.06 moles) de N,N-dimetilciclohexilamina en 100 ml de acetonitrilo. Se adicionan cinco equivalentes de 1-bromobutano (44.0 g, 0.32 moles) y se deja reaccionar durante 48 horas bajo agitación vigorosa, a temperatura de reflujo (para el acetonitrilo aprox. 90 °C). Una vez finalizada la reacción, se evapora el disolvente, obteniéndose un residuo blanco cristalino. Se disuelve el sólido en una pequeña alícuota de cloroformo y se adiciona una mezcla de acetato de etilo-dietil éter para cristalizar el producto. El compuesto se separa por filtración, y por último, se seca mediante vacío y calor.

Para preparar la forma hidróxido de la sal orgánica anterior, se disuelven 15 g de la sal orgánica en 75 g de agua. A continuación, se añaden 40 g de una resina de intercambio aniónico (Dower SBR), y la mezcla resultante se mantiene en agitación durante 24 horas. Finalmente, la disolución se filtra y se obtiene el hidróxido de N-butil-N,N-dimetilciclohexilamonio (BDMC6).

##### ➤ **Síntesis de la zeolita H-Beta**

Se mezclan 36.7 g de una disolución acuosa al 8.0 % en peso del hidróxido de BDMC6 (butildimetilciclohexilamonio) con 0.2 g de  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . La mezcla se mantiene en agitación durante 20 minutos. Posteriormente, se adicionan 5.4 g de una disolución acuosa de sílice coloidal al 40 % en peso (Ludox HS-40), y se mantiene la mezcla en agitación hasta lograr la concentración deseada. La composición final del gel es  $\text{SiO}_2 / 0.0333 \text{ Al}_2\text{O}_3 / 0.4 \text{ BDMC6} / 10 \text{ H}_2\text{O}$ . Este gel se transfiere a un autoclave de acero con



camisa de teflón y se calienta a 150 °C durante 14 días en condiciones estáticas. Transcurrido este tiempo, el producto obtenido se recupera mediante filtración, se lava con abundante agua, y se seca a 100 °C. El sólido obtenido se calcina en aire a 550 °C durante 5 horas. El rendimiento de sólido obtenido es superior al 95 %.

Mediante difracción de rayos X se confirma que el sólido obtenido presenta los picos característicos de la zeolita Beta. La composición química de la muestra final presenta una relación Si/Al de ~ 11.0. El tamaño de cristal promedio es de ~ 10 - 15 nm.

### **6.1.2.2. Zeolita nanocrystalina CP814E**

El material CP814E es un producto comercial de la empresa Zeolyst. Dicho material presenta la estructura cristalina de la zeolita Beta con un tamaño de cristal promedio de unos 25 - 35 nm, el cual es ligeramente superior a la zeolita H-Beta sintetizada en esta tesis doctoral (Ver apartado 6.1.2.1.).

### **6.1.2.3. Síntesis directa de las nanozeolitas tipo Beta con Cu**

En primer lugar, es necesario preparar el complejo Cu-TEPA (Cu-tetraetilenpentamina). Para ello, se mezcla la cantidad necesaria de una disolución acuosa de CuSO<sub>4</sub> al 20% en peso con la cantidad necesaria de TEPA. La mezcla resultante permanece en agitación durante dos horas. Posteriormente, a la disolución anterior se le añade las cantidades necesarias de una disolución acuosa al 20% en peso de NaOH y de una disolución acuosa del ADEO (bien TEA o BDMC6). A continuación se añaden las cantidades requeridas de las fuentes de Al y Si (Al(OH)<sub>3</sub> y LUDOX AS-40, respectivamente). La mezcla se agita durante 30 minutos para lograr una completa homogeneización. Las cantidades adicionadas de cada componente del gel para cada una de las síntesis se encuentran detalladas en la **Tabla 14** y en la **Tabla 19**, mientras que las composiciones finales de cada gel se encuentran detalladas cada una de ellas en la **Tabla**

## Capítulo 6

13 y en la *Tabla 18*. Como se puede observar, en todas ellas, las relaciones molares entre los reactivos se encuentran incluidos en la secuencia indicada a continuación:

- $\text{SiO}_2$  / 0.033 - 0.083  $\text{Al}_2\text{O}_3$  / 0.015 - 0.025 Cu-TEPA / 0.25 - 0.65 ADEO / 0 - 0.15  
NaOH / 15 - 20  $\text{H}_2\text{O}$

Los geles se transfieren a un multiautoclave, con fundas de teflón, y se someten a un tratamiento hidrotermal a 140 – 150 °C durante 10 días en condiciones estáticas. Transcurrido ese tiempo, los productos finales se recuperan por filtración, se lavan con agua desionizada y se secan a 100 °C. Finalmente, los materiales se calcinan a 550 °C durante 4 h en aire.

## **6.2. Técnicas empleadas en la caracterización de compuestos**

### **6.2.1. Voltamperometría**

La voltamperometría de barrido lineal (VBL) ha sido la técnica empleada para la detección de  $\text{Cd}^{2+}$  libre en las disoluciones sobrenadantes correspondientes a cada reacción.

El procedimiento seguido para la determinación del  $\text{Cd}^{2+}$  presente en las disoluciones sobrenadantes fue el siguiente:

1. Se diluyen 20  $\mu\text{l}$  de la disolución sobrenadante en 80  $\mu\text{l}$  de HCl 0.1 M.
2. A continuación, se añaden 40  $\mu\text{l}$  de la disolución anterior sobre la superficie que abarcan los tres electrodos (EA + ET + ER) (Ver *Figura 5*).
3. Finalmente, se determina el  $\text{Cd}^{2+}$  presente en la disolución sobrenadante.

### **6.2.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)**

Los espectros de FTIR han sido obtenidos en un espectrofotómetro “*Perkin-Elmer Paragon 1000 FTIR*” en el rango de longitudes de onda comprendido entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Las muestras se mezclan con KBr en un mortero hasta obtener un polvo fino.

### **6.2.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Los espectros de RMN de C-13 han sido llevados a cabo en un espectrómetro AV300 perteneciente a los Servicios Científico-Técnicos (SCTs) de la Universidad de Oviedo.

## **Capítulo 6**

Los espectros de RMN de Si-29 han sido llevados a cabo en el Instituto de Tecnología Química de Valencia. Estos espectros se han obtenido utilizando la rotación de ángulo mágico ("magic angle spinning", MAS) a temperatura ambiente y 79.5 MHz. Las medidas se han realizado utilizando técnicas convencionales de Bloch-decay (BD) sin polarización cruzada y polarización cruzada (CP) con protones.

### **6.2.4. Difracción de Rayos X (DRX)**

Los difractogramas de rayos X mostrados en este trabajo han sido realizados con un difractómetro de rayos X "*Bruker D8 Discover*" disponible en los Servicios Científico-Técnicos (SCTs) de la Universidad de Oviedo.

### **6.2.5. Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM)**

Las micrografías, los microanálisis (EDX) y los resultados de difracción de electrones presentes en esta tesis doctoral han sido registrados en un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución "*MET JEOL-JEM 2100F*" perteneciente a los Servicios Científico-Técnicos (SCTs) de la Universidad de Oviedo.

### **6.2.6. Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS)**

Los materiales empleados en la presente tesis doctoral se han analizado empleando un equipo Varian 715-ES, con el fin de determinar el contenido de Si, Al, Na, Cd o Cu, dependiendo de la muestra. Previamente al proceso de medida, se disgregan 30 mg de la muestra en una mezcla de ácidos (HNO<sub>3</sub> : HF : HCl en proporción volumétrica 1 : 1 : 3). En todos los casos, se determina una curva de calibrado mediante patrones comerciales.

### **6.2.7. Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FE-SEM)**

Las imágenes de microscopía electrónica FE-SEM se han obtenido en un microscopio Ultra 55 (Zeiss), operando a un voltaje de 2.0 kV, y empleando muestras en polvo dispersas sin ningún tipo de recubrimiento sobre una cinta adhesiva de doble cara adherida al portamuestras.

### **6.2.8. Análisis textural: adsorción de N<sub>2</sub>**

La adsorción física de gases en sólidos permite la determinación de la superficie específica y el volumen de poro.

En la presente tesis doctoral se recurre a la adsorción cuantitativa de N<sub>2</sub> a 77 K (temperatura del N<sub>2</sub> líquido), obteniéndose la isoterma de adsorción. Dicha isoterma se determina en un equipo Micromeritics ASAP-2000. Previamente, las muestras se calcinan y se tratan a vacío durante 24 h a 400 °C.

La determinación de la superficie específica se realiza empleando el modelo Brunauer-Emmett-Teller (BET), mientras que el área y el volumen de microporo se obtienen utilizando el “método de la curva t” (t-plot).

### **6.3. Nanozeolitas funcionalizadas con aminas orgánicas**

Para todas las reacciones descritas durante este capítulo se han obtenido rendimientos prácticamente cuantitativos.

#### **6.3.1. Derivados de la nanozeolita H-Beta**

##### ***6.3.1.1. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd***

Se dispersan 830 mg de la nanozeolita H-Beta en 353 ml de una disolución acuosa de acetato de cadmio dihidratado 10 mM (0.26 mmol de  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) agitando la suspensión producida, a 20 °C durante 20 horas. Siguiendo el método descrito en el apartado 2.1., se aísla el sólido blanco resultante. El pH de la disolución sobrenadante final es 5.7.

**FTIR KBr ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3480: m, a,  $\nu$  (O-H); 1631: d,  $\delta$  (H-O-H); 1224: mf, int,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{TO}_4$ ); 1082: mf, ext,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{TO}_4$ ); 793: d, ext,  $\nu_{\text{s}}$  ( $\text{TO}_4$ ); 567: m, ext, d-a; 518: m, ext, d-a; 459: f, int,  $\delta$  (O-T-O) (Ver *Figura 10*).

**DRX (Pos. [20] / d / Int.):** 7.81° 11.32 Å (40 %); 17.78° 4.99 Å (7 %); 22.42° 3.97 Å (100 %); 25.34° 3.51 Å (35 %); 27.04° 3.30 Å (20 %); 29.56° 3.02 Å (14 %); 33.59° 2.67 Å (23 %); 43.68° 2.07 Å (29 %) (Ver *Apéndice 2*).

##### ***6.3.1.2. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-OA***

Se suspenden 150 mg de la H-Beta-Cd en 9 ml de una disolución de n-octilamina (2 ml n-octilamina, 49 ml  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ y 49 ml etanol) de concentración 119.81 mM (1.08 mmol de n-octilamina) y la suspensión preparada se somete a agitación a 20 °C durante 20 horas. El sólido resultante es blanco y se aísla siguiendo el procedimiento explicado en la sección 2.1. usando como líquido de lavado una mezcla EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  miliQ con relación 1:1 en volumen.

**FTIR KBr (cm<sup>-1</sup>):** 3451: m, a, v (O-H); 2931: m, v<sub>as</sub> (CH<sub>2</sub>); 2852: d, v<sub>s</sub> (CH<sub>2</sub>); 1626: d, δ (H-O-H); 1519: d, δ (NH<sub>2</sub>); 1465: d, δ<sub>as</sub> (CH<sub>2</sub>); 1219: mf, int, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); 1067: mf, a, ext, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); 793: d, ext, v<sub>s</sub> (TO<sub>4</sub>); 567: f, ext, d-a; 518: f, ext, d-a; 459: mf, int, δ (O-T-O) (Ver *Figura 11*).

**DRX (Pos. [2θ] / d / Int.):** 7.78° 11.38 Å (27 %); 21.39° 4.15 Å (10 %); 22.37° 3.98 Å (100 %); 26.99° 3.30 Å (22 %); 29.16° 3.06 Å (16 %) (Ver *Apéndice 3*).

**RMN de C-13:** Señal a 58.8 ppm; señal ancha con un máximo claramente definido a 41.6 ppm; señal ancha con máximos claramente definidos a 32.1 ppm, 29.3 ppm, 28.1 ppm y 22.8 ppm; señal ancha con máximos claramente definidos a 16.7 ppm, 14.4 ppm y 13.0 ppm (Ver *Figura 12*).

### 6.3.1.3. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA

En 15 ml de una disolución acuosa de 1,8-octanodiamina de concentración 423.55 mM (6.35 mmol de 1,8-octanodiamina) se dispersan 150 mg del sólido H-Beta-Cd y se somete a agitación la suspensión producida, a 20 °C durante 20 horas. Siguiendo el proceso explicado en el apartado 2.1., se aísla el producto blanco resultante.

**FTIR KBr (cm<sup>-1</sup>):** 3431: m, a, v (O-H); 2931: m, v<sub>as</sub> (CH<sub>2</sub>); 2852: d, v<sub>s</sub> (CH<sub>2</sub>); 1631: d, δ (H-O-H); 1528: md, δ (NH<sub>2</sub>); 1465: md, δ<sub>as</sub> (CH<sub>2</sub>); 1219: mf, int, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); 1072: mf, a, ext, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); 793: d, ext, v<sub>s</sub> (TO<sub>4</sub>); 562: f, ext, d-a; 518: f, ext, d-a; 459: mf, int, δ (O-T-O) (Ver *Figura 14*).

**DRX (Pos. [2θ] / d / Int.):** 7.85° 11.27 Å (43 %); 22.57° 3.94 Å (100 %); 25.32° 3.52 Å (19 %); 27.10° 3.29 Å (12 %); 29.31° 3.05 Å (15 %); 33.48° 2.68 Å (14 %); 43.93° 2.06 Å (11 %); 55.83° 1.65 Å (3 %) (Ver *Apéndice 4*).

## Capítulo 6

**RMN de C-13:** Señal ancha con máximos claramente definidos a **43.7 ppm** y **41.5 ppm**; señal ancha con máximos claramente definidos a **33.1 ppm**, y **27.2 ppm** (Ver *Figura 15*).

### 6.3.1.4. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-TREN

Se prepara una suspensión de 130 mg de la H-Beta-Cd en 7.8 ml de una disolución acuosa de tris(2-aminoetil)amina de concentración 119.95 mM (0.94 mmol de tris(2-aminoetil)amina) y se agita a 20 °C durante 20 horas. Siguiendo el proceso descrito en el apartado **2.1.**, se aísla el sólido blanco resultante.

**FTIR KBr (cm<sup>-1</sup>):** **3451:** f, a,  $\nu$  (O-H); **2960:** m,  $\nu_{as}$  (CH<sub>2</sub>); **2872:** h,  $\nu_s$  (CH<sub>2</sub>); **1631:** m,  $\delta$  (H-O-H); **1538:** d,  $\delta$  (NH<sub>2</sub>); **1469:** d,  $\delta_{as}$  (CH<sub>2</sub>); **1214:** mf, int,  $\nu_{as}$  (TO<sub>4</sub>); **1067:** mf, a, ext,  $\nu_{as}$  (TO<sub>4</sub>); **793:** m, ext,  $\nu_s$  (TO<sub>4</sub>); **557:** f, ext, d-a; **518:** f, ext, d-a; **459:** mf, int,  $\delta$  (O-T-O) (Ver *Figura 17*).

**DRX (Pos. [20] / d / Int.):** **5.11° 17.31 Å** (11 %); **7.92° 11.17 Å** (28 %); **22.40° 3.97 Å** (100 %); **25.33° 3.52 Å** (34 %); **27.09° 3.29 Å** (25 %); **29.66° 3.01 Å** (14 %); **33.59° 2.67 Å** (15 %) (Ver *Apéndice 5*).

**RMN de C-13:** Señal a **53.6 ppm**; señal a **38.2 ppm** (Ver *Figura 18*).

### 6.3.1.5. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH

En 6 ml de agua miliQ y 6 ml de una disolución de PAH en PBS con una concentración de 5 mg/ml ( $2 \cdot 10^{-3}$  mmol de PAH) a pH  $\approx$  6.25, se dispersan 60 mg de la H-Beta-Cd y la suspensión preparada se somete a ultrasonidos durante 30 minutos. El producto resultante es blanco y se aísla siguiendo el procedimiento explicado en el apartado **2.1.**



**FTIR KBr (cm<sup>-1</sup>):** 3460: f, a,  $\nu$  (O-H); 2950: h,  $\nu_{as}$  (CH<sub>2</sub>); 1636: m,  $\delta$  (H-O-H); 1529: d,  $\delta$  (NH<sub>2</sub>); 1460: h,  $\delta_{as}$  (CH<sub>2</sub>); 1224: mf, int,  $\nu_{as}$  (TO<sub>4</sub>); 1072: mf, a, ext,  $\nu_{as}$  (TO<sub>4</sub>); 793: d, ext,  $\nu_s$  (TO<sub>4</sub>); 567: f, ext, d-a; 523: f, ext, d-a; 459: mf, int,  $\delta$  (O-T-O) (Ver *Figura 22*).

**DRX (Pos. [2 $\theta$ ] / d / Int.):** 7.74° 11.42 Å (42 %); 13.33° 6.64 Å (21 %); 22.67° 3.92 Å (100 %); 25.31° 3.52 Å (14 %); 27.12° 3.29 Å (31 %); 31.73° 2.82 Å (7 %); 33.27° 2.69 Å (6 %); 36.66° 2.45 Å (3 %) (Ver *Apéndice 6*).

### **6.3.1.6. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-NAV**

Se prepara una suspensión de 5 mg de la H-Beta-Cd en 150  $\mu$ l de una disolución acuosa de neutravidina (50  $\mu$ l neutravidina y 450  $\mu$ l agua miliQ) con una concentración de 1 mg/ml (2.5x10<sup>-6</sup> mmol de neutravidina) y se agita en un vórtex a temperatura ambiente durante 24 horas, siendo la relación estimada (n° moléculas de NAV) / (n° partículas de la zeolita H-Beta-Cd) de 1.26. El sólido blanco resultante se aísla siguiendo el método descrito en el capítulo 2.1.

**FTIR KBr (cm<sup>-1</sup>):** 3470: f, a,  $\nu$  (O-H); 1636: m,  $\delta$  (H-O-H); 1538: d,  $\delta$  (N-H)  $\nu$  (C-N); 1224: mf, int,  $\nu_{as}$  (TO<sub>4</sub>); 1072: mf, a, ext,  $\nu_{as}$  (TO<sub>4</sub>); 793: d, ext,  $\nu_s$  (TO<sub>4</sub>); 567: f, ext, d-a; 518: f, ext, d-a; 454: mf, int,  $\delta$  (O-T-O) (Ver *Figura 26*).

### **6.3.1.7. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu**

Se suspenden 30 mg del producto H-Beta-Cd-ODA en 3 ml de una disolución acuosa de glutaraldehído de concentración 423.49 mM (1.27 mmol de glutaraldehído) y la suspensión preparada se somete a ultrasonidos durante 5 minutos. La relación estimada (n° moléculas de Glu) / (n° partículas de la zeolita H-Beta-Cd-ODA) fue 10<sup>5</sup>. El sólido resultante ha pasado a tener un color rojo y se aísla siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.1.

## Capítulo 6

**FTIR KBr (cm<sup>-1</sup>):** 3441: m, a,  $\nu$  (O-H); 2931: m,  $\nu_{as}$  (CH<sub>2</sub>); 2862: d,  $\nu_s$  (CH<sub>2</sub>); 1720: md,  $\nu$  (C=O); 1636: d,  $\delta$  (H-O-H); 1460: d,  $\delta_{as}$  (CH<sub>2</sub>); 1224: mf, int,  $\nu_{as}$  (TO<sub>4</sub>); 1072: mf, a, ext,  $\nu_{as}$  (TO<sub>4</sub>); 793: d, ext,  $\nu_s$  (TO<sub>4</sub>); 567: f, ext, d-a; 518: f, ext, d-a; 459: mf, int,  $\delta$  (O-T-O) (Ver *Figura 27*).

### 6.3.1.8. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu-NAV

Se dispersan 5 mg de la H-Beta-Cd-ODA-Glu en 150  $\mu$ l de una disolución acuosa de neutravidina (50  $\mu$ l neutravidina y 450  $\mu$ l agua miliQ) con una concentración de 1 mg/ml (2.5x10<sup>-6</sup> mmol de neutravidina) y la suspensión producida se somete a agitación en un vórtex a temperatura ambiente durante 24 horas, siendo la relación estimada (n<sup>o</sup> moléculas de NAV) / (n<sup>o</sup> partículas de la zeolita H-Beta-Cd-ODA-Glu) de 1.26. El sólido resultante mantiene su color rojo y se aísla siguiendo el método detallado en el capítulo 2.1.

**FTIR KBr (cm<sup>-1</sup>):** 3431: m, a,  $\nu$  (O-H); 2931: m,  $\nu_{as}$  (CH<sub>2</sub>); 2862: d,  $\nu_s$  (CH<sub>2</sub>); 1641: d,  $\delta$  (H-O-H); 1529: md,  $\delta$  (N-H)  $\nu$  (C-N); 1465: md,  $\delta_{as}$  (CH<sub>2</sub>); 1219: mf, int,  $\nu_{as}$  (TO<sub>4</sub>); 1077: mf, a, ext,  $\nu_{as}$  (TO<sub>4</sub>); 793: md, ext,  $\nu_s$  (TO<sub>4</sub>); 567: m, ext, d-a; 518: m, ext, d-a; 459: f, int,  $\delta$  (O-T-O) (Ver *Figura 29*).

### 6.3.1.9. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu

Se dispersan 30 mg de la H-Beta-Cd-PAH en 3 ml de una disolución acuosa de glutaraldehído de concentración 423.49 mM (1.27 mmol de glutaraldehído) y la suspensión elaborada se somete a ultrasonidos durante 5 minutos. La relación estimada (n<sup>o</sup> moléculas de Glu) / (n<sup>o</sup> partículas de la zeolita H-Beta-Cd-PAH) fue 10<sup>5</sup>. El sólido resultante tiene un tono rojo y se aísla siguiendo el método mencionado en la sección 2.1.

**FTIR KBr (cm<sup>-1</sup>): 3451:** m, a,  $\nu$  (O-H); **2950:** md,  $\nu_{as}$  (CH<sub>2</sub>); **1720:** md,  $\nu$  (C=O); **1636:** d,  $\delta$  (H-O-H); **1455:** h,  $\delta_{as}$  (CH<sub>2</sub>); **1224:** mf, int,  $\nu_{as}$  (TO<sub>4</sub>); **1082:** mf, a, ext,  $\nu_{as}$  (TO<sub>4</sub>); **793:** md, ext,  $\nu_s$  (TO<sub>4</sub>); **567:** m, ext, d-a; **518:** m, ext, d-a; **459:** f, int,  $\delta$  (O-T-O); (Ver *Figura 30*).

### **6.3.1.10. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu-NAV**

Se suspenden 5 mg del producto H-Beta-Cd-PAH-Glu en 150  $\mu$ l de una disolución acuosa de neutravidina (50  $\mu$ l neutravidina y 450  $\mu$ l agua miliQ) con una concentración de 1 mg/ml (2.5x10<sup>-6</sup> mmol de neutravidina) y la suspensión producida se somete a agitación en un vórtex a temperatura ambiente durante 24 horas, siendo la relación estimada (n<sup>o</sup> moléculas de NAV) / (n<sup>o</sup> partículas de la zeolita H-Beta-Cd-PAH-Glu) de 1.26. El sólido resultante continúa siendo rojo y se aísla siguiendo el proceso explicado en el capítulo 2.1.

**FTIR KBr (cm<sup>-1</sup>): 3451:** f, a,  $\nu$  (O-H); **2950:** d,  $\nu_{as}$  (CH<sub>2</sub>); **1636:** m,  $\delta$  (H-O-H); **1538:** d,  $\delta$  (N-H)  $\nu$  (C-N); **1455:** d,  $\delta_{as}$  (CH<sub>2</sub>); **1224:** mf, int,  $\nu_{as}$  (TO<sub>4</sub>); **1077:** mf, a, ext,  $\nu_{as}$  (TO<sub>4</sub>); **793:** d, ext,  $\nu_s$  (TO<sub>4</sub>); **567:** f, ext, d-a; **518:** f, ext, d-a; **459:** mf, int,  $\delta$  (O-T-O) (Ver *Figura 32*).

### **6.4. Nanozeolitas funcionalizadas con APTES**

Para todas las reacciones descritas durante este capítulo se han obtenido rendimientos prácticamente cuantitativos.

#### **6.4.1. Derivados de la nanozeolita comercial CP814E**

##### ***6.4.1.1. Preparación de la nanozeolita CP814E-Cd***

Se suspendieron 4 g de la zeolita comercial CP814E en 9.78 g de una disolución acuosa de  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  al 10 % en peso, de concentración 375.21 mM, añadiéndose a continuación 400 g de agua miliQ, y la suspensión obtenida se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El sólido resultante se lavó varias veces con agua destilada y acetona, y se dejó bajo una fuente de calor para eliminar la humedad restante.

Finalmente, para terminar de eliminar impurezas se calcinó el sólido blanco, sometiéndolo a una rampa de calentamiento de 5 °C/min hasta llegar a una temperatura de 150 °C, permaneciendo a esta temperatura durante 1 hora, seguido de otra rampa de calentamiento de 1.5 °C/min hasta alcanzar los 500 °C y manteniendo fija esta temperatura durante 2 horas más para completar el proceso de calcinación.

##### ***6.4.1.2. Preparación de la nanozeolita CP814E-Na***

Se filtraron 5 g de la CP814E, lavando con 400 g de una disolución acuosa de NaCl 1M y el producto se aisló siguiendo el procedimiento detallado en el apartado

##### **6.4.1.1.**

##### ***6.4.1.3. Preparación de la nanozeolita CP814E-Na-Cd***

Se dispersaron 4 g de la muestra CP814E-Na en 9.78 g de una disolución acuosa de  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  al 10 % en peso, de concentración 375.21 mM. Sobre la suspensión preparada se añadió agua miliQ hasta pesar 400 g, y, a continuación, la suspensión

resultante se sometió a agitación constante a temperatura ambiente durante una noche. La zeolita se aisló siguiendo el método descrito en el apartado **6.4.1.1**.

#### **6.4.1.4. Preparación de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2**

Se preparó una suspensión de 3.5 g de la muestra CP814E-Na en 8.55 g de una disolución acuosa de  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  al 10 % en peso, de concentración 375.21 mM. La suspensión anterior se diluyó en 350 g de agua miliQ, y, a continuación, se agitó la suspensión resultante a temperatura ambiente durante una noche. El producto se aisló siguiendo el proceso empleado en el apartado **6.4.1.1**.

#### **6.4.1.5. Preparación de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2-APTES**

En primer lugar, se deshidrataron 2 g de la CP814E-Na-Cd a 200 °C durante 2 horas haciendo vacío. A continuación, se añadieron 0.498 g de APTES y 20 ml de tolueno anhidro sobre el sólido deshidratado y se agitó la suspensión resultante a 85 °C en atmósfera de argón durante una noche. Finalmente, el producto se aisló siguiendo el procedimiento explicado en el apartado **6.4.1.1**, lavando con tolueno y cloroformo.

**FTIR KBr ( $\text{cm}^{-1}$ ):** **3441:** f, a,  $\nu$  (O-H); **2980:** d,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{CH}_2$ ); **2931:** d,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{CH}_2$ ); **1631:** d,  $\delta$  (H-O-H); **1515:** md,  $\delta$  ( $\text{NH}_2$ ); **1450:** md,  $\delta_{\text{as}}$  ( $\text{CH}_2$ ); **1224:** mf, int,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{TO}_4$ ); **1082:** mf, a, ext,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{TO}_4$ ); **793:** m, ext,  $\nu_{\text{s}}$  ( $\text{TO}_4$ ); **616:** m, ext, d-a; **567:** f, ext, d-a; **523:** f, ext, d-a; **459:** mf, int,  $\delta$  (O-T-O) (Véase *Figura 33*).

#### **6.4.1.6. Preparación de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu**

Se suspendieron 200 mg de la CP814E-Na-Cd-APTES en 20 ml de una disolución acuosa de glutaraldehído de concentración 423.49 mM (8.47 mmol de glutaraldehído) y la suspensión preparada se sometió a ultrasonidos durante 5 minutos. La relación estimada de ( $n^\circ$  moléculas de Glu) / ( $n^\circ$  partículas de la zeolita CP814E-Na-Cd2-APTES)

## Capítulo 6

resultó ser  $2.35 \times 10^5$ . El color del sólido cambió a rojo y se aisló siguiendo el método utilizado en el apartado **6.4.1.1**.

**FTIR KBr ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3441:** f, a,  $\nu$  (O-H); **2940:** m,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{CH}_2$ ); **1710:** d,  $\nu$  (C=O); **1631:** m,  $\delta$  (H-O-H); **1455:** h,  $\delta_{\text{as}}$  ( $\text{CH}_2$ ); **1224:** mf, a, int,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{TO}_4$ ); **1077:** mf, a, ext,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{TO}_4$ ); **793:** m, ext,  $\nu_{\text{s}}$  ( $\text{TO}_4$ ); **616:** m, ext, d-a; **572:** f, ext, d-a; **518:** f, ext, d-a; **459:** mf, int,  $\delta$  (O-T-O); (Ver *Figura 36*).

### **6.4.1.7. Preparación de la nanozeolita CP814E-Na-Cd2-APTES-Glu-NAV**

En 150  $\mu\text{l}$  de una disolución acuosa de neutravidina (50  $\mu\text{l}$  neutravidina y 450  $\mu\text{l}$  agua miliQ) con una concentración de 1 mg/ml ( $2.5 \times 10^{-6}$  mmol de neutravidina) se dispersaron 5 mg del sólido CP814E-Na-Cd-APTES-Glu agitando en un vórtex a Temperatura ambiente durante 6 horas, siendo la relación estimada ( $n^\circ$  moléculas de NAV) / ( $n^\circ$  partículas de la zeolita CP814E-Na-Cd-APTES-Glu) de 2.7. El color rojo del sólido no varió y se aisló siguiendo el proceso detallado utilizado en el capítulo **2.1**.

**FTIR KBr ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3431:** f, a,  $\nu$  (O-H); **2950:** m,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{CH}_2$ ); **2931:** h,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{CH}_2$ ); **2872:** h,  $\nu_{\text{s}}$  ( $\text{CH}_2$ ); **1651:** d,  $\delta$  (H-O-H); **1528:** md,  $\delta$  (N-H)  $\nu$  (C-N); **1455:** md,  $\delta_{\text{as}}$  ( $\text{CH}_2$ ); **1224:** mf, int,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{TO}_4$ ); **1082:** mf, a, int ext,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{TO}_4$ ); **793:** md, ext,  $\nu_{\text{s}}$  ( $\text{TO}_4$ ); **616:** md, ext, d-a; **572:** m, ext, d-a; **523:** m, ext, d-a; **459:** f, int,  $\delta$  (O-T-O) (Ver *Figura 37*).

## **6.4.2. Derivados de la nanozeolita H-Beta**

### **6.4.2.1. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Na**

Se filtró 1 g de la H-Beta, lavando con 400 g de una disolución acuosa de NaCl 1M y el producto final se aisló siguiendo el procedimiento empleado en el apartado **6.4.1.1**.

**6.4.2.2. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd**

Se suspendieron 976 mg de la muestra H-Beta-Na en 1.51 g de una disolución acuosa de  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  al 10 % en peso, de concentración 375.21 mM, añadiéndose a continuación 98 g de agua miliQ, y la suspensión obtenida se sometió a agitación constante a temperatura ambiente durante una noche. El producto final se aisló siguiendo el método explicado en el apartado **6.4.1.1.**

**6.4.2.3. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2**

Se dispersaron 879 mg de la muestra H-Beta-Na-Cd en 1.37 g de una disolución acuosa de  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  al 10 % en peso, de concentración 375.21 mM. Sobre la suspensión preparada se añadieron dos 88 g de agua miliQ, y a continuación, se agitó la suspensión resultante a temperatura ambiente durante una noche. Siguiendo el proceso utilizado en el apartado **6.4.1.1.** se aisló el sólido resultante.

**6.4.2.4. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES**

En primer lugar, se deshidrataron 792.1 mg de la H-Beta-Na-Cd2 a 200 °C durante 2 horas haciendo vacío. A continuación, se añadieron 0.360 g de APTES y 8 ml de tolueno anhidro sobre el sólido deshidratado y la suspensión resultante se sometió a agitación a 85 °C en atmósfera de argón durante una noche. Finalmente, el producto se aisló siguiendo el procedimiento detallado en el apartado **6.4.1.1.**, lavando con tolueno y cloroformo.

**6.4.2.5. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu**

Se suspendieron 200 mg de la H-Beta-Na-Cd2-APTES en 20 ml de una disolución acuosa de glutaraldehído de concentración 423.49 mM (8.47 mmol de glutaraldehído) y la suspensión preparada se sometió a ultrasonidos durante 5 minutos. La relación estimada de (n° moléculas de Glu) / (n° partículas de la zeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES)

## Capítulo 6

resultó ser  $2.5 \times 10^5$ . El color del sólido resultante cambió a rojo y se aisló siguiendo el método descrito en el apartado **6.4.1.1**.

**FTIR KBr ( $\text{cm}^{-1}$ ):** **3441:** f, a,  $\nu$  (O-H); **2950:** m,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{CH}_2$ ); **1720:** d,  $\nu$  (C=O); **1636:** d,  $\delta$  (H-O-H); **1455:** d,  $\delta_{\text{as}}$  ( $\text{CH}_2$ ); **1224:** mf, int,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{TO}_4$ ); **1082:** mf, a, ext,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{TO}_4$ ); **797:** d, ext,  $\nu_{\text{s}}$  ( $\text{TO}_4$ ); **567:** m, ext, d-a; **518:** m, ext, d-a; **459:** f, int,  $\delta$  (O-T-O) (Ver *Figura 40*).

### **6.4.2.6. Preparación de la nanozeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu-NAV**

En 150  $\mu\text{l}$  de una disolución acuosa de neutravidina (50  $\mu\text{l}$  neutravidina y 450  $\mu\text{l}$  agua miliQ) con una concentración de 1 mg/ml ( $2.5 \times 10^{-6}$  mmol de neutravidina) se dispersaron 5 mg del sólido H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu agitando en un vórtex a temperatura ambiente durante 6 horas, siendo la relación estimada ( $n^\circ$  moléculas de NAV) / ( $n^\circ$  partículas de la zeolita H-Beta-Na-Cd2-APTES-Glu) de 2.4. Siguiendo el método explicado en el capítulo **2.1.**, se aisló el sólido rojo resultante.

**FTIR KBr ( $\text{cm}^{-1}$ ):** **3431:** f, a,  $\nu$  (O-H); **2950:** m,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{CH}_2$ ); **1646:** m,  $\delta$  (H-O-H); **1538:** d,  $\delta$  (N-H)  $\nu$  (C-N); **1455:** d,  $\delta_{\text{as}}$  ( $\text{CH}_2$ ); **1219:** mf, int,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{TO}_4$ ); **1082:** mf, a, ext,  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{TO}_4$ ); **793:** md, ext,  $\nu_{\text{s}}$  ( $\text{TO}_4$ ); **567:** m, ext, d-a; **518:** m, ext, d-a; **459:** f, int,  $\delta$  (O-T-O); (Ver *Figura 41*).



## **6.5. Nanozeolitas con cobre en su estructura preparadas por síntesis directa**

Para todas las reacciones descritas durante este capítulo se han obtenido rendimientos prácticamente cuantitativos.

### **6.5.1. Derivados de las nanozeolitas CuBeta**

#### ***6.5.1.1. Preparación de la nanozeolita CuBeta\_23***

La síntesis del material CuBeta\_23 ha sido llevada a cabo por el grupo de investigación del Dr. M. Moliner Marín (ITQ-UPV).

**FTIR KBr (cm<sup>-1</sup>):** 3451: f, a, v (O-H); 1631: m, δ (H-O-H); 1229: mf, int, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); 1082: mf, a, ext, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); 788: d, ext, v<sub>s</sub> (TO<sub>4</sub>); 621: m, ext, d-a; 572: f, ext, d-a; 523: f, ext, d-a; 459: mf, int, δ (O-T-O); 429 mf, int, δ (O-T-O) (Ver *Figura 60*).

#### ***6.5.1.2. Preparación de la nanozeolita CuBeta\_23-PAH***

Se dispersan 40 mg de la CuBeta\_23 en 4 ml de agua miliQ y 4 ml de una disolución de PAH en PBS con una concentración de 5 mg/ml ( $1 \cdot 10^{-3}$  mmol de PAH) a pH ≈ 6.19 y la suspensión resultante se somete a ultrasonidos durante 30 minutos. Se aísla el producto resultante siguiendo el proceso descrito en el apartado 2.1.

**FTIR KBr (cm<sup>-1</sup>):** 3470: f, a, v (O-H); 1636: d, δ (H-O-H); 1509: h, δ (NH<sub>2</sub>); 1224: mf, int, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); 1082: mf, a, ext, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); 793: md, ext, v<sub>s</sub> (TO<sub>4</sub>); 621: h, ext, d-a; 562: m, ext, d-a; 523: m, ext, d-a; 449: mf, int, δ (O-T-O) (Ver *Figura 61*).

#### ***6.5.1.3. Preparación de la nanozeolita CuBeta\_23-APTES***

El compuesto CuBeta\_23-APTES ha sido preparado por el grupo de investigación del Dr. M. Moliner Marín (ITQ-UPV).

## Capítulo 6

**FTIR KBr (cm<sup>-1</sup>):** 3460: f, a, v (O-H); 2980: d, v<sub>as</sub> (CH<sub>2</sub>); 2931: d, v<sub>as</sub> (CH<sub>2</sub>); 1626: m, δ (H-O-H); 1514: d, δ (NH<sub>2</sub>); 1455: d, δ<sub>as</sub> (CH<sub>2</sub>); 1219: mf, a, int, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); 1077: mf, a, ext, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); 788: m, ext, v<sub>s</sub> (TO<sub>4</sub>); 709: h, int, v<sub>s</sub> (TO<sub>4</sub>); 567: f, ext, d-a; 523: f, ext, d-a; 459: mf, int, δ (O-T-O) (Ver *Figura 62*).

### 6.5.1.4. Preparación de la nanozeolita CuBeta\_23-PAH-Glu

Se prepara una suspensión de 20 mg de la CuBeta\_23-PAH en 2 ml de una disolución acuosa de glutaraldehído de concentración 423.49 mM (0.85 mmol de glutaraldehído) y la suspensión producida se somete a ultrasonidos durante 5 minutos. La relación estimada de (n° moléculas de Glu) / (n° partículas de la zeolita CuBeta\_23-PAH) resultó ser 4x10<sup>5</sup>. El sólido resultante ha pasado a tener un color rojo y se aísla siguiendo el procedimiento detallado en el capítulo 2.1.

**FTIR KBr (cm<sup>-1</sup>):** 3451: f, a, v (O-H); 2960: h, v<sub>as</sub> (CH<sub>2</sub>); 1720: md, v (C=O); 1631: d, δ (H-O-H); 1455: h, δ<sub>as</sub> (CH<sub>2</sub>); 1224: mf, int, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); 1082: mf, a, ext, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); 793: d, ext, v<sub>s</sub> (TO<sub>4</sub>); 621: m, ext, d-a; 567: f, ext, d-a; 523: f, ext, d-a; 459: mf, int, δ (O-T-O); (Ver *Figura 63*).

### 6.5.1.5. Preparación de la nanozeolita CuBeta\_23-APTES-Glu

Se suspenden 40 mg de la CuBeta\_23-APTES en 4 ml de una disolución acuosa de glutaraldehído de concentración 423.49 mM (1.69 mmol de glutaraldehído) y la suspensión preparada se somete a ultrasonidos durante 5 minutos. La relación estimada de (n° moléculas de Glu) / (n° partículas de la zeolita CuBeta\_23-APTES) resultó ser 4x10<sup>5</sup>. El sólido resultante ha pasado a tener un color rojo y se aísla siguiendo el método explicado en el apartado 2.1.

**FTIR KBr (cm<sup>-1</sup>): 3451:** f, a, v (O-H); **2970:** d, v<sub>as</sub> (CH<sub>2</sub>); **2940:** d, v<sub>as</sub> (CH<sub>2</sub>); **1710:** h, v (C=O); **1631:** m, δ (H-O-H); **1455:** d, δ<sub>as</sub> (CH<sub>2</sub>); **1224:** mf, int, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); **1077:** mf, a, ext, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); **788:** m, ext, v<sub>s</sub> (TO<sub>4</sub>); **616:** h, ext, d-a; **567:** f, ext, d-a; **523:** f, ext, d-a; **459:** mf, int, δ (O-T-O); **420** h, int, δ (O-T-O) (Ver *Figura 64*).

#### **6.5.1.6. Preparación de la nanozeolita CuBeta\_23-APTES-Glu-NAV**

Se dispersan 5 mg de la CuBeta\_23-APTES-Glu en 150 μl de una disolución acuosa de neutravidina con una concentración de 1 mg/ml (2.5x10<sup>-6</sup> mmol de neutravidina), agitando la suspensión resultante en un vórtex a temperatura ambiente durante 24 horas. La relación estimada de (n° moléculas de NAV) / (n° partículas de la zeolita CuBeta\_23-APTES-Glu) fue 4.70. La zeolita se aisló siguiendo el método empleado en el apartado **2.1**.

**FTIR KBr (cm<sup>-1</sup>): 3435:** m, a, v (O-H); **2960:** d, v<sub>as</sub> (CH<sub>2</sub>); **1636:** d, δ (H-O-H); **1528:** md, δ (N-H) v (C-N); **1450:** md, δ<sub>as</sub> (CH<sub>2</sub>); **1221:** mf, int, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); **1079:** mf, a, ext, v<sub>as</sub> (TO<sub>4</sub>); **796:** d, ext, v<sub>s</sub> (TO<sub>4</sub>); **564:** m, ext, d-a; **524:** m, ext, d-a; **449:** f, int, δ (O-T-O) (Ver *Figura 67*).



# 7

---

## *Conclusiones*



1. Se lograron cargar iones  $\text{Cd}^{2+}$  en la nanozeolita H-Beta (usando disoluciones acuosas de acetato de cadmio (II)).
2. Se logró funcionalizar la zeolita cargada con cadmio (II) con distintas aminas (OA) y poliaminas (ODA, TREN, PAH), y se caracterizaron las especies resultantes.
3. Estas poliaminas permitieron, a su vez, unir la neutravidina a las nanozeolitas formando sistemas NZ ( $\text{M}^{n+}$ ) – NAV, bien directamente o bien a través del glutaraldehído.
4. Las medidas de afinidad con estas primeras zeolitas resultaron infructuosas (valores aleatorios y, en general, nulos) debido a la tendencia de las nanozeolitas a agregarse.
5. Se logró introducir concentraciones más altas de Cd (II) en el interior de la zeolita H-Beta, y su posterior funcionalización con grupos amino por reacción con (3-aminopropil)triétoxosilano, APTES, siendo anclado sobre su superficie a través de uno, dos o tres puentes Si-O-Si, utilizando procedimientos previamente ensayados con la zeolita nanobeta comercial CP814E.
6. Las nuevas zeolitas funcionalizadas con APTES se lograron bioconjugarse satisfactoriamente con NAV a través de puentes con glutaraldehído. No obstante, persiste la tendencia de las nanopartículas a agregarse y las reacciones de afinidad resultaron negativas.
7. Se logró la síntesis de nuevas zeolitas Beta, denominadas CuBeta, con el metal introducido durante el proceso de síntesis.
8. Se escogió la CuBeta\_23 para ser funcionalizada con APTES o PAH, lográndose una mayor y mejor distribución de los cationes metálicos. No obstante, las zeolitas

## **Capítulo 7**

CuBeta\_23-PAH-Glu y CuBeta\_23-APTES-Glu continúan presentando tendencia a la agregación.

9. Se lograron preparar suspensiones estables de la CuBeta\_23-APTES-Glu-NAV en agarosa que han dado medidas positivas de afinidad.







# Bibliografía

---

- [1] Daniel Martín-Yerga, Javier Carrasco-Rodríguez, María Begoña González-García, Francisco Javier García Alonso, and Agustín Costa-García, «Determination of Silver-Modified Titanium Phosphate Nanoparticles by Voltammetric and Electrocatalytic Methods,» *Electroanalysis*, vol. 26, nº 12, pp. 2574-2579, 2014.
- [2] Daniel Martín-Yerga, Javier Carrasco-Rodríguez, José Luis G. Fierro, Francisco Javier García Alonso and Agustín Costa-García, «Copper-modified titanium phosphate nanoparticles as electrocatalyst for glucose detection,» *Electrochimica Acta*, vol. 229, pp. 102-111, 2017.
- [3] Javier Carrasco-Rodríguez; Daniel Martín-Yerga; Leoncio Garrido; Agustín Costa-García and Francisco J. García Alonso, «Sequential incorporation of metallic cations ( $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$ ) and N-octylamine into titanium phosphate nanoparticles and their subsequent release in acid media,» *Dalton Transactions*, vol. 46, nº 21, pp. 7061-7073, 2017.
- [4] Daniel Martín-Yerga, Javier Carrasco-Rodríguez, Francisco J. García Alonso and Agustín Costa-García, «Competitive electrochemical biosensing of biotin using cadmium-modified titanium phosphate nanoparticles and 8-channel screen-printed disposable electrodes,» *Analytical Methods*, vol. 9, nº 26, pp. 3983-3991, 2017.
- [5] Javier Carrasco-Rodríguez, Francisco J. García Alonso, Agustín Costa-García and Daniel Martín-Yerga, «Tuning the incorporation of electroactive metals into titanium phosphate nanoparticles and the reverse metal extraction process: Application as electrochemical labels in multiplex biosensing,» *Electrochemistry Communications*, vol. 83, pp. 1-5, 2017.
- [6] Michiel Dusselier and Mark E. Davis, «Small-Pore Zeolites: Synthesis and Catalysis,» *Chem. Rev.*, vol. 118, pp. 5265-5329, 2018.
- [7] Chengeng Li, Manuel Moliner and Avelino Corma, «Building Zeolites from Precrystallized Units: Nanoscale Architecture,» *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 57, pp. 15330-15353, 2018.
- [8] Nima Masoumifard, Rémy Guillet-Nicolas and Freddy Kleitz, «Synthesis of Engineered Zeolitic Materials: From Classical Zeolites to Hierarchical Core-Shell Materials,» *Adv. Mater.*, vol. 30, pp. 1704439 (1-40), 2018.

- [9] Esmat Koohsaryan and Mansoor Anbia, «Nanosized and hierarchical zeolites: A short review,» *Chinese Journal of Catalysis*, vol. 37, pp. 447-467, 2016.
- [10] Paul A. Wright and Magdalena Lozinska, «Chapter 1: Structural Chemistry and Properties of Zeolites,» de *Zeolites and ordered porous solids: fundamentals and applications*, Valencia, 2011, pp. 1-36.
- [11] Lucie Bacakova, Marta Vandrovцова, Ivana Kopova and Ivan Jirka, «Applications of zeolites in biotechnology and medicine – a review,» *Biomaterials Science*, vol. 6, n° 5, pp. 974-989, 2018.
- [12] Mercedes Boronat and Avelino Corma, «What Is Measured When Measuring Acidity in Zeolites with Probe Molecules?,» *ACS Catal.*, vol. 9, pp. 1539-1548, 2019.
- [13] Walter Loewenstein, «THE DISTRIBUTION OF ALUMINUM IN THE TETRAHEDRA OF SILICATES AND ALUMINATES,» *American Mineralogist*, vol. 39, n° 1-2, pp. 92-96, 1954.
- [14] Mark E. Davis, «Ordered porous materials for emerging applications,» *Nature*, vol. 417, pp. 813-821, 2002.
- [15] Mark E. Davis and Raul F. Lobo, «Zeolite and Molecular Sieve Synthesis,» *Chem. Mater.*, vol. 4, pp. 756-768, 1992.
- [16] Lesley Smart and Elaine Moore, «Zeolites and related structures,» de *Solid State Chemistry*, Chapman & Hall, 1995, pp. 238-272.
- [17] Manuel Moliner, Cristina Martínez and Avelino Corma, «Multipore Zeolites: Synthesis and Catalytic Applications,» *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 54, n° 12, pp. 3560-3579, 2015.
- [18] «<http://www.iza-structure.org>,» 3 December 2018. [En línea]. Available: [http://www.iza-structure.org/IZA-SC\\_FTC.htm](http://www.iza-structure.org/IZA-SC_FTC.htm). [Último acceso: 22 January 2019].
- [19] Ch. Baerlocher, L.B. McCusker and D.H. Olson, *Atlas of Zeolite Framework Types*, Elsevier, 2007.
- [20] Svetlana Mintova, Julien Grand and Valentin Valtchev, «Nanosized zeolites: Quo Vadis?,» *C. R. Chimie*, vol. 19, pp. 183-191, 2016.
- [21] Valentin Valtchev and Lubomira Tosheva, «Porous Nanosized Particles: Preparation, Properties, and Applications,» *Chemical Reviews*, vol. 113, p. 6734-6760, 2013.

- [22] Jiri Dědeček, Edyta Tabor and Stepan Sklenak, «Tuning the Aluminum Distribution in Zeolites to Increase their Performance in Acid-Catalyzed Reactions,» *ChemSusChem*, vol. 12, pp. 556-576, 2019.
- [23] A. Corma, «Inorganic Solid Acids and Their Use in Acid-Catalyzed Hydrocarbon Reactions,» *Chem. Rev.*, vol. 95, n° 3, pp. 559-614, 1995.
- [24] Ana Primo and Hermenegildo Garcia, «Zeolites as catalysts in oil refining,» *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, n° 22, p. 7548–7561, 2014.
- [25] E. T. C. Vogt and B. M. Weckhuysen, «Fluid catalytic cracking: recent developments on the grand old lady of zeolite catalysis,» *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, n° 20, pp. 7342-7370, 2015.
- [26] A. M. Beale, F. Gao, I. Lezcano-Gonzalez, C. H. F. Peden and J. Szanyi, «Recent advances in automotive catalysis for NO<sub>x</sub> emission control by small-pore microporous materials,» *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, n° 20, pp. 7371-7405, 2015.
- [27] Sounak Roy, M.S. Hegde and Giridhar Madras, «Catalysis for NO<sub>x</sub> abatement,» *Applied Energy*, vol. 86, n° 11, pp. 2283-2297, 2009.
- [28] W. P. Shan and H. Song, *Catal. Sci. Technol.*, vol. 5, pp. 4280-4288, 2015.
- [29] P. Bhanja and A. Bhaumik, «Porous Nanomaterials as Green Catalyst for the Conversion of Biomass to Bioenergy,» *Fuel*, vol. 185, pp. 432-441, 2016.
- [30] Ennaert T, Van Aelst J, Dijkmans J, De Clercq R, Schutyser W, Dusselier M, Verboekend D and Sels BF, «Potential and challenges of zeolite chemistry in the catalytic conversion of biomass,» *Chem. Soc. Rev.*, vol. 45, n° 3, pp. 584-611, 2016.
- [31] Thomas J Schwartz, Brandon J O'Neill, Brent H Shanks and James A Dumesic, «Bridging the chemical and biological catalysis gap: challenges and outlooks for producing sustainable chemicals,» *ACS Catal.*, vol. 4, n° 6, pp. 2060-2069, 2014.
- [32] Z. F. Bian, S. Das, M. H. Wai, P. Hongmanorom and S. Kawi, «A review on bimetallic Ni-based catalysts for CO<sub>2</sub> reforming of methane,» *ChemPhysChem*, vol. 18, n° 22, pp. 3117-3134, 2017.
- [33] Enrico Catizzone, Giuseppe Bonura, Massimo Migliori, Francesco Frusteri and Girolamo Giordano, «CO<sub>2</sub> Recycling to Dimethyl Ether: State-of-the-Art and Perspectives,» *Molecules*, vol. 23, n° 1, p. 31, 2018.

- [34] Narsimhan K, Iyoki K, Dinh K and Román-Leshkov Y, «Catalytic Oxidation of Methane into Methanol over Copper-Exchanged Zeolites with Oxygen at Low Temperature,» *ACS Cent. Sci.*, vol. 2, nº 6, pp. 424-429, 2016.
- [35] Ravi M, Ranocchiaro M and van Bokhoven JA, «The Direct Catalytic Oxidation of Methane to Methanol-A Critical Assessment,» *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 56, nº 52, pp. 16464-16483, 2017.
- [36] Snyder BER, Bols ML, Schoonheydt RA, Sels BF and Solomon EI, «Iron and Copper Active Sites in Zeolites and Their Correlation to Metalloenzymes,» *Chem. Rev.*, vol. 118, nº 5, pp. 2718-2768, 2018.
- [37] Z. Zakaria and Siti Kartom Kamarudin, «Direct conversion technologies of methane to methanol: An overview,» *Renewable and Sustainable Energy Rev.*, vol. 65, pp. 250-261, 2016.
- [38] Alain Walcarius, «Electroanalytical Applications of Microporous Zeolites and Mesoporous (Organo)Silicas: Recent Trends,» *Electroanalysis*, vol. 20, pp. 711-738, 2008.
- [39] Berna Ozansoy Kasap, Svitlana V. Marchenko, Oleksandr O. Soldatkin, Sergei V. Dzyadevych and Burcu Akata Kurc, «Biosensors Based on Nano-Gold/Zeolite-Modified Ion Selective Field-Effect Transistors for Creatinine Detection,» *Nanoscale Research Letters*, vol. 12, p. 162, 2017.
- [40] Daniel R. Thévenot, Klara Toth, Richard A. Durst and George S. Wilson, «Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification,» *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 16, p. 121-131, 2001.
- [41] Daniel Martín Yerga, «1.2. Sensores y biosensores electroquímicos,» de *Tesis Doctoral: Aplicaciones electroanalíticas de Quantum dots y nanopartículas de fosfato de titanio*, Oviedo, 2016, pp. 18-47.
- [42] William Putzbach and Niina J. Ronkainen, «Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review,» *Sensors*, vol. 13, pp. 4811-4840, 2013.
- [43] Nur Royhaila Mohamada, Nur Haziqah Che Marzukia, Nor Aziah Buanga, Fahrul Huyopb and Roswanira Abdul Wahab, «An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes,» *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, vol. 29, nº 2, pp. 1-16, 2015.
- [44] Raquel Martínez-Franco, Cecilia Paris, Marta E. Martínez-Armero, Cristina Martínez, Manuel Moliner and Avelino Corma, «High-silica nanocrystalline

- Beta zeolites: efficient synthesis and catalytic application,» *Chem. Sci.*, vol. 7, n° 1, pp. 102-108, 2016.
- [45] M. A. Cambor, A. Corma and S. Valencia, «Characterization of nanocrystalline zeolite Beta,» *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 25, n° 1-3, pp. 59-74, 1998.
- [46] Eva M. Gallego, Cecilia Paris, M. Rocío Díaz-Rey, Marta E. Martínez-Armero, Joaquín Martínez-Triguero, Cristina Martínez, Manuel Moliner and Avelino Corma, «Simple organic structure directing agents for synthesizing nanocrystalline zeolites,» *Chem. Sci.*, vol. 8, n° 12, pp. 8138-8149, 2017.
- [47] Fuping Tian, Yihui Wu, Qicheng Shen, Xiang Li, Yongying Chen and Changgong Meng, «Effect of Si/Al ratio on mesopore formation for zeolite beta via NaOH treatment and the catalytic performance in  $\alpha$ -pinene isomerization and benzoylation of naphthalene,» *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 173, p. 129–138, 2013.
- [48] A. J. M. de Man and R. A. van Santen, «The relation between zeolite framework structure and vibrational spectra,» *Zeolites*, vol. 12, n° 3, pp. 269-279, 1992.
- [49] F. Burriel Martí, F. Lucena Conde, S. Arribas Jimeno, J. Hernández Méndez, Química Analítica Cualitativa, Thomson Paraninfo, S.A., 2002, pp. 484-494.
- [50] Martin Badertscher, Philippe Bühlmann and Ernö Pretsch, *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*, Springer, 2009.
- [51] Chiou-Ling Chang, Man-kit Leunga and Mei-Hui Yang, «Alkyl and dialkylammonium tetrafluoroborate catalyzed cis–trans isomerization of 1,3,5-trimethyl-1,3,5-triphenylcyclotrisiloxane,» *Tetrahedron*, vol. 60, pp. 9205-9212, 2004.
- [52] William H. Dawson, Steve W. Kaiser, Paul D. Ellis and Ruth R. Inners, «Carbon-13 cross-polarization magic-angle-spinning NMR study of butylamine adsorbed on  $\gamma$ -alumina: characterization of surface acid sites,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 103, n° 22, p. 6780–6781, 1981.
- [53] Deborah C. Bebout, David E. Ehmman, Jonathan C. Trinidad, Kathleen K. Crahan, Margaret E. Kastner and Damon A. Parrish, «Preparation of Mercury(II) Complexes of Tris[(2-pyridyl)methyl]amine and Characterization by X-ray Crystallography and NMR Spectroscopy,» *Inorg. Chem.*, vol. 36, n° 19, p. 4257–4264, 1997.

- [54] Herbert Schumann, Silke Freitag, Frank Girgsdies, Holger Hemling and Gabriele Kociok-Köhn, «Homoleptic Organometallic Compounds of Zinc, Cadmium, and Mercury, Intramolecularly Stabilized by Amine Ligands,» *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2, pp. 245-252, 1998.
- [55] V. Meza-Laguna, E. V. Basiuk (Golovataya-Dzhymbeeva), E. Alvarez-Zauco, D. Acosta-Najarro and V. A. Basiuk, «Cross-Linking of C<sub>60</sub> Films with 1,8-Diaminooctane and Further Decoration with Silver Nanoparticles,» *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 7, p. 3563–3571, 2007.
- [56] Mazdak Khajehpour, Jennifer L. Dashnau and Jane M. Vanderkooi, «Infrared spectroscopy used to evaluate glycosylation of proteins,» de *Analytical Biochemistry*, 1 ed., vol. 348, 2006, pp. 40-48.
- [57] C.-M. Pradier, M. Salmain, Z. Liu and C. Méthivier, «Comparison of different procedures of biotin immobilization on gold for the molecular recognition of avidin: an FT-IRRAS study,» de *Surface and Interface Analysis*, 1 ed., vol. 34, 2002, pp. 67-71.
- [58] Barbara H. Stuart, de *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 1 ed., Wiley, 2004, p. 244.
- [59] İsmet Kaya and Seçil Uysal, «Synthesis and characterization of imine polymers containing aliphatic and aromatic groups and some of Schiff base-metal complexes,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 120, pp. 3325-3336, 2011.
- [60] Saulo de Tarso Figueiredo Grecco, Diego Rodrigues de Carvalho, Cássio Henrique Zandonai, Nádia Regina Camargo Fernandes-Machado, Luciano Morais Lião, Ernesto Antonio Urquieta-González and Maria do Carmo Rangel, «Catalytic cracking of crude soybean oil on Beta nanozeolites,» *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, vol. 422, pp. 89-102, 2016.
- [61] Yuriy Román-Leshkov, Manuel Moliner and Mark E. Davis, «Hybrid Organic–Inorganic Solids That Show Shape Selectivity,» *Chem. Mater.*, vol. 22, n° 8, pp. 2646-2652, 2010.
- [62] Raquel Martínez-Franco, Manuel Moliner, Cristina Franch, Arkady Kustov and Avelino Corma, «Rational direct synthesis methodology of very active and hydrothermally stable Cu-SAPO-34 molecular sieves for the SCR of NO<sub>x</sub>,» *Appl. Catal. B.*, vol. 127, pp. 273-280, 2012.

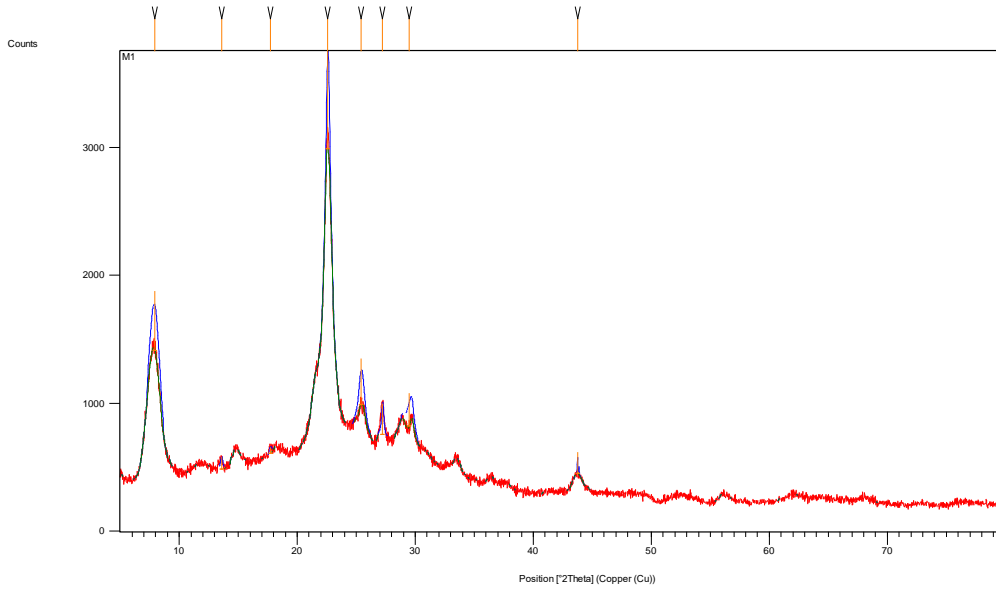


- [63] Nuria Martín, Cristian R. Boruntea, Manuel Moliner and Avelino Corma, «Efficient synthesis of the Cu-SSZ-39 catalyst for DeNO<sub>x</sub> applications,» *Chem. Commun.*, vol. 51, n° 55, pp. 11030-11033, 2015.
- [64] Nohyun Lee, Yoonseok Choi, Youjin Lee, Mihyun Park, Woo Kyung Moon, Seung Hong Choi and Taeghwan Hyeon, «Water-Dispersible Ferrimagnetic Iron Oxide Nanocubes with Extremely High  $r_2$  Relaxivity for Highly Sensitive in Vivo MRI of Tumors,» *Nano Lett.*, vol. 12, n° 6, pp. 3127-3131, 2012.

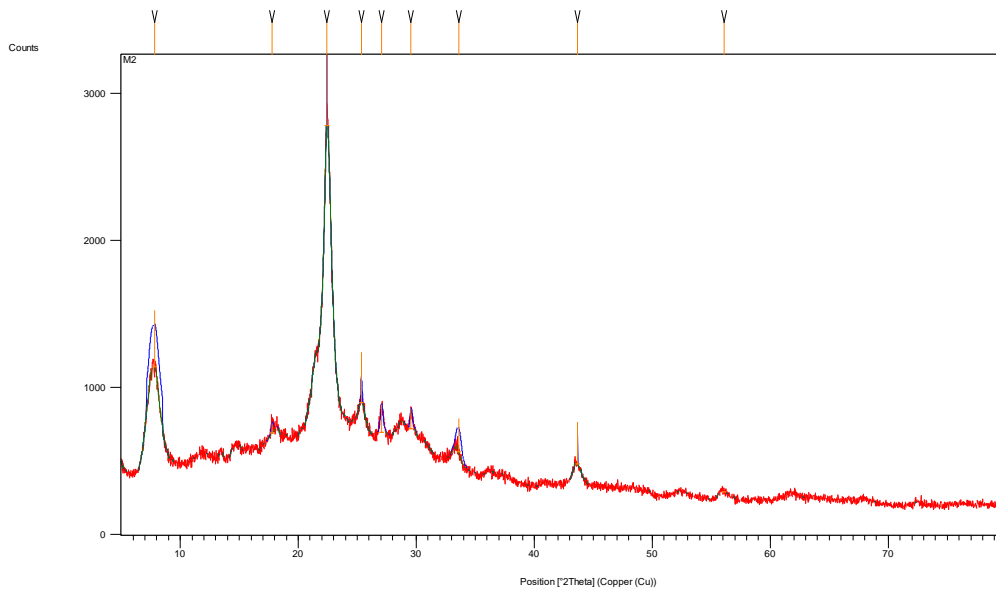


# Apéndice

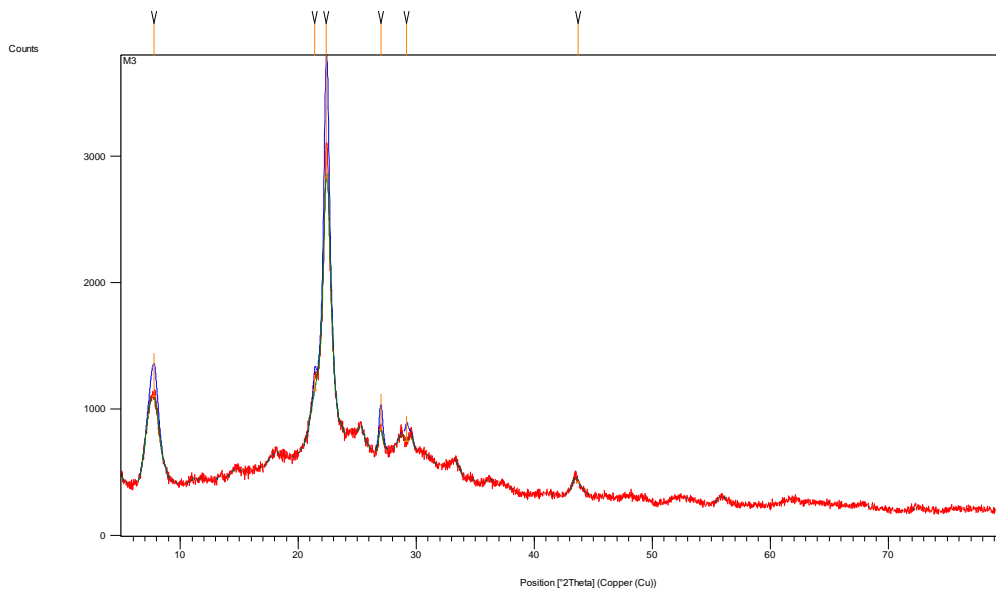
---



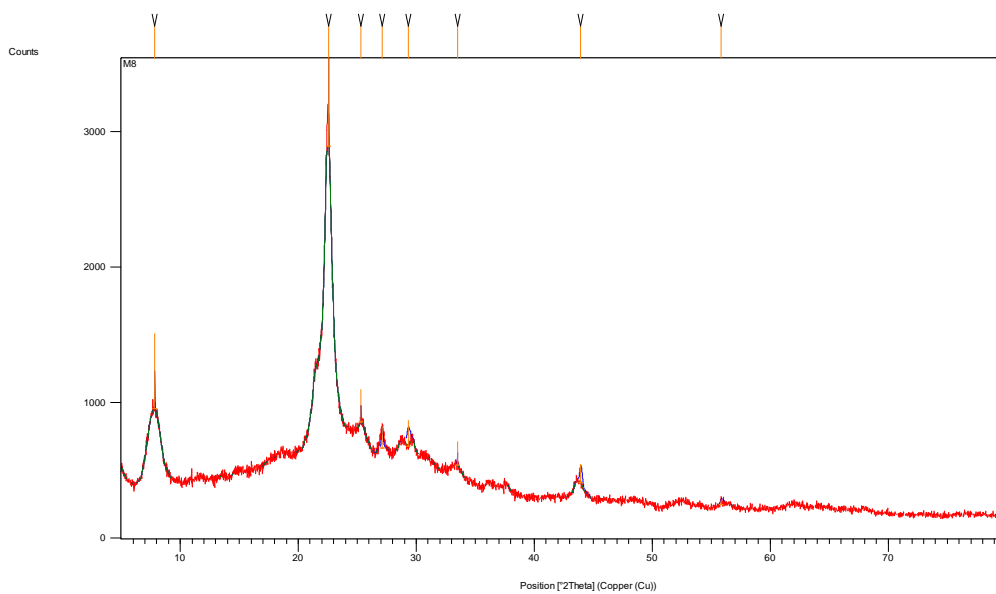
*Apéndice 1. Difractograma de rayos X de la nanozeolita H-Beta.*



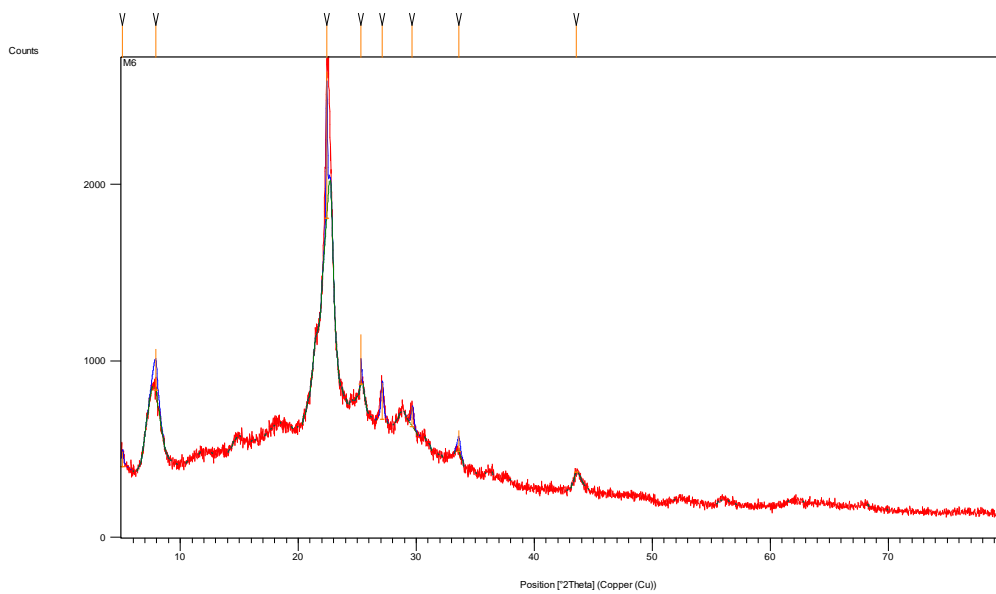
*Apéndice 2. Difractograma de rayos X de la nanozeolita H-Beta-Cd.*



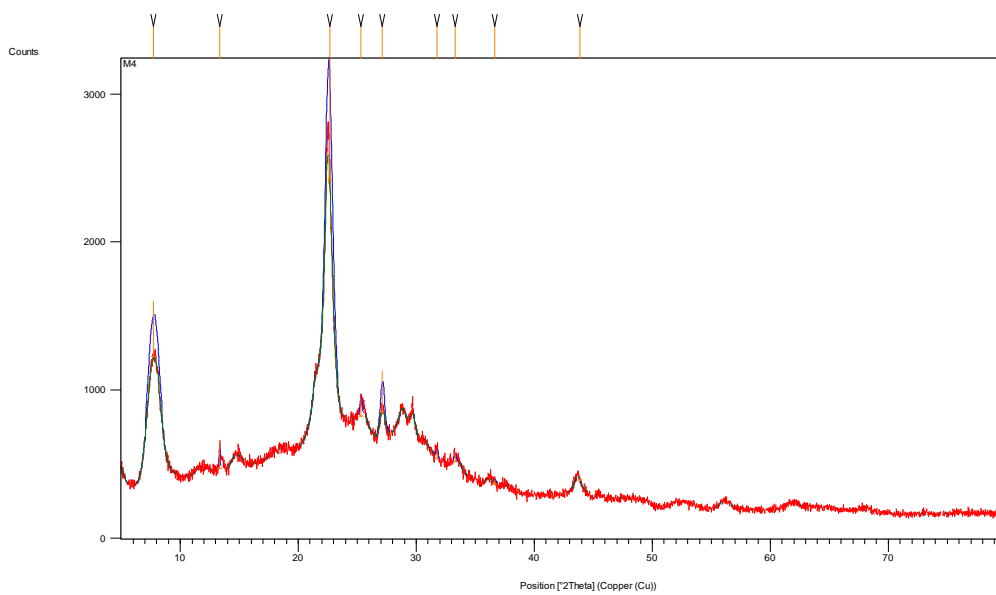
*Apéndice 3. Difractograma de rayos X de la nanozeolita H-Beta-Cd-OA.*



*Apéndice 4. Difractograma de rayos X de la nanozeolita H-Beta-Cd-ODA.*



Apéndice 5. Difractograma de rayos X de la nanozeolita H-Beta-Cd-TREN.



Apéndice 6. Difractograma de rayos X de la nanozeolita H-Beta-Cd-PAH.