

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE CIENCIAS FISICAS

UNIDAD DE POSGRADO

**“Funcionalización de nanomateriales magnéticos de  
óxido de hierro con aplicaciones en biosensores y  
regeneración de tejidos óseos”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magister en Física con mención en  
Física del Estado Sólido

AUTOR

Juan Adrián Ramos Guivar

ASESOR

Angel G. Bustamante Domínguez

Lima – Perú

2015

## Jurado Examinador

<b>Presidente</b>	Dr. Pablo Héctor Rivera Riofano.
<b>Miembro</b>	Dr. Juan Carlos González González.
<b>Miembro</b>	Dr. Julio Santiago Contreras
<b>Miembro</b>	Dr. Wiliam Trujillo Herrera
<b>Suplente</b>	Mg. Jesús Flores Santibáñez
<b>Asesor</b>	Dr. Ángel Bustamante Domínguez.

*Gracias mamá por siempre  
estar a mi lado.  
Te amo!*

*Dejen que el futuro muestre la verdad y juzgue a cada uno. El presente es de ellos. El futuro por el cual estoy verdaderamente trabajando, es mío.*

Nikola Tesla

## Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios y a mis padres Nely y Moisés por haberme dado la vida, estudios y el amor con el cual cultivaron tantos valores buenos en mi persona.

Muestro mi gratitud a mi hermana Stephanie a quien considero mucho más inteligente que yo. A mi familia, tíos (as) por sus consejos, a mi abuelo Ofelio y a mi primo Juan Carlos por sus enseñanzas durante mi adolescencia.

A Nuria por su amistad, paciencia, amor y apoyo incondicional.

Agradezco al Prof. Dr. Angel Bustamante por haberme iniciado en el área de Nanomagnetismo con la síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas. Y por su constante asesoría y discusiones en la parte Física de mi trabajo de Tesis.

Agradezco al Prof. Dr. Zucolotto por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi trabajo de Tesis de Maestría y por haberme permitido ser miembro de su laboratorio GNano en la mejor universidad de América Latina USP con todas las facilidades posibles.

A mis amigos Valéria y Edson del grupo GNano, a ti Valeria por siempre tener una respuesta para todo y a ti Edson por tus constantes enseñanzas y verdadera amistad, en verdad ustedes dos a su modo son los investigadores jóvenes más talentosos que he conocido.

A Juliana Cancino a quien agradezco el apoyo y enseñanza con los cultivos y análisis de citotoxicidad para esta tesis.

Agradezco a la Red de Macrouiversidades de América de Latina por haber financiado mi estadio en la USP por 5 meses.

A la Dra. Lupe, Gisella y Mari Lara miembros de la Oficina General de Cooperación y Relaciones Interinstitucionales por su cordial atención con mi persona.

Agradezco a la UNMSM y a la USP ambas casas de mi formación profesional.

A los Profesores Jochen Litterst, Dwight Acosta y Claudio Magon por su colaboración con las medidas de Espectroscopia Mossbauer, TEM y EPR. Y a Edgar Aparecido por su ayuda con el refinamiento Rietveld.

Al Dr. Pablo Rivera Riofano por su ayuda en la redacción de mi Tesis de Maestría en L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X.

A José Augusto por su paciencia con mis muestras en la elaboración de los patrones de rayos-X. A mis demás compañeros del grupo GNANO: Dennise, Henrique, Olavo, Thiers, Maria, Ieda, Rodrigo, Fabricio y Geisi Rosas.

Agradezco también a mis amigos de la UNMSM (Grupo CNLab): JC, Wiliam, Henry y Marlon gracias a todos por compartir mis ideales.

Finalmente agradezco a mi jurado examinador por sus observaciones y discusiones en la versión final de esta Tesis.

---

## Definiciones y lista de acrónimos

**Grupo Tiol** Grupo funcional formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno (-SH).

**Tensoactivo** Los tensoactivos o tensioactivos (también llamados surfactantes) son sustancias que influyen por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases.

**p.z.c** Punto de carga nula

**AO/OAM** Ácido oleico y oleilamina

**DPA** Dopamina

**PEG** Polietileno glicol

**TOP** Tri-octil-fosfino

**TOPO** Óxido de Tri-octil-fosfino

**CTAB** Bromuro de cetiltrimetilamonio (Cetyltrimethylammonium bromide)

**PSS** Poli-aniónicosodio 4-estireno-sulfonato (sodium 4-styrenesulfonate)

**LbL** Deposición capa por capa [Layer-by-Layer]

**NPM** Nanopartículas magnéticas

**FTO** Sustrato conductor óxido de estaño dopado con flúor (Fluorine doped Tin Oxide)

**SCE** Electrodo de calomelano

**Ag/AgCl** Electrodo de plata/ cloruro de plata

**PBS** Solución tampón fosfato

**MTT** 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro difeniltetrazolio

**HAp** Hidroxiapatita

**ELISA** acrónimo del inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas.

**SAOS-2** Células óseas de Sarcoma osteogénico

**H2DCFDA** 2', 7'- diacetato diclorodihidrofluoresceína

**ROS (Reactive oxygen species)** Las especies reactivas del oxígeno incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos y orgánicos. Son generalmente moléculas pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada.

## Resumen

La primera parte de esta Tesis de Maestría consiste en entender las propiedades catalíticas y de carácter no enzimático de nanopartículas magnéticas (NPM) de óxido de hierro sintetizadas por el método de descomposición térmica en la creación de sensores que permiten detectar analitos tales como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y ácido cítrico.

La creación del sensor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es llevado a cabo mediante la deposición capa por capa [Layer-by-Layer (LbL)] de las NPM suspendidas y funcionalizadas en medio acuoso con la amina cuaternaria y a su vez surfactante Bromuro de cetiltrimetilamonio (Cetyltrimethylammonium bromide-CTAB) y con el polímero poli-aniónicosodio 4-estireno-sulfonato (sodium 4-styrenesulfonate PSS) vía interacción electrostática sobre el sustrato conductor óxido de estaño dopado con flúor (Fluorine doped Tin Oxide-FTO). La sensibilidad del sensor es estudiada en base a su dependencia con las concentraciones aplicadas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y ácido cítrico utilizando técnicas electroquímicas como Voltametría Cíclica (VC) y Cronoamperometría.

Por otro lado, andamios (*scaffolds*) que actúen como nexo entre los tejidos conectivos dañados en la matriz ósea es un tema actual de gran impacto. La componente inorgánica principal de los huesos Hidroxiapatita (HAp) en estado macroscópico o bulk ha sido elegida ya desde unos 30 años atrás como un candidato que mimetiza las propiedades de los tejidos óseos, más al parecer el desarrollo de la Nanotecnología, como fuente de nuevas y maravillosas propiedades no solo mejora la viabilidad de estas nano partículas en los análisis biológicos sino que al incorporar vía funcionalización otros nanomateriales como  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetita) y su forma oxidada  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (maghemita) a la HAp ayuda rotundamente a la proliferación y degeneración de células osteoformadoras u osteoblastos.

La segunda parte de este trabajo reside en la comprensión de la aplicación mencionada previamente en el párrafo anterior debido a que es primordial comprender cómo se lleva a cabo el proceso de ligación o funcionalización de una estructura sólida (HAp) a una nanopartícula, tema de gran interés y relevancia en la física-química de superficies, pues en la mayoría de casos son moléculas o ligandos las que se adhieren a través de enlaces covalentes o no covalentes a la superficie de las nanopartículas mediante transferencia de fase discutida posteriormente.

Inmediatamente, el análisis citotóxico, e.d., la viabilidad que adquiera este nuevo nanomaterial en las células óseas de SAOS-2 (Sarcoma osteogénico) será evaluado vía el protocolo de cristal violeta, viabilidad celular y análisis ROS, así como el efecto sobre la morfología de las células durante el tiempo de exposición de esta nueva línea de nanomateriales.

**Palabras claves:** Sensor no-enzimático, nanopartículas magnéticas,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hidroxiapatita, células SAOS-2, regeneración de tejidos.

## Abstract

This Master thesis has two main parts, the first one resides in the understanding of the catalytic properties and non-enzymatic nature of magnetic nanoparticles in order to create sensors that detect analytes such as peroxide hydrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and citric acid. The creation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  sensor is carried out by Layer-by-layer (LbL) deposition of the magnetic nanoparticles suspended and functionalized in aqueous medium with the quaternary amine and surfactant cetyltrimethylammonium bromide (cetyltrimethylammonium bromide- CTAB) sodium 4-styrenesulfonate PSS via electrostatic interaction on the conductive substrate fluorine doped tin Oxide-FTO. The sensitivity of the sensor is studied based on their dependence on the applied concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  using electrochemical techniques such as cyclic voltammetry (CV) and chronoamperometry.

On the other hand, *scaffolds*, who act as a link between the connective tissue damaged in bone matrix is a current issue of great impact and importance. The main inorganic component of bone hydroxyapatite (HAp) on macroscopic or bulk state has been chosen around 30 years ago as the perfect candidate that mimics the properties of bone tissues. Additionally, as part of a new source of wonderful properties nanohydroxyapatite has captured the attention by incorporating inside its structure other nanomaterials such as  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetite) and its oxidized form  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (maghemite) which strongly support the proliferation and degeneration of bone-forming cells or osteoblasts. However the role that nanoparticles play in this processes has not been explained yet.

For that, the second part of this Master thesis explained at first how to carry out the process of functionalization of a solid structure (HAp) to a nanoparticle, a subject of great interest and relevance in the physical-chemical surfaces, because in most cases are molecules or ligands which are attached by covalent or noncovalent bounds to the surface of the nanoparticles linked by phase transfer discussed in the preliminary concepts section later on.

As a complement for the characterization studies, cytotoxic analysis, i.e., feasibility to acquire this new nanomaterial in SAOS-2 bone cells will be evaluated using crystal violet protocol; besides cell viability, analysis ROS and the effect on cells morphology during time exposure of this new line of nanomaterials will be studied.

**Keywords:** non-enzymatic sensor, magnetic nanoparticles,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hydroxyapatite, SAOS-2 cells, tissue regeneration.



# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Funcionalización de nanopartículas magnéticas</b>	<b>7</b>
2.1. Transferencia de Fase . . . . .	7
2.1.1. Reacciones por intercambio de ligandos . . . . .	7
2.1.2. Modificación de ligandos . . . . .	8
2.1.3. Capas de recubrimiento adicionales . . . . .	9
2.2. Funcionalización de la superficie por materiales orgánicos (core-shell) . . . . .	9
2.3. Surfactantes . . . . .	10
2.4. Estabilidad Coloidal . . . . .	10
2.5. Tipos de estabilización coloidal . . . . .	11
2.5.1. Estabilización Electrostática . . . . .	11
2.5.2. Punto de carga nula (p.z.c) . . . . .	11
2.5.3. Estabilización Estérica . . . . .	13
2.6. Funcionalización con micelas (Micro-emulsión) . . . . .	14
2.7. Funcionalización con polímeros . . . . .	16
2.8. Funcionalización con moléculas biológicas . . . . .	18
2.9. Modificación de la superficie con moléculas inorgánicas(Core-shell) . . . . .	18
2.10. Electroquímica . . . . .	19
2.10.1. Procesos Faradaicos . . . . .	19
2.11. Reacciones controladas de masa y transporte . . . . .	20
2.12. Biosensores . . . . .	22
2.12.1. Biosensores Electroquímicos . . . . .	24
2.13. Influencia de las NPM en la respuesta de los biosensores . . . . .	25
2.14. Reparación de tejidos . . . . .	29
2.14.1. Tejidos óseos (hueso) . . . . .	30
2.14.2. Composición química del hueso . . . . .	30

2.15. Síntesis de Nano-Hidroxiapatita . . . . .	31
<b>3. Técnicas experimentales</b>	<b>33</b>
3.1. Difractometría de Rayos-X (DRX) . . . . .	33
3.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) . . . . .	34
3.3. Microscopía de Fuerza atómica (AFM) . . . . .	35
3.4. Dispersión dinámica de la luz-Dynamic Light Scattering (DLS) . . . . .	35
3.4.1. Diámetro hidrodinámico . . . . .	37
3.5. Potencial Zeta-Estabilidad Coloidal ( $\zeta$ ) . . . . .	38
3.5.1. Medidas de Titulación (Titration Mode) . . . . .	40
3.6. Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (NTA) . . . . .	41
3.7. Espectroscopía de Infrarrojo . . . . .	43
3.7.1. Tipos de vibraciones moleculares . . . . .	43
3.8. Espectrometría Ultravioleta-visible (UV-Vis) . . . . .	45
3.9. Espectroscopía Mössbauer . . . . .	45
3.10. Relajación . . . . .	47
3.10.1. Relajación Espín-Red . . . . .	47
3.10.2. Relajación Espín-Espín . . . . .	48
3.10.3. Relajación superparamagnética y excitaciones colectivas . . . . .	48
3.11. Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) . . . . .	50
3.12. Técnicas Electroanalíticas . . . . .	50
3.12.1. Cronoamperometría . . . . .	50
3.12.2. Voltametría Cíclica (VC) . . . . .	51
3.13. Medidas Electroquímicas . . . . .	52
3.14. Tratamiento de las células SAOS-2 con nanopartículas . . . . .	53
3.14.1. Cultura celular . . . . .	53
3.14.2. Incubación del Nanomaterial en células de SAOS-2 . . . . .	53
3.14.3. Ensayos Citotóxicos . . . . .	53
3.14.4. Inhibición del ensayo de adhesión celular . . . . .	54
3.14.5. Generación intracelular de ROS . . . . .	55
<b>4. Preparación de las muestras</b>	<b>57</b>
4.1. PRIMERA PARTE . . . . .	58
4.1.1. Reactivos . . . . .	58
4.1.2. Síntesis de NPM de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ vía descomposición térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ . . . . .	58
4.1.3. Modificación de ligandos en la superficie de las NPM de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . . . . .	60

---

4.2. SEGUNDA PARTE . . . . .	60
4.2.1. Reactivos . . . . .	60
4.2.2. Funcionalización de nanopartículas de $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> con HAP . . . . .	61
<b>5. Resultados</b>	<b>67</b>
5.1. NPM como sensores no-enzimáticos . . . . .	67
5.1.1. Difractometría de rayos-X . . . . .	67
5.1.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) . . . . .	71
5.1.3. Resultados obtenidos por UV-VIS . . . . .	73
5.1.4. Deposición Layer-by-Layer (LbL) . . . . .	76
5.1.5. Microscopía de Fuerza Atómica . . . . .	77
5.1.6. Medidas de Titulación . . . . .	79
5.1.7. Dispersión Dinámica de la Luz . . . . .	80
5.1.8. Resultados por NTA . . . . .	80
5.1.9. Espectroscopía de Infrarrojo por (FTIR) . . . . .	85
5.1.10. Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) . . . . .	90
5.1.11. Resultados Electroquímicos . . . . .	92
5.2. Sistema NPM y proliferación de osteoblastos . . . . .	101
5.2.1. Espectroscopía de Infrarrojo FT-IR . . . . .	102
5.2.2. Difractometría de rayos-X . . . . .	102
5.2.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) . . . . .	104
5.2.4. Espectroscopía Mössbauer . . . . .	108
5.2.5. Análisis de viabilidad de las nanopartículas . . . . .	114
5.2.6. Efecto sobre la morfología celular . . . . .	114
5.2.7. Los ensayos de citotoxicidad . . . . .	115
5.2.8. Generación intracelular de ROS . . . . .	116
5.2.9. Inhibición del ensayo de adhesión celular . . . . .	120
<b>6. Conclusiones</b>	<b>123</b>
<b>7. Apéndice</b>	<b>127</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>129</b>



# Índice de figuras

1.1. Esquema del proyecto Multifun. . . . .	3
1.2. Proceso Metastásico. . . . .	3
1.3. Esquema Liberación de Fármacos. . . . .	4
1.4. Estado del arte NPM. . . . .	5
2.1. Modelo NP de 5 nm. . . . .	8
2.2. Modelo core-shell. . . . .	10
2.3. Estabilización Estérica. . . . .	13
2.4. Estructura de una microemulsión. . . . .	15
2.5. Representación de un tensoactivo. . . . .	15
2.6. Reacción de NPM con ácidos Lewis. . . . .	16
2.7. Esquema para la funcionalización. . . . .	18
2.8. Modelos de transporte de masa. . . . .	21
2.9. Diagrama de un biosensor. . . . .	23
2.10. Estructura general de un biosensor. . . . .	24
2.11. Reacción enzimática. . . . .	24
2.12. Métodos de inmovilización. . . . .	25
2.13. Biosensor de glucosa. . . . .	27
2.14. Plataformas electroquímicas. . . . .	28
2.15. Estructura del hueso. . . . .	30
3.1. Equipo Rigaku Rotaflex. . . . .	34
3.2. Diagramas MET. . . . .	36
3.3. Microscopía de barrido del cantilever/AFM. . . . .	36
3.4. Equipo AFM Nanosurf. . . . .	37
3.5. Modelo Esquemático, NP en coloide. . . . .	38
3.6. Equipo DLS. . . . .	39

---

3.7. Dilución de la muestra. . . . .	41
3.8. Equipo Zeta-sizer. . . . .	42
3.9. Tipos de vibraciones moleculares. . . . .	44
3.10. Modelo FTIR Nicolet is50. . . . .	44
3.11. Espectrofotómetro UV-VIS. . . . .	47
3.12. Vector de magnetización. . . . .	49
3.13. Espectro Mössbauer. . . . .	49
3.14. Equipo EPR. . . . .	51
3.15. Esquema VC. . . . .	52
3.16. Potenciostato. . . . .	53
3.17. Sala de cultura celular. . . . .	54
4.1. Reactivos utilizados en la primera parte. . . . .	59
4.2. Agentes estabilizantes. . . . .	59
4.3. NPM obtenidas. . . . .	59
4.4. NPM suspendidas en medio orgánico. . . . .	60
4.5. Solución de CTAB. . . . .	60
4.6. Procesos de síntesis. . . . .	61
4.7. Diagrama de la funcionalización. . . . .	62
4.8. Reactivos usados en la segunda parte. . . . .	63
4.9. Solución de ácido cítrico. . . . .	63
4.10. Solución de NPM con HAP. . . . .	63
4.11. Calcinado a 400 °C. . . . .	64
4.12. Modelo de reacción de condensación. . . . .	65
5.1. Difractograma indexado. . . . .	68
5.2. Análisis del pico de difracción 511 para magnetita. . . . .	68
5.3. Refinamiento Rietveld. . . . .	69
5.4. Forma aparente de los cristalitos. . . . .	70
5.5. Estructura cúbica de la magnetita. . . . .	70
5.6. Imagen MET. . . . .	71
5.7. NPM core shell. . . . .	72
5.8. NPM estabilizas con CTAB. . . . .	73
5.9. Microscopio JEOL SEM 7800. . . . .	74
5.10. Imagen de NPM. . . . .	74
5.11. Espectro UV-VIS NPM. . . . .	75

---

5.12. Espectro UV-VIS NPM@CTAB. . . . .	75
5.13. Espectro UV-VIS polímero. . . . .	76
5.14. Esquema LbL. . . . .	76
5.15. Espectro Electrónico para el filme LbL. . . . .	78
5.16. Medidas AFM. . . . .	78
5.17. Imagen topográfica AFM. . . . .	80
5.18. Imágenes topográficas AFM de los filmes. . . . .	81
5.19. Análisis de potencial zeta. . . . .	82
5.20. Medidas DLS. . . . .	82
5.21. Diámetro hidrodinámico estimado. . . . .	83
5.22. Distribución de tamaños de las NPM. . . . .	84
5.23. Imagen almacenada durante toma de video. . . . .	84
5.24. Gráfico 3D. . . . .	85
5.25. Espectros FTIR. . . . .	86
5.26. Espectros FTIR para el filme. . . . .	87
5.27. Espectros EPR a diferentes temperaturas. . . . .	91
5.28. Dependencia térmica de la línea de campo EPR. . . . .	91
5.29. Dependencia térmica del ancho de línea EPR. . . . .	92
5.30. VC para los filmes. . . . .	93
5.31. Curva analítica para el filme. . . . .	94
5.32. Mecanismo de catálisis. . . . .	94
5.33. Soluciones de NPM con CTAB. . . . .	95
5.34. VC a diferentes tasas de barrido. . . . .	96
5.35. Relación lineal del pico de reducción. . . . .	98
5.36. Influencia del potencial aplicado. . . . .	98
5.37. Resultados por cronoamperometría. . . . .	99
5.38. Curva amperométrica. . . . .	99
5.39. Gráfico Lineweaver-Burk. . . . .	100
5.40. Espectros FTIR. . . . .	103
5.41. Difractometría de rayos-X. . . . .	103
5.42. DRX maghemita. . . . .	105
5.43. DRX maghemita/HAP. . . . .	105
5.44. DRX HAP bulk. . . . .	106
5.45. DRX HAP nano. . . . .	106
5.46. Celda unitaria HAP. . . . .	107

---

5.47. Imagen MET maghemita. . . . .	107
5.48. Imagen MET HAP bulk y nano. . . . .	108
5.49. Imagen MET maghemita-HAP. . . . .	109
5.50. Espectro Mössbauer maghemita. . . . .	110
5.51. Espectro Mössbauer maghemita-emc . . . . .	110
5.52. Dependencia del campo magnético hiperfino para nanomaghemita. . . . .	111
5.53. Espectro Mössbauer maghemita funcionalizada. . . . .	113
5.54. Dependencia del campo magnético hiperfino. . . . .	114
5.55. Micrografía óptica 1 . . . . .	115
5.56. Micrografía óptica 2 . . . . .	116
5.57. Micrografía óptica 3 . . . . .	117
5.58. Micrografía óptica 4 . . . . .	117
5.59. Micrografía óptica 5 . . . . .	118
5.60. Micrografía óptica 6 . . . . .	118
5.61. Ensayos de citotoxicidad. . . . .	119
5.62. Ensayos de citotoxicidad 2. . . . .	119
5.63. Generación celular ROS. . . . .	120
5.64. Análisis de adhesión celular. . . . .	121
7.1. VC sensor ácido cítrico. . . . .	128
7.2. Medidas de cronoamperometría. . . . .	128

# Índice de cuadros

2.1. Tasas de sedimentación. . . . .	10
2.2. Lista de p.z.c de algunos óxidos. . . . .	12
2.3. Polímeros usados en la funcionalización. . . . .	17
2.4. Sensores Electroquímicos. . . . .	26
3.1. Rango de valores para el potencial zeta. . . . .	39
3.2. Regiones del espectro infrarrojo. . . . .	45
3.3. Frecuencias de grupos orgánicos. . . . .	46
4.1. Resumen de las muestras preparadas. . . . .	64
5.1. Posiciones atómicas. . . . .	69
5.2. Valores de rugosidad estimados. . . . .	79
5.3. Grupos funcionales asignados. . . . .	88
5.4. Grupos funcionales para los filmes. . . . .	89
5.5. Comparación de sensores. . . . .	101
5.6. Parámetros hiperfinos nanomaghemita-emc. . . . .	111
5.7. Parámetros hiperfinos maghemita funcionalizada. . . . .	113
5.8. Resumen diámetros obtenidos. . . . .	114



# Capítulo 1

## Introducción

El origen y uso de la Nanotecnología moderna es descrita cronológicamente en la Ref. [1] donde se cita el libro: *The world of neglected dimensions*, cuyo autor es el químico Wolfgang Ostwald. En este libro ya se discute sistemas coloidales del orden de micrones a nanómetros, escrito a inicios del siglo pasado en 1914. Seguidamente tenemos el artículo: *Molecular engineering* by Arthur von Hippel publicado en 1956, tres años antes de la conferencia de Feynman, quien llevo a cabo una conferencia en la Sociedad Americana de Física en Caltech, el 29 de Diciembre de 1959, con título en inglés: *There is a plenty of room at the bottom* que traducida al español sería: *Hay bastante espacio en el fondo*, donde él narra las posibles y ventajosas oportunidades que traería dominar las propiedades de los átomos a una escala muy pequeña (del orden de  $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ) como vía de solución en los problemas y dificultades actuales a la época en las áreas de Física, Biología, Química, Medicina e Ingeniería de Materiales. Después, la palabra nanotecnología sería acuñada en 1974 por el japonés investigador Norio Taniguchi (1912 - 1999). La paternidad de la nanotecnología se atribuye a el primer receptor de doctorado en el campo, el ingeniero estadounidense Eric Drexler, autor de *Engines of creation: the coming era of nanotechnology*, lanzado en 1986, que se convirtió en un importante vehículo de difusión de esta nueva tecnología para el público.

En general, la Nanotecnología consiste en la manipulación de la materia a una escala atómica, molecular y supramolecular en la región entre 1 a 100 nm. Esta definición refleja el hecho de que los efectos mecánico cuánticos son importantes a esta escala [2].

Hoy en día la Nanotecnología es un área multidisciplinaria donde por ejemplo instituciones como el centro por excelencia Dartmouth de Nanotecnología aplicada al Cáncer (Hanover, Estados Unidos) posee dos proyectos de investigación utilizando NPM dedicados y especializados a esta enfermedad siendo el primero: Optimización del tratamiento del cáncer de mama con nanopartículas magnéticas y el segundo: Inmoterapia con NPM en contra del cáncer de

ovario [3]. Asimismo, tenemos el Proyecto Multifun a cargo de Altos Spain S.A. (Sociedad Europea) cuya estrategia está basada en la multifuncionalización de NPM, combinando diagnóstico y características terapéuticas (vea Fig.1.1) contra el cáncer de páncreas y de mama [4] con un financiamiento de 9.8 millones de euros dentro del Programa Marco de la Unión Europea.

Seguido de estos interesantes proyectos está el entendimiento del proceso de Metástasis no sólo desde el punto de vista biológico sino también al describir físicamente las interacciones complejas llevadas a cabo en células cancerígenas, en la Fig.1.2 se observa el mecanismo de transporte de las células tumorales a través de los tejidos circundantes y adhesión vascular [5].

La nano-tecnología en el desarrollo de las áreas de alimentación [6, 7], energía [8, 9] y salud [10] comprende la creación de nuevos materiales a nano-escala con nuevas propiedades físico-químicas con alto grado de bio-compatibilidad o baja toxicidad [11]. Por tal razón, el área de Nano-medicina estudia los problemas actuales que involucren la comprensión de las consecuencias cito tóxicas de estos nuevos materiales, así como el impacto ambiental de los mismos [12]. Esta a su vez comprende las áreas de diagnóstico, regeneración y terapia. Así como el reciente desarrollo de la Nano-toxicología como consecuencia de la búsqueda de aplicaciones de largo alcance de los nano-materiales en medios biológicos [12].

Actualmente, las nano-partículas magnéticas (NPM) u óxidos de hierro superparamagnéticos (superparamagnetic iron oxide nanoparticles-SPIONS) multifuncionales capaces de llevar a cabo una función dual en el diagnóstico de cáncer y terapia, se encuentra bajo investigación. Esta nueva y prometedora estrategia en el tratamiento del cáncer es conocida como Teranóstica [13, 14].

¿Pero por que utilizar NPM? ¿Por qué son materiales tan prometedores? En la última década los sistemas de NPM han capturado y fascinado la atención de los investigadores debido a su gran biocompatibilidad [15], superparamagnetismo [16] y baja toxicidad [17], de hecho estas propiedades acompañadas de su gran área superficial específica permite construir sistemas híbridos. Por ejemplo, Yan *et al.* estudiaron la adhesión de óxido de grafeno (GO) a nanopartículas magnéticas, este sistema revela un alto potencial de actividad para remover metales tóxicos del agua [18]. Además, nanopartículas magnéticas de óxido de hierro son usadas como nano-portadores para procesos de liberación de fármacos (ver Fig.1.3) controlado vía acción foto-termal [19, 20], captura celular o celular uptake [21, 22] hipertermia [23] y mejoramiento en el contraste de las imágenes de resonancia magnética (MRI) [24, 25] (Ver Fig.1.4, estado del arte de los sistemas magnéticos nanoscópicos.).

Como complemento final, nuevos sistemas como partículas JANUS, nombre en honor al Dios romano Jano quien tenía dos caras mirando hacia ambos lados de su perfil. Estas partículas poseen dos hemisferios distintos, un grupo funcional hidrófobo y otro hidrófilo, con

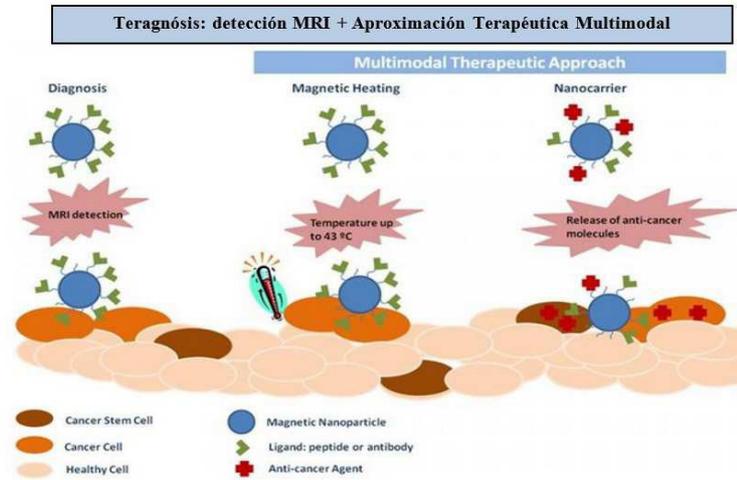


Figura 1.1: Esquema del proyecto Multifun. Tomado del web site: <http://www.multifun-project.eu/>.

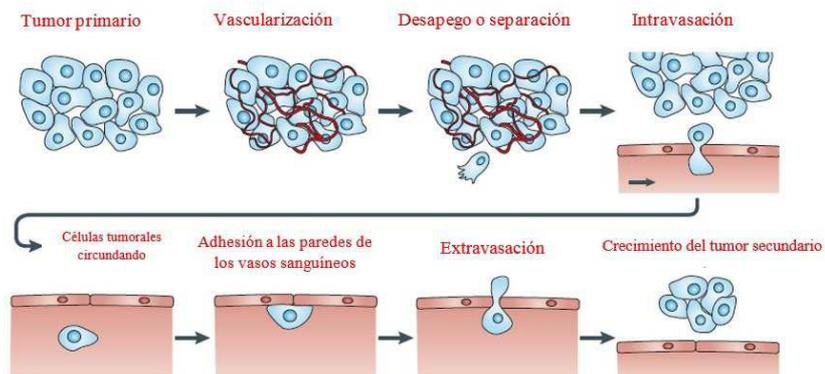


Figura 1.2: Proceso Metastásico: Este complejo proceso las células se liberan de un tumor primario y vascularizado penetrando el tejido circundante, entrando a través de los vasos sanguíneos (intravasación) y circulando en el sistema vascular. Algunas de estas células eventualmente se adhieren a las paredes de los vasos sanguíneos y son capaces de extravasarse y migrar en el tejido local circundante, donde ellas pueden formar tumores secundarios [Tomado de Ref. [5].

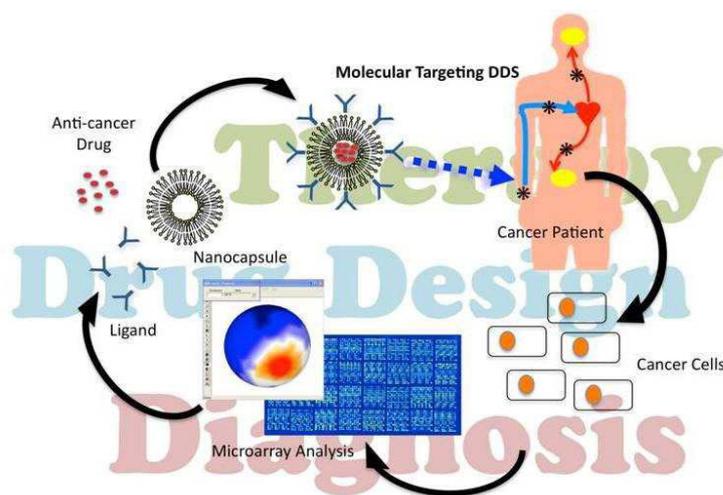


Figura 1.3: Esquema del proceso de envío y liberación de fármacos. Tomado del website: [http://www.gnst.okayama-u.ac.jp/en/tp/column/column\\_en\\_id28.html](http://www.gnst.okayama-u.ac.jp/en/tp/column/column_en_id28.html)

características anisotrópicas cero-dimensionales. Estas a su vez pueden ser construidas usando materiales orgánicos e inorgánicos [26–28].

Cabe mencionar que detrás de todas estas interesantes propiedades que presentan los óxidos de hierro a nanoescala, una de las más interesantes hoy en día son sus propiedades catalíticas en los mecanismos de detección utilizados en sensores y biosensores. No obstante, el mecanismo de catálisis llevado a cabo en la superficie de los electrodos depende del material o analito en estudio. Donde los materiales nanoestructurados funcionan como catalizadores altamente selectivos y sintonizables, debido a su estructura plasmónica única, considerando que su gran área superficial sobre la superficie de los electrodos mejora la cinética de adsorción de los analitos. Por tal motivo, con el objetivo de comprender el proceso de catálisis llevado a cabo en sensores no-enzimáticos se desarrolla en la primera parte de esta Tesis un sistema de nanopartículas funcionalizadas para la detección de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como analito en estudio.

Además a estos avances se suma el rol que juegan las nanopartículas al momento de interactuar con las células, dicho mecanismo que gobierna la interacción de las nanopartículas con la matriz celular no ha sido aún explicado. Para tal efecto los análisis de viabilidad celular y cambios morfológicos debido a la exposición de las células a estos nanomateriales debe ser previamente llevado a cabo antes de un posterior estudio. Por tal motivo, en la segunda parte de esta Tesis se analizará a detalle los análisis de citotoxicidad celular.

En el capítulo 2 se hace una revisión de los conceptos fundamentales sobre los tipos de

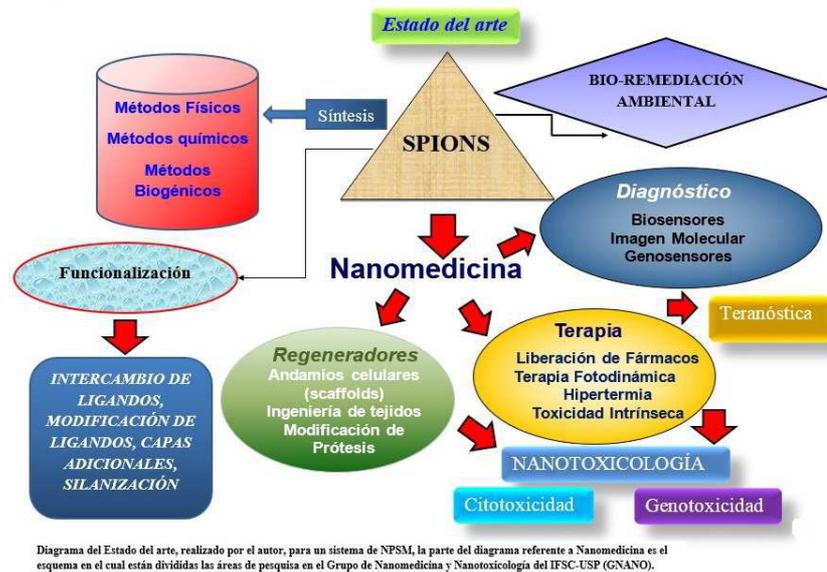


Figura 1.4: El siguiente diagrama de flujo resume el estado del arte o el avance actual alcanzado hasta ahora en diversas ramas de la Nanotecnología de los sistemas de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONS).

funcionalización de NPM, tipos de estabilización coloidal, sensores, biosensores y regeneración de tejidos óseos.

En el capítulo 3 se realiza una breve descripción teórica de las técnicas experimentales utilizadas en la caracterización estructural, morfológica y magnética de las NPM funcionalizadas, estas son: Difractometría de Rayos-X (DRX), Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), Espectroscopía UV-VIS, Ensamblamiento Capa por Capa (LbL por su significado en inglés), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), Titulación y potencial  $\zeta$ , Dispersión Dinámica de la Luz (DLS), Análisis de Seguimiento de nanopartículas (NTA), Espectroscopía de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR), Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR), Espectroscopía Mössbauer y las aplicaciones mediante las técnicas electroquímicas (voltametría cíclica y cronoamperometría) y análisis de viabilidad celular.

En el capítulo 4 se detalla la preparación de las muestras de NPM para la primera parte en aplicaciones a sensores se funcionalizó con surfactantes oleilamina y ácido oleico una magnetita en estado orgánico suspendida en ciclohexano utilizando el método de descomposición térmica, posteriormente la transferencia de fase a un estado acuoso fue llevada a cabo utilizando la amina cuaternaria CTAB; para la segunda aplicación se sintetizó una muestra de nanomaghemita utilizando el método químico de co-precipitación, posteriormente se funcionalizó con HAp siguiendo una reacción de condensación.

En el capítulo 5 se presentan los resultados y sus discusiones sobre la caracterización de las

nanopartículas magnéticas de magnetita y maghemita funcionalizadas, respectivamente. Así como los resultados detallados para sus aplicaciones.

En el capítulo 6 se expone un conjunto de conclusiones del presente trabajo; además se lista una vasta referencia y complementa el trabajo con un apéndice sobre un sensor no-enzimático para ácido cítrico.

## Capítulo 2

# Funcionalización de nanopartículas magnéticas

En el presente capítulo se detalla los mecanismos utilizados para la funcionalización de NPM tales como transferencia de fase por intercambio de ligandos, modificación de ligandos, capas adicionales y silanización. A su vez una introducción a los conceptos básicos de Electroquímica, Biosensores y reparación de tejidos son discutidos en base a una vasta serie de referencias actuales.

### 2.1. Transferencia de Fase

Debido a que una gran variedad de nanopartículas en estado coloidal son sintetizadas en solventes orgánicos, para ciertas aplicaciones ellas tienen que ser transferidas a soluciones acuosas, p.e., para ser compatibles con sistemas biológicos. En general, para tal transferencia de fase, existen tres estrategias: intercambio de ligandos, modificación de ligandos y capas adicionales de moléculas que estabilizan las partículas en la fase deseada. En adición a estos enfoques, el proceso de silanización es utilizado para la modificación de la superficie y la transferencia de fase, representando un caso intermedio en esta clasificación.

#### 2.1.1. Reacciones por intercambio de ligandos

En la estrategia de intercambio de ligandos (véase Fig.2.1), las moléculas que estabilizaron las nanopartículas en la primera fase original son reemplazadas por otras, en este caso por ligandos con mayor intensidad de enlace que permiten la transferencia de la segunda fase y que proveen la estabilidad coloidal, p.e., por intercambio de ligandos hidrófobos a hidrófilos. Comúnmente, grupos tiol que enlazan fuertemente a las superficies inorgánicas de las NP, p.e.

Oro (Au) y Plata (Ag) [29] o Selenuro de Cadmio (CdSe), reemplazando los ligandos más débiles con menor intensidad de enlace que las NPM que usualmente poseen como producto de la síntesis. Ejemplos incluyen la transferencia de (Tri-octil-fosfino)TOP/TOPO (óxido de Tri-octil-fosfino)-recubriendo puntos cuánticos de CdSe/ZnS, ZnS: Sulfuro de Zinc, a una solución acuosa al reemplazar los ligandos con una molécula hidrófila a base de tiol, usualmente ácidos mercapto-carboxílicos (p.e. MPA, MUA, etc.) Variaciones incluyen derivados con múltiples moities (fracción funcional), p.e. ácido mercapto-succínico (dos grupos carboxílicos) [30] y ácido lipoico (o ácido dihidro-lipoico, respectivamente, con dos grupos sulfhidrilos; [31, 32]). Opcionalmente, el extremo libre de las moléculas pueden también portar diferentes residuos [33].

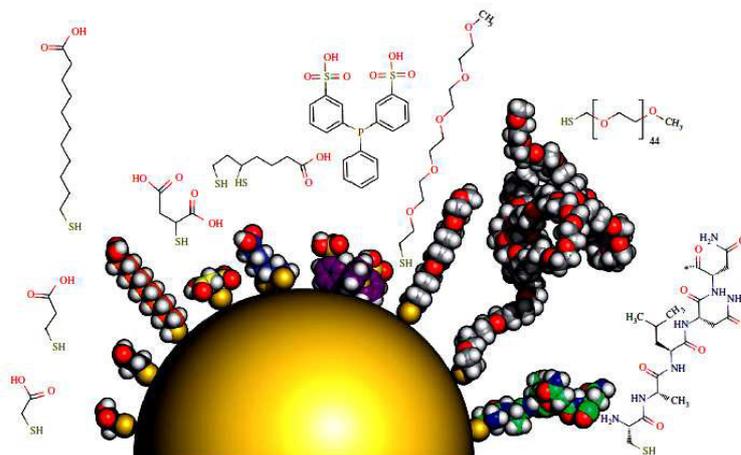


Figura 2.1: NP de  $\approx 5$  nm de núcleo ligada a diferentes moléculas hidrófilas. La partícula es idealizada como una esfera lisa sin rugosidad; de izquierda a derecha: ácido mercapto-acético (AMA), ácido mercapto-propiónico (AMP), ácido mercapto-decanoico (AMU), ácido mercapto-succínico (ASA), ácido dihidrolipoico. Referencia [34], Sperling *et al.* Phil. Trans. R. Soc. A **368**, 1333–1383 (2010).

### 2.1.2. Modificación de ligandos

Una aproximación alternativa al cambio de fase es la modificación de ligandos, la cual consiste en cambiar las especies estabilizantes presentes en la primera fase (hidrófoba a hidrófila o viceversa) por otras que proporcionen la misma o mejor estabilidad en la segunda fase. Este método de transferencia de fase es utilizado en la presente tesis donde se realiza un cambio de fase orgánica a medio acuoso. Wang *et al.* reportan por ejemplo la modificación superficial de nanopartículas de plata (Ag) estabilizada con ácido oleico en estado orgánico utilizando ciclo-dextrina (oligosacárido cíclico), la cual brinda estabilidad en medio acuoso [35].

### 2.1.3. Capas de recubrimiento adicionales

La tercera estrategia para la transferencia de fase consiste en utilizar una capa o varias capas moleculares adicionales, las cuales absorben las moléculas ligantes originales en la superficie de las nanopartículas cambiando sus propiedades superficiales, respectivamente [36]. Las moléculas actuantes como agentes de transferencia de fase son anfífilas o anfipáticas, e.d., moléculas que poseen un extremos hidrófilos osea que solubles en agua (water-loving) y otro hidrófobo osea que rechaza el agua (water-scaring).

## 2.2. Funcionalización de la superficie por materiales orgánicos (core-shell)

En la preparación y almacenamiento de ferrofluidos, la estabilidad es de gran importancia. Muestras orgánicas son usualmente empleadas para apaciguar la superficie de las NPM durante o después el procedimiento de preparación para evitar la aglomeración. Las razones principales son debido a que poseen superficies hidrófobas. Generalmente, si los óxidos de hierro son siempre asumidos de ser el núcleo o coraza, su estructura puede ser dividida en tres tipos: core-shell, matriz, and shell-core-shell como se muestra en la Fig.2.2, cubriendo un ensemble o grupo de NPM con un material orgánico, lo cual conduce a una nano-estructura core-shell. En estas estructuras, las corazas pueden ser de algún tipo de óxido de hierro, como magnetita o maghemita. Igualmente, las capas pueden consistir de algún tipo de material incluyendo solo parte orgánica. La estructura de la matriz incluye dos estructuras típicas: mosaico y capa-coraza (**shell-core**).

Comparativamente hablando, la estructura capa-coraza consiste de una coraza orgánica de NPM y capas de partículas de óxido de hierro. NPM puede conectarse con la coraza orgánica por la interacción de los enlaces químicos. La estructura de mosaico que comprende la capa de la cáscara se hace de las moléculas orgánicas revestidas de una gran cantidad de NPM de manera uniforme. Entre las diferentes matrices que pueden ser usadas para cubrir las NPM, los polímeros son de particular interés debido a su amplio rango de propiedades y aplicaciones. Además, la capa de la cascara hecha de moléculas orgánicas puede cubrir una estructura capa-coraza la cual formara la estructura **shell<sub>1</sub>-core-shell<sub>2</sub>**, la cual es obtenida por la tecnología LbL. La **cascara<sub>1</sub>** puede ser un polímero o una bio-molécula, de forma similar, mientras las **cascara<sub>2</sub>** puede ser el mismo material o algún material funcional diferente.

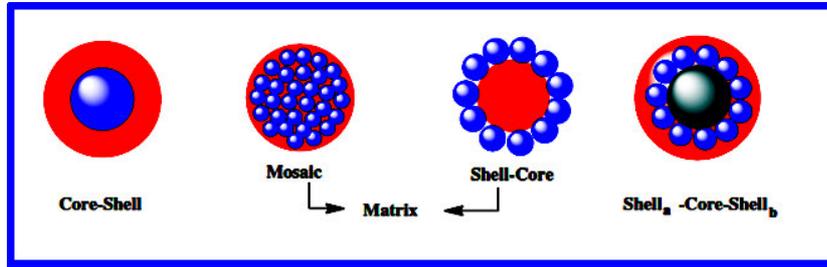


Figura 2.2: La estructura representativa de materiales orgánicos funcionalizados sobre las NPM (si las NPM fueran siempre asumidas como la coraza). Referencia [37], Wu *et al.* *Nanoscale Res. Lett.* **3**: 397–415 (2008).

### 2.3. Surfactantes

Surfactantes y recubrimientos con polímeros tienden a cubrir la superficie de las NPM durante o después de la síntesis para evitar principalmente la aglomeración o floculación. Para tal objetivo la repulsión electrostática y estérica son utilizadas para dispersar las NPM y mantenerlas estables en estado coloidal.

### 2.4. Estabilidad Coloidal

Los coloides son suspensiones de partículas bajo movimiento Browniano de dimensiones lineales entre 1 nm ( $10^9 \text{ \AA}$ ) y 1  $\mu\text{m}$  ( $10^4 \text{ \AA}$ ). La formación de suspensiones uniformes de partículas coloidales puede ser entendida al calcular las tasas de sedimentación (ver la Eq.2.1 y la Tabla 2.1 para unos ejemplos de valores de tasa de sedimentación) asumiendo que las partículas son esféricas tal que la ley de Stokes es aplicada de tal forma que [38]:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{4\pi r^3(\rho' - \rho)g}{6\pi r\eta} \quad (2.1)$$

donde,  $\eta$  y  $\rho$  son la viscosidad y la densidad del medio circundante,  $\rho'$  y  $r$  son la densidad y el radio de las partículas coloidales.

Tabla 2.1: Ejemplo: Para un material de densidad 2 g/mL en agua, las tasas de sedimentación calculadas son:

Radio (m)	Tasa de Sedimentación (m/s)
$10^{-9}$	$2 \times 10^{-12}$ (8nm/h)
$10^{-8}$	$2 \times 10^{-10}$
$10^{-7}$	$2 \times 10^{-8}$
$10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$ (8 mm/h)

## 2.5. Tipos de estabilización coloidal

Con el objetivo de entender el mecanismo de estabilización llevado a cabo en los procesos de pre-síntesis, síntesis y funcionalización de sistemas nanoscópicos en estado coloidal debemos tener claros los siguientes procesos:

### 2.5.1. Estabilización Electrostática

Cuando un sólido emerge en un solvente polar o en una solución electrolítica, una carga superficial será desarrollada a través de los siguientes mecanismos:

1. Adsorción preferencial de iones.
2. Disociación de las especies de carga superficial.
3. Sustitución isomórfica de iones.
4. Acumulación o deflexión de los electrones sobre la superficie.
5. Adsorción física de las especies de carga sobre la superficie.

Dada una superficie sólida en un medio líquido, una densidad de carga eléctrica superficial o potencial entre los electrodos,  $E$ , será establecido, el cual está dado por la ecuación de Nernst [39]:

$$E = E_0 + \frac{RT}{n_i F} \ln(a_1) \quad (2.2)$$

Donde  $a_1$  es la constante de equilibrio. La Ec.2.2 claramente indica que el potencial superficial de un sólido varía con la concentración de los iones en los alrededores de la solución, la cual puede ser también positiva o negativa. La carga superficial en óxidos es principalmente derivada de la disolución preferencial o deposición de los iones. Los iones adsorbidos sobre la superficie del sólido determinan la carga superficial, y por tanto están referidos a los iones de carga determinada, también llamados co-iones. En los sistemas óxidos los iones que determinan la carga típica son los protones y los grupos hidróxilos y su concentración está descrita por su  $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$ .

### 2.5.2. Punto de carga nula (p.z.c)

La concentración de carga que determina los iones correspondientes a una superficie neutra o de carga cero está definida mediante la designación de un punto de carga nula o zero point charge (z.p.c) por su terminología en inglés.

Para un  $pH > p.z.c$ , la superficie óxida está negativamente cargada, debido a que la superficie está cubierta con grupos hidróxilos,  $\text{OH}^-$ .

Para un  $pH < p.z.c$ ,  $\text{H}^+$  es la carga que determina los iones y la superficie está cargada positivamente (Vea la Tabla 2.2 para algunos ejemplos). La densidad de carga superficial o potencial de superficie,  $E$  en voltios, puede ser relacionada al  $pH$ , y la ecuación de Nernst puede ser escrita como [39]:

$$E = 2.303RT \frac{(p.z.c - pH)}{F} \quad (2.3)$$

A temperatura ambiente, la Ec.2.3 puede ser simplificada en la forma de la Ec.2.4:

$$E = 0.06[p.z.c - pH] \quad (2.4)$$

Tabla 2.2: Lista de p.z.c de algunos óxidos comunes en el agua. Valores tomados de la Referencia [39]

Sólidos	p.z.c.
$\text{WO}_3$	0.5
$\text{V}_2\text{O}_3$	1.2
$\delta\text{-MnO}_2$	1.5
$\beta\text{-MnO}_2$	7.3
$\text{SiO}_2$	2.5
$\text{SiO}_2$ (cuarzo)	3.7
$\text{TiO}_2$	6.0
$\text{TiO}_2$ (calcinado)	3.2
$\text{SnO}_2$	4.5
Al-O-Si	6.0
$\text{ZrO}_2$	6.7
FeOOH	6.7
$\text{Fe}_2\text{O}_3$	8.6
ZnO	8.0
$\text{CrO}_3$	8.4
$\text{Al}_2\text{O}_3$	9.0
MgO	12.0

### 2.5.3. Estabilización Estérica

Es un mecanismo que puede explicar la habilidad de ciertos aditivos a inhibir la coagulación o floculación de suspensiones. Estos aditivos incluyen ciertos polímeros con afinidad al agua (**water-loving**) y surfactantes con cadenas afines al agua. Sistemas que son estéricamente estabilizados tienden a permanecer bien dispersos incluso a altas concentraciones o bajas condiciones donde los potenciales zeta de las superficies son reducidas cerca a cero. La efectividad de los estabilizadores estéricos ha sido atribuida a la penalidad termodinámica cuando una trata de confinar cadenas poliméricas a volúmenes muy pequeños.

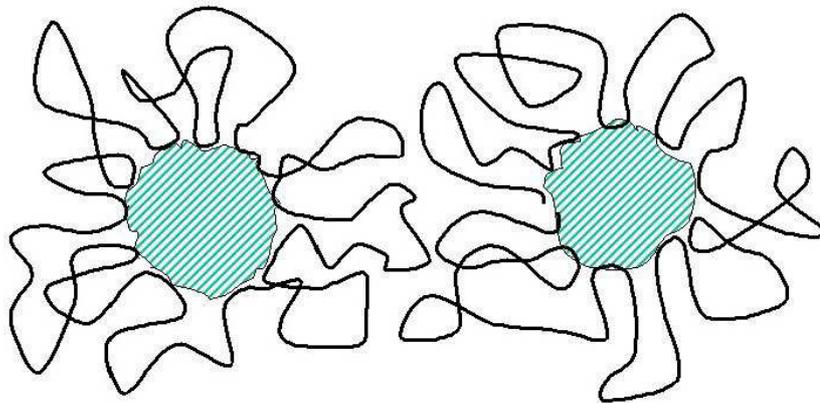


Figura 2.3: Representación esquemática del mecanismo de estabilización estérica.

Estos polímeros pueden incluso estabilizar o desestabilizar las partículas coloidales. Una ilustración de este fenómeno es mostrado en la Fig.2.3 para cantidades pequeñas de polímeros, la configuración de la capa de polímeros es casi plana y la repulsión electrostática continua. La estabilización estérica posee ciertas ventajas sobre la estabilización electrostática:

1. Es un método termodinámico, así que las partículas son siempre redispersables.
2. Concentraciones altas pueden ser acomodadas, donde el medio dispersante puede ser completamente reducido.
3. No es sensible electrolíticamente.
4. Es confiable para el estudio de sistemas multi-fásicos.

Por estas características, comparado al mecanismo de estabilización electrostática, la estabilización estérica o polimérica, ofrece una ventaja adicional en la síntesis de nanopartículas,

particularmente cuando una distribución de tamaño estrecha es requerida. Las capas poliméricas adsorbidas sobre la superficie de las nanopartículas sirve como una barrera de difusión para el crecimiento de las especies, resultando en un crecimiento con difusión limitada, reduciendo la distribución de tamaño del núcleo inicial, conduciendo a un sistema de nanopartículas monodispersas.

## 2.6. Funcionalización con micelas (Micro-emulsión)

Una Micro-emulsión es un sistema conformado por una fase acuosa, una fase orgánica y un tenso-activo, siendo dicho sistema una solución ópticamente isotrópica y estable. En escala macroscópica la micro-emulsión parece ser homogénea, pero molecularmente es heterogénea. La estructura interna de una micro-emulsión a una temperatura dada, está determinada por la proporción de sus constituyentes; la estructura consiste de gotitas esféricas, ó una fase bi-continua. De acuerdo a la Fig.2.4 si la concentración de agua es alta, la estructura interna de la micro-emulsión consiste de pequeñas gotas de la fase orgánica (micelas) en una fase continua de agua. Con un incremento en la concentración de la fracción orgánica, se obtiene una fase bi-continua sin una forma definida. Con una alta concentración de la fase orgánica, se forma una estructura con pequeñas gotas de agua (micelas inversas), también conocida como micro-emulsión inversa [40].

El tenso-activo utilizado juega un papel importante en la preparación de micro-emulsiones, ya que es una especie química con una naturaleza o estructura polar-no polar, que tiende a localizarse entre las fases orgánica y acuosa, formando una capa mono-molecular adsorbida en la interface (Fig.2.5). Como se observa, la molécula está compuesta de dos partes fundamentales, una es la parte que contiene al grupo polar, el cual es afín a la fase acuosa, y la otra parte contiene al grupo no-polar, el cual es afín a la fase orgánica de la micro-emulsión. Debido a la gran área interfacial grande, el tenso-activo dispone de un medio adecuado para satisfacer su afinidad dual, y por lo tanto puede producir un sistema con energía libre inferior a aquella de las fases separadas. La ubicación del tenso-activo en la interface, impide el paso de moléculas que van de la superficie al interior del líquido en busca de un estado de menor energía, disminuyendo el fenómeno de tensión superficial.

Muchas NPM son estabilizadas en condiciones fisiológicas al ser funcionalizadas con grupos cargados negativamente (carboxílicos, sulfatos, fosfatos, etc), resultando en un potencial- $\zeta$  negativo de alrededor 30-50 mV en tampón fisiológico [42]. En los óxidos de hierro, los átomos de hierro actúan como **ácidos Lewis** (ver Fig.2.6) y coordinan con moléculas que donan electrones (long-pair), mientras que en solución acuosa, los átomos de hierro coordinan con

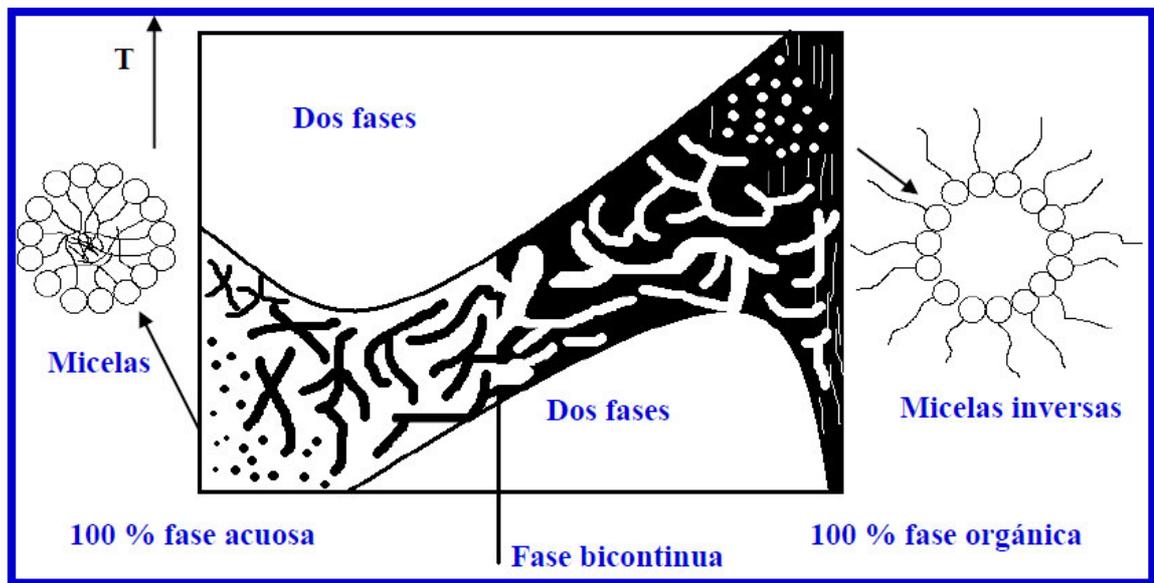


Figura 2.4: Estructura microscópica de una microemulsión a una concentración dada de tensoactivo, como función de la temperatura y concentración de agua [40].

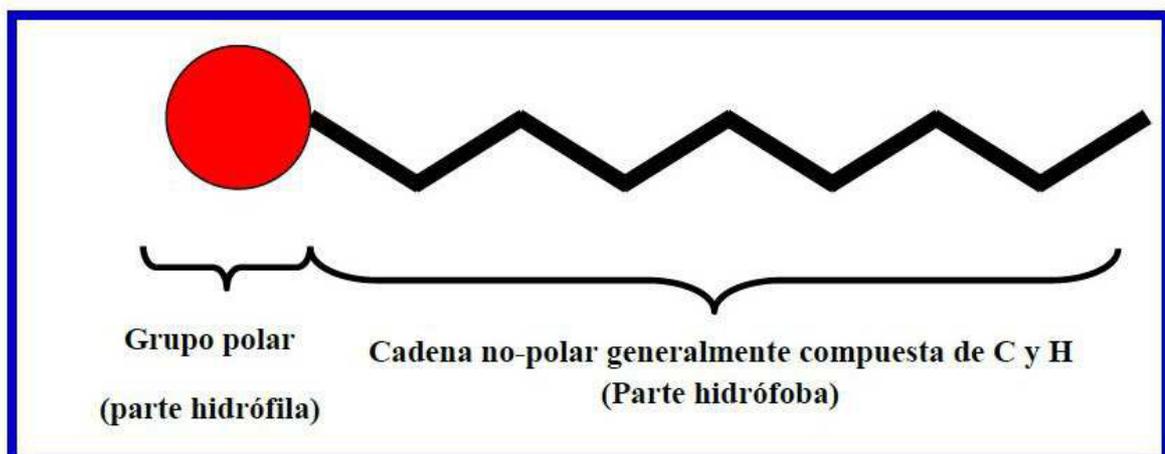


Figura 2.5: Representación esquemática de un tensoactivo [41].

las moléculas de agua, las cuales se disocian dejando la superficie funcionalizada con grupos hidróxilos. Estos grupos hidróxidos son anfóteros y pueden reaccionar con ambos, ácidos y bases.

Las NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  tienden por sí solas a agregar y flocular debido a su alta energía superficial. Así que es necesario estabilizar las nanopartículas en el medio biológico. Para tal objetivo se utilizan materiales inorgánicos y estabilizadores poliméricos. La correcta funcionalización de la superficie de las NPM y la elección de un solvente son cruciales para lograr las interacciones repulsivas suficientes para prevenir la aglomeración hasta obtener una solución coloidal estable.

## 2.7. Funcionalización con polímeros

Aunque la mayoría de estudios se han enfocado sobre el desarrollo de moléculas orgánicas pequeñas y cubrimiento de NPM con surfactantes, recientemente polímeros funcionalizados con NPM están captando más la atención, resaltando las ventajas que tienen los polímeros al recubrir la superficie de las NPM incrementando las fuerzas repulsivas con el objetivo de balancear las fuerzas de atracción magnética y de Van der Waals actuando sobre las NPM. Polímeros de clase sintética y natural son usados para funcionalizar las NPM. Por ejemplo, Gupta *et al.* [44] han reportado un proceso de polimerización por micro-emulsión para preparar NPM funcionalizadas con polietilenglicol (PEG) con núcleo magnético y coraza polimérica hidrófila.

NPM altamente mono-dispersas fueron sintetizadas al utilizar un núcleo acuoso de micelas inversas de aerosol-OT (AOT)/n-Hexano (sin microemulsiones) en atmósfera de  $\text{N}_2$ . El tamaño promedio de las NPM modificadas con PEG fue de alrededor de **40-50 nm** con distribución de tamaño estrecha. Además, el método de polimerización de radicales por transferencia atómica (**PRTA** o **ATRP** en inglés) es utilizado para obtener NPM mono-dispersas con forma de

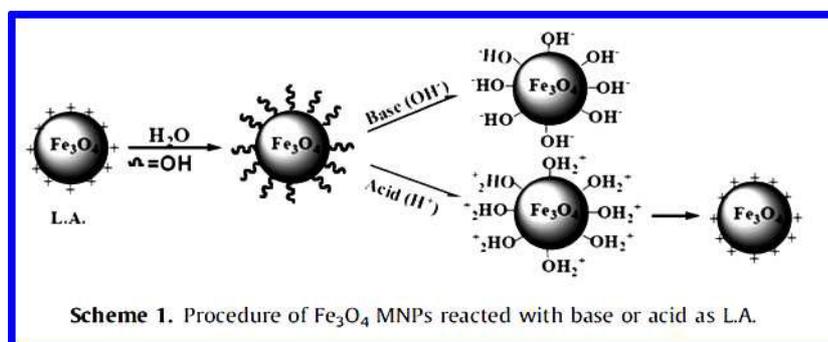


Figura 2.6: Procedimiento de como las NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  reaccionan con bases y ácidos Lewis [43].

**núcleo-coraza** bien definida. **PRTA** puede producir capas con baja poli-dispersabilidad con fácil control del peso molecular, factor relacionado con el espesor de la capa polimérica [45, 49]. (Vea la Tabla 2.3 para una mayor descripción).

Lattuada *et al.* [49] describen y estudian un excelente modelo (Fig.2.7) para la funcionalización por intercambio de ligandos usando ácido ricinoleico ( $\text{AR}-\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_3$ , ácido cítrico (AC), ácido místico ( $\text{AG}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_8$ ) y 2-bromo-2-metil ácido propiónico o propanoico —  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$ (BMPA). Los tres primeros poseen grupos hidroxilos los cuales son afines al ácido oleico, e.d. que permiten la transferencia de fases con éxito, mientras el cuarto es un utilizado como iniciador del método de **ATRP**.

Tabla 2.3: Polímeros utilizados en la funcionalización de NPM [50].

Polímero	Método de adición de ligando	Núcleo
PVP [51]	Intercambio de ligandos vía interacciones hidrófobas	CdSe/ZnS QDs, Au, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
PMPC-PGMA [52]	Co-precipitación de sales ferrosas y férricas en la presencia de copolímeros en bloques	$\text{Fe}_3\text{O}_4$
ptBA [53]	Intercambio de ligandos seguido de catálisis de Cu y polimerización	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
PNIPAM [54, 55]	Recubrimiento con Silica y funcionalización seguida de polimerización	$\text{Fe}_3\text{O}_4$
PLLA/PCL [56]	Polimerización in situ con Sn(II)	$\text{Fe}_3\text{O}_4$
PMEMA [57]	ATRP	$\text{Fe}_3\text{O}_4$
PVA [58, 59]	Coprecipitación alcalina de cloruros ferrosos y férricos seguido de la adición directa de los ligandos	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4$
PAA [60]	Co-precipitación en la presencia de polímeros	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4$
PNIPco-t-Bam [61, 62]	Descomposición térmica en la presencia de polímeros	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y Co

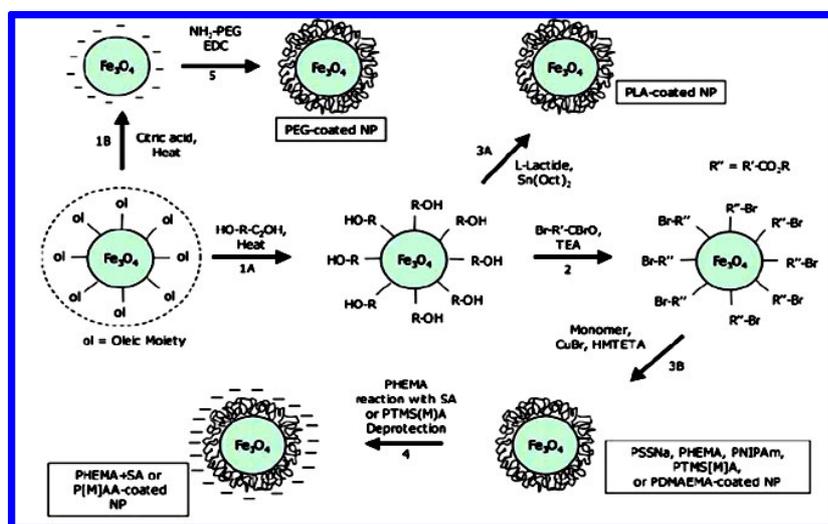


Figura 2.7: Esquema para la funcionalización de las NPM. **Paso 1A y 1B:** Reacciones de intercambio de ligandos. **Paso 2:** Acilación de grupos hidroxilos para preparar los iniciadores de superficie del proceso PRTA. **Paso 3A:** Polimerización de apertura de anillo iniciada por superficie de *L*-lactide. **Paso 3B:** Iniciador de superficie del proceso PRTA. **Paso 4:** Deprotección o reacción adicional después de la polimerización. **Paso 5:** Injerto o cadenas de PEG funcionalizados en la superficie de las NPM [49].

## 2.8. Funcionalización con moléculas biológicas

Diversas moléculas biológicas como proteínas [63, 64], poli-péptidos [65], anti-cuerpos [66, 67], etc., pueden también ser enlazados a la superficie de las NPM directa o indirectamente vía acoplamiento químico por algunos grupos funcionales quienes convierten a las NPM en un blanco específico. Las NPM funcionalizadas con agentes biológicos incrementan considerablemente su bio-compatibilidad. Estas nano-partículas son muy útiles para asistir la separación efectiva de proteínas, DNA, células, productos bioquímicos, etc. Con la apropiada aplicación de la química de superficies, bio-moléculas pueden ser inmovilizadas sobre las NPM. Zhang *et al.* [68] reportan la síntesis de albumina de suero humano o human serum albumin (HAS)- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obtenidas por el método de co-precipitación como un radio-isotopo-portador de  $^{188}\text{Re}$ . Kang *et al.* [69] discuten la afinidad que poseen las proteínas para ser enlazadas o funcionalizadas a la superficie de las NPM en función de las concentraciones de las mismas.

## 2.9. Modificación de la superficie con moléculas inorgánicas(Core-shell)

**Core-shell** de tipo de metálico modificando la superficie de los óxidos magnéticos tienen una coraza interna correspondiente a los óxidos de Fe con una capa externa metálica o de

algún material inorgánico que regule la aglomeración. NPM han sido cubiertas con silica (Si), oro (Au) o gadolinio, etc. Estos revestimientos o capas proveen no solo la estabilidad de la partícula en solución coloidal sino que también ayuda a enlazar los diversos ligandos biológicos en la superficie de la nano-partículas para útiles aplicaciones biomédicas [51].

## 2.10. Electroquímica

### 2.10.1. Procesos Faradaicos

El objetivo de los experimentos electro-analíticos de potencial controlado es obtener una corriente de respuesta la cual está relacionada con la concentración del analito <sup>1</sup> en estudio. Este objetivo es alcanzado al monitorear la transferencia de electrones durante el proceso redox del analito:



donde O y R son las formas oxidadas y reducidas, respectivamente, del acoplamiento redox. Tal reacción (Eq.2.5) ocurrirá en una región de potencial que haga la transferencia de electrón termodinámicamente o cinéticamente favorable.

Para sistemas controlados por las leyes de la termodinámica, el potencial del electrodo puede ser usado para establecer la concentración de las especies electroactivas en la superficie [ $C_O(0, t)$  y  $C_R(0, t)$ ] de acuerdo a la Eq.2.6 conocida como la ecuación de Nernst [70, 71]:

$$E = E^0 + \frac{2.3RT}{nF} \log\left(\frac{C_O(0, t)}{C_R(0, t)}\right) \quad (2.6)$$

Donde  $E_0$  es el potencial estándar para la reacción redox, R es la constante universal de los gases ( $8.314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ), T la temperatura en grados Kelvin, n es el número de electrones transferidos en la reacción, y F es la constante de Faraday (96.487 Coulombs). En el lado negativo de  $E_0$  la forma oxidada por tanto tiende a ser reducida, y la reacción directa (e.d., reducción) es más favorable.

La corriente resultante de un cambio en el estado de oxidación de las especies electroactivas es denominado la corriente faradaica debido a que obedece la Ley de Faraday (e.d., la reacción de 1 mol de sustancia envuelve un cambio de  $n \times 96.487$  coulombs). La corriente faradaica es una medida directa de la tasa de la reacción redox. El gráfico resultante de corriente vs.

---

<sup>1</sup>El analito es un componente (elemento, compuesto o ión) de interés analítico de una muestra. Es una especie química cuya presencia o contenido se desea conocer, identificable y cuantificable, mediante un proceso de medición química

Potencial, conocido como el voltograma (véase sección experimental), es una visualización de la señal de corriente (eje vertical) vs. potencial aplicado (eje horizontal). La forma exacta y magnitud de la respuesta son gobernadas por los procesos envueltos en la reacción llevada a cabo en el electrodo.

## 2.11. Reacciones controladas de masa y transporte

Transporte de masa ocurre por tres diferentes modos:

1. Difusión.- Es el movimiento espontáneo bajo la influencia del gradiente de concentración, e.d., de regiones de altas a bajas concentraciones. Ayudando a minimizar las diferencias de concentración.
2. Convección.- Transportar al electrodo por un movimiento físico bruto; tal flujo de fluido se produce por agitación y girando o vibrando el electrodo (e.d., fuerza de convección) o debido a los gradientes de densidad (e.d. convección natural).
3. Migración.- Movimiento de partículas cargadas a lo largo de un campo eléctrico (e.d., la carga es llevada a través de la solución por iones de acuerdo a su número de transferencia). Estos modos de transporte de masa son ilustrados en la Fig.2.8.

El flujo ( $J$ ) es una medida común de la tasa de transporte de masa en un punto fijo. Es definida como el número de moléculas penetrando una unidad de área de un plano imaginario en una unidad de tiempo, y tiene unidades de  $\text{mol cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . El flujo al electrodo es descrito matemáticamente por la Eq.2.7, la cual es una ecuación diferencial, conocida como la ecuación de Nernst-Planck, dada a continuación para una dimensión:

$$J(x, t) = -D \frac{\partial C(x, t)}{\partial x} - \frac{zFDC}{RT} \frac{\partial \psi(x, t)}{\partial x} + C(x, t)V(x, t) \quad (2.7)$$

Donde  $D$  es el coeficiente de difusión ( $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ ),  $\frac{\partial C(x, t)}{\partial x}$  es el gradiente de concentración,  $\frac{\partial \psi(x, t)}{\partial x}$  es el gradiente de potencial,  $z$  y  $C$  son la carga y concentración, respectivamente, de las especies electroactivas, y  $V(x, t)$  es la velocidad hidrodinámica (en la dirección  $x$ ). En medio acuoso,  $D$  usualmente se encuentra en el rango entre  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$   $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ . La corriente ( $i$ ) es directamente proporcional al flujo de acuerdo a la Eq.2.8:

$$i = -nFAJ \quad (2.8)$$

Donde  $A$  es el área del electrodo.

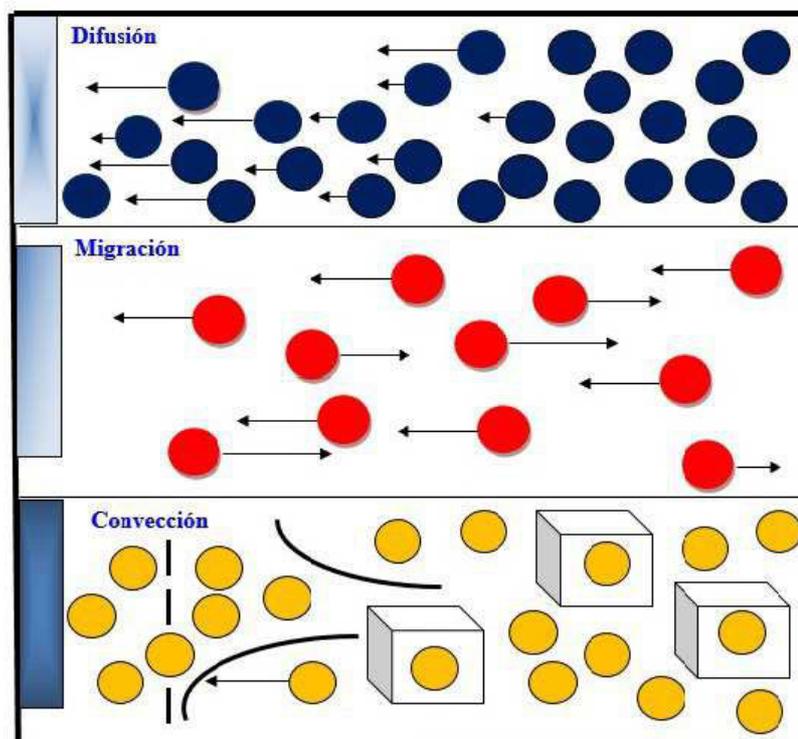


Figura 2.8: Los tres modos de transporte de masa. Adaptado de la Ref. [72]. Joseph Wang, Analytical Electrochemistry, © 1994 VCH Publishers, Inc. ISBN 1-56081-575-2.

Como indica la Eq.2.7 la situación es bastante compleja cuando los tres modos de transporte de masa ocurren simultáneamente. Tal complicación hace difícil relacionar la corriente a la concentración del analito. La situación puede ser grandemente simplificada al suprimir la electromigración o convección, a través del exceso de sales inertes o el uso de una solución inactiva, respectivamente.

Bajo estas condiciones, el movimiento de las especies electroactivas es limitado por difusión. De acuerdo a la primera ley de Fick, la tasa de difusión (e.d., el flujo) es directamente proporcional a la pendiente del gradiente de concentración:

$$J(x, t) = -D \frac{\partial C(x, t)}{\partial x} \quad (2.9)$$

La combinación de las ecuaciones Eqs.2.7 y 2.9 producen una ecuación general (Eq.2.10) para la corriente de respuesta:

$$i = nFAD \frac{\partial C(x, t)}{\partial x} \quad (2.10)$$

Por tanto la corriente (en cualquier tiempo) es proporcional al gradiente de concentración de las especies electroactivas. Como se indica en las ecuaciones anteriores, el flujo de difusión es dependiente del tiempo. Tal dependencia es descrita por la segunda ley de Fick (para difusión lineal):

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial x} = D \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} \quad (2.11)$$

La Eq.2.11 refleja la tasa de cambio con el tiempo de la concentración entre planos paralelos a los puntos  $x$  y  $(x+dx)$ . La segunda ley de Fick es válida para las condiciones asumidas, esto es planos paralelos el uno al otro y perpendicular a la dirección de difusión, e.d., condiciones de difusión lineal. En contraste, para el caso de difusión en un electrodo esférico (donde las líneas de flujo no son paralelas pero si perpendiculares a segmentos de la esfera) la segunda ley de Fick tiene la forma de la Eq.2.12:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left[ \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right] \quad (2.12)$$

Donde  $r$  es la distancia medida desde el centro del electrodo.

## 2.12. Biosensores

La historia de los biosensores comienza en el año 1962 con el desarrollo de electrodos de enzima por el científico Leland C. Clark. Desde entonces, investigadores de diferentes campos (microelectrónica, físicos, químicos, ciencias de materiales) trabajan en el desarrollo de dispositivos biosensores cada vez más sofisticados para aplicaciones en medicina, agricultura, biotecnología, medio ambiente, etc. El crecimiento anual del mercado de los biosensores es del 60% impulsado principalmente por industrias relacionadas con el cuidado de la salud, el procesamiento de alimentos y la monitorización ambiental.

El término “**biosensor**” hace referencia a un dispositivo compuesto fundamentalmente por dos elementos: un término biológico (enzima, anticuerpo, microorganismo) y un elemento sensor (electroquímico, óptico, acústico, térmico). En esencia en un biosensor el material biológico de reconocimiento interactúa con el analito (sustancia a detectar) y da una respuesta detectable por el elemento sensor, que convierte los cambios en las biomoléculas en una señal de salida, generalmente de tipo eléctrico. La Figs.2.9 y 2.10 muestra la estructura general de un biosensor.

Una de las características de los biosensores (que los distingue de otros métodos de análisis biológico) es que el analito puede ser medido de forma directa e instantánea. Otra de sus ventajas es que pueden regenerarse y volver a usar. Además, mediante una optimización apropiada entre el ensayo biológico y el sensor primario es posible detectar concentraciones

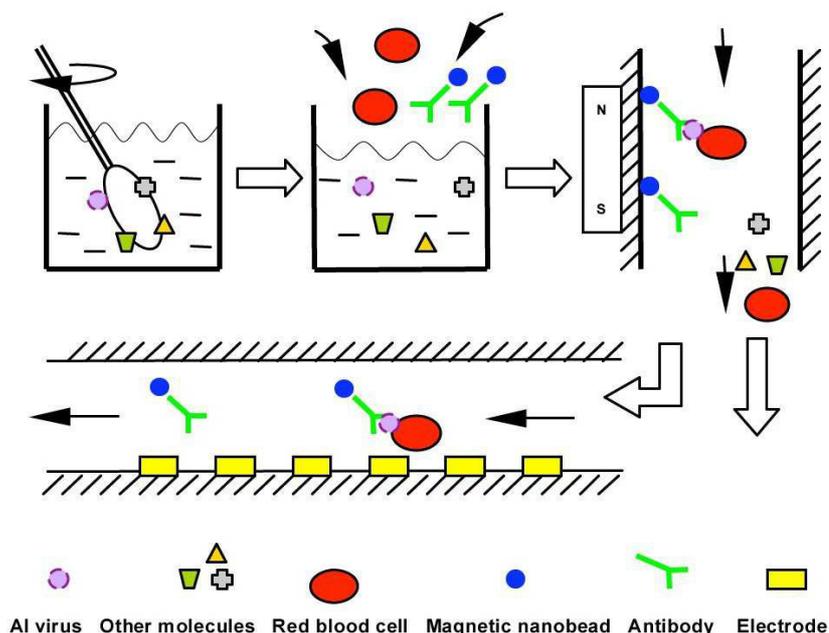


Figura 2.9: Diagrama de un biosensor tomado del site: <http://arkansasagnews.uark.edu/606.htm>, Universidad de Arkansas, División de Agricultura.

extremadamente bajas de una amplia variedad de compuestos de interés ambiental como, por ejemplo, la DBO (demanda biológica de oxígeno). Debido a su relativamente pequeño tamaño, los biosensores pueden usarse en solitario o formando parte de sistemas en donde se utilicen como detectores modulares.

Las enzimas son los materiales biológicos más utilizados. Se trata de proteínas que catalizan las reacciones bioquímicas en los seres vivos, manteniéndose sin cambios al final de dicha reacción. Básicamente destacan por su gran selectividad a un sustrato dado (la molécula transformada) y por favorecer la velocidad de las reacciones químicas. La velocidad máxima de la reacción es proporcional a la concentración de la enzima. La enzima ha de permanecer inmovilizada en una membrana a través de la cual el sustrato se difunde. La reacción con el sustrato da lugar a la formación de un complejo intermedio **enzima-sustrato**, cuya evolución y posterior ruptura da lugar a los correspondientes productos y libera la enzima (ver Fig.2.11).

Es esencial que en un biosensor se produzca un íntimo contacto entre el elemento biológico de reconocimiento y el elemento sensor, manteniendo en lo posible la estabilidad de dicho elemento biológico. El método más sencillo es la **inmovilización** por adsorción (Fig.2.12a, métodos de inmovilización), en el que se ponen en contacto durante un cierto tiempo las biomoléculas (B) con una material adsorbente, produciéndose la retención del biomaterial a la superficie del sensor como resultado de fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno o de

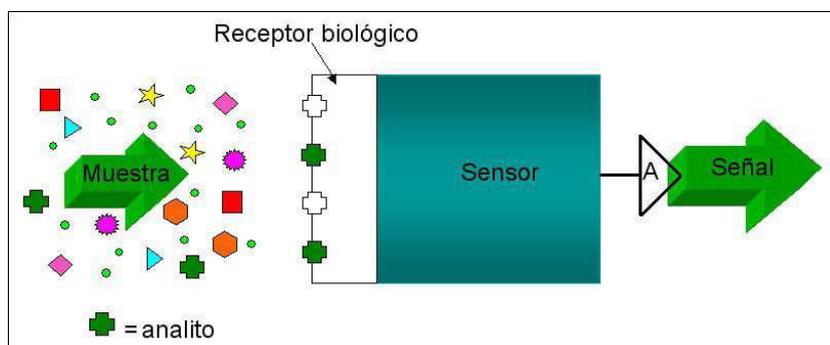


Figura 2.10: Estructura general de un biosensor. Figura tomada del site: <http://biosensores.blogspot.com/2013/02/biosensores.html>

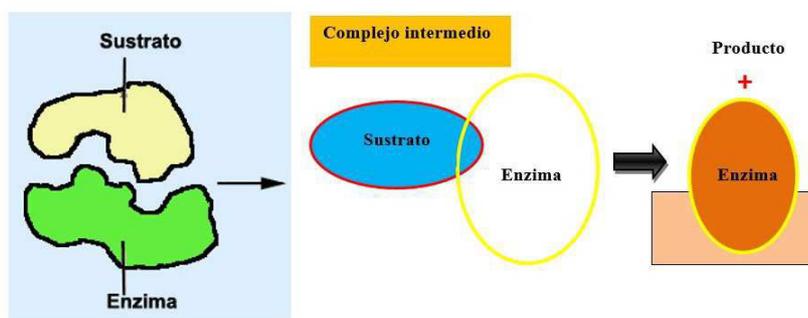


Figura 2.11: Principio de funcionamiento de una reacción enzimática. Adaptado de la Ref. [73].

Van der Walls. En la Fig.2.12b se muestra el método de inmovilización por atrapamiento de la biomolécula dentro de una membrana permeable solo al analito y a los productos de la reacción de reconocimiento pero no al material biológico. La Fig.2.12c representa un método químico de inmovilización basado en la formación de uniones covalentes entre el material biológico y la superficie del sensor. Atendiendo el fundamento del elemento sensor, los biosensores pueden clasificarse en: electroquímicos, ópticos, de ión selectivo, térmicos y de masa.

### 2.12.1. Biosensores Electroquímicos

Este tipo de biosensores son los más versátiles y mejor desarrollados. Utilizados principalmente en la detección de la hibridación de la secuencia del DNA, concentración de glucosa, etc., se basan en que muchas reacciones químicas producen o consumen iones o electrones, los cuales dan lugar a cambios en las propiedades eléctricas de la solución.

Según cuál sea el parámetro eléctrico de medida pueden ser: potenciométricos (miden tensión), amperométricos (miden corriente) y conductimétricos (miden conductividad o resistividad). En los sensores potenciométricos se genera un potencial eléctrico en la interfase

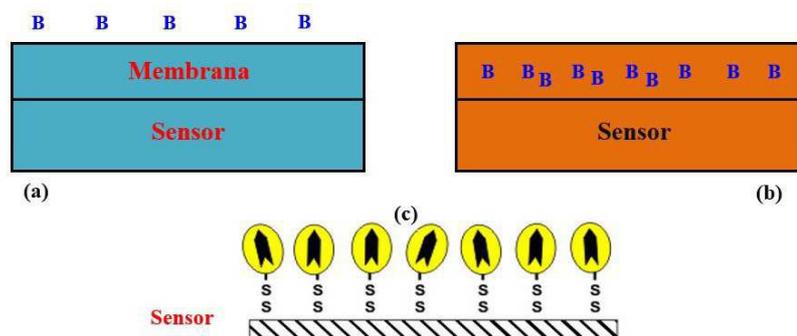


Figura 2.12: Métodos de inmovilización (a) Adsorción física. (b) Atrapamiento mediante membrana permeable. (c) Unión covalente. Adaptado de la Ref. [73].

electrolito-electrodo debido a una reacción redox que tiene lugar en la superficie del electrodo. Los sensores conductimétricos miden los cambios en la conductividad o resistividad de un electrolito en una celda electrolítica. La Tabla 2.4 compara estos tres tipos de biosensores electroquímicos.

Los sensores electroquímicos más usados son los amperométricos y, de ellos, el biosensor de glucosa amperométrico es el que más éxito ha alcanzado, presentando diferentes formas y tamaños. El primer experimento que sirvió de origen a estos biosensores fue realizado por Leland C. Clark, empleando electrodos de platino para detectar oxígeno. La Fig.2.13 muestra el principio de este experimento: la glucosa (sustrato) reacciona con la enzima glucosa oxidasa (GOD) para formar ácido glucónico, produciendo al mismo tiempo dos electrones, dos protones y reduciendo la glucosa oxidasa. Esta GOD reducida, el oxígeno circundante, los electrones y protones reaccionan para formar agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) y oxidan la GOD (la forma original). Cuanta más cantidad de glucosa se tenga, mayor es el consumo de  $O_2$  (menor la detección) y mayor la producción de  $H_2O_2$ . La aplicación de una diferencia de potencial entre los electrodos generará a continuación una señal de respuesta.

## 2.13. Influencia de las NPM en la respuesta de los biosensores

Dentro de las novedosas aplicaciones de las nanopartículas magnéticas ( $Fe_3O_4@$ ,  $Fe_2O_3@$ ) la creación de nuevos sensores basados en sistemas de nanopartículas/polímeros depositados sobre sustratos conductores de óxido de indio dopado con titanio (ITO) y óxido de estaño dopado con flúor (FTO) son aplicados en la detección de analitos industriales (ver Fig.2.14) y el diagnóstico de ciertos tipos de cáncer [74], Marangoni *et al.* reportan la funcionalización de nanopartículas de magnetita funcionalizadas con el polielectrolito cloruro poli-diali-metilamonio o PDAC inmovilizado sobre películas o filmes de ITO mediante deposición capa por

Tabla 2.4: Tabla comparativa de los sensores electroquímicos.

Sensores electroquímicos	Conductímetros	Amperométricos	Potenciométricos
Características			
Parámetro medido	Conductividad	Corriente	Tensión
Tensión aplicada	Senoidal	Potencial constante	Rampa
Sensibilidad	Baja	Alta	Media
Ecuación de gobierno	Resistencia incremental	Ecuación de Cottrell	Ecuación de Nerst
Fabricación FET + Enzima	FET + Enzima 2 electrodos	FET + Enzima Electrodo de óxido	

capa o Layer-by-Layer (LbL) [75].

Nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @PDAC depositadas sobre electrodos en electrolitos ácidos juegan un acoplamiento redox atribuido a la razón estequiométrica  $\text{Fe}^{+2}:\text{Fe}^{+3}$ , donde la corriente faradaica incrementa en una forma lineal con el número de bicapas depositadas denotando aplicaciones posibles en Nanoelectrónica y dispositivos Bioelectroquímicos.

Además, NPM están siendo recientemente aplicadas en el desarrollo de sensores y biosensores basados en la combinación de la respuesta catalítica de estas partículas y la combinación de los filmes Layer-by-Layer (LbL) para mejorar la reducción de algunos analitos [76, 77]. Basados en la propiedades catalíticas de las nanopartículas de óxido de hierro Chunmei Yu et al. mostraron que el sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @hemoglobina(Hb) (a partir de sangre de bovino) cubierto con Platino (Pt) en forma de filmes **LbL**  $[\text{Hb}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pt}]_4$  (4-bicapas) cubriendo un electrodo de carbón vítreo (**GCE**) puede mantener la actividad biológica de la Hb para para la posterior detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y nitratos [78]. Adicionalmente, el efecto del pH en la oxidación del catecol usando nano- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  como catalizador en la química **UV-Fenton** y la identificación de especies de oxígenos reactivas han sido estudiadas [77].

Martins *et al.* reportan la síntesis de fases meta-estables de óxido de hierro y nanopartículas de hidróxido de hierro (PDAC- $\text{FeOOH}/\text{Fe}_2\text{O}_3$ @) para ser utilizadas en celdas de biocombustible [79].

Por otro lado, nanopartículas han sido empleadas como elementos catalíticos y como susti-

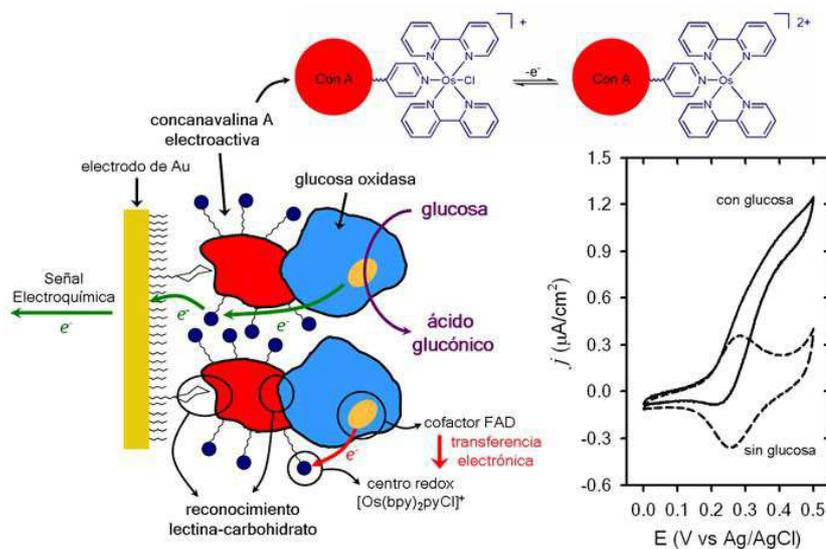


Figura 2.13: Biosensor amperométrico de glucosa. Adaptado de la Ref. [73].

tuyentes enzimáticos *enzymeless biosensors* [74,79]. Por ejemplo, Gao *et al.* reportan la actividad catalítica de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  como peroxidasa mimética para detectar  $\text{H}_2\text{O}_2$  [80]. Šljukić *et al.* reportan que la actividad catalítica de nanotubos de carbono para la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_4$  es atribuida a las impurezas de óxido de hierro [81]. Liu *et al.* también desarrollaron un híbrido de microesferas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ –Ag (diámetro promedio estimado de 400 nm) para la detección electroquímica de  $\text{H}_2\text{O}_2$  [82].

La determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es de gran interés en análisis ambientales, alimenticios farmacéuticos y clínicos [83]. Diversas técnicas como fluorescencia, espectrofotometría, titrimétrica y técnicas electroquímicas han sido empleadas en la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  [83,84]. Entre estos métodos, las técnicas electroquímicas son de gran interés debido a su bajo tiempo de respuesta, costo, tamaño y simplicidad [84].

En sistemas biológicos la **Peroxidasa de *Armoracia rusticana*** o **horseradish peroxidase (HRP)**, conocida comúnmente como rábano rústicano, rábano picante o raíz picante, es la enzima más común usada en dispositivos biosensores para la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  debido a su grupo prostético hemínico [84]. Otras enzimas redox usadas para la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  son **citocromo-c** y **hemoglobina** [84]. Las enzimas citadas anteriormente poseen un agente metálico de hierro como agente catalítico en su grupo prostético. El problema principal con este tipo de sensores es la estabilidad a largo plazo (**long-term stability**) [86]. Otro problema es la orientación de los grupos prostéticos activos de la enzima inmovilizada y la desnaturalización de las proteínas, la cual decrece la transferencia directa de electrones entre el elemento catalítico

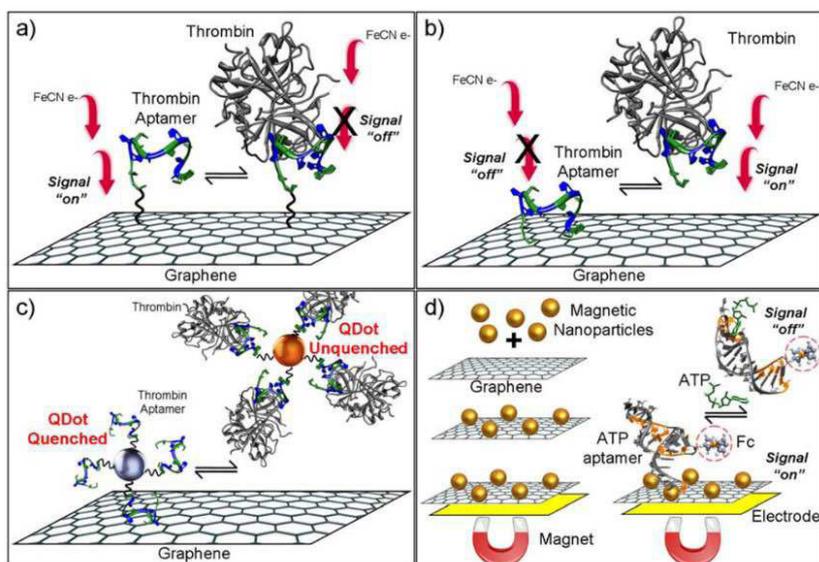


Figura 2.14: Enfoques para la preparación de plataformas de sensores electroquímicos basados en el **grafeno**. Un sensor impedimétrico con (a) la inmovilización aptámero covalente y (b) no covalente, (c) puntos cuánticos de grafeno, (d) la bioelectrónica de nanopartículas magnéticas conjugadas con grafeno. Tomado de la Referencia [85], Hernandez *et al.*, Biosensors **2**, 1-14 (2012)

y el electrodo [87, 88].

Además, el ácido cítrico (AC) es un importante constituyente en alimentación, bebidas e industrias farmacéuticas actuando como antibacterial, amortiguación y agente de sabor [89]. Por ejemplo, adulteración en el jugo de naranja con el uso de aditivos para ajustar el sabor y color es una cuestión importante en la industria de las bebidas [90]. AC es también utilizado como agente de reticulación en películas hidrogel [91]. AC puede ser obtenido por el proceso de fermentación usando microorganismos, especialmente, usando fungus *Aspergillus-niger* [89]. La cuantificación de AC es comúnmente llevado a cabo por Espectrofotométrica, quimioluminiscencia, electroforesis capilar y métodos cromatográficos [92, 94].

Las limitaciones principales de estas técnicas para la determinación de AC son: consumo de tiempo, análisis destructivo, uso de reactivos químicos (medio infectado por cultivo de levadura o contaminación por reactivos) y baja sensibilidad [95].

Los sensores basados en Electroquímica son altamente ventajosos sobre los métodos citados con anterioridad debido a su alta sensibilidad relativa, bajo tiempo de consumo. Potenciometría y Voltametría son las técnicas más comunes entre la detección electroquímica en la cuantificación de AC. Sin embargo, estas técnicas usualmente utilizan un potencial de trabajo relativamente alto comparado con Amperometría. A nuestro conocimiento, esta es la primera vez que una cuantificación Crono-amperométrica de AC es descrita basada en nanopartículas mag-

néticas. Awashi *et al.* proponen un electrodo de platino modificado por polipirrol-pentaciano ferrato (PPY-PCNFe/Pt) como electrodo de trabajo (potencial aplicado de -0.46 V vs. electrodo de calomelano, SCE) en un sensor basado en Voltametría para detectar AC en el rango de concentración de mM [96].

Bee *et al.* proponen la reducción del diámetro de las nanopartículas de maghemita vía la adición de iones de citrato en medio alcalino [97]. Del mismo modo, Wyrzykowski *et al.* [98] estudiaron la estabilidad de cationes metálicos bajo la influencia de grupos citrato.

En esta Tesis, se desarrolla una ruta más sencilla de modificar la fase hidrofóba presente en la superficie de las NPM utilizando el surfactante Bromuro de cetiltrimetilamonio (Cetyltrimethylammonium bromide-CTAB), el cual ayuda a incrementar la estabilidad de las NPM en solución acuosa. En este estudio, se describe la deposición de nanopartículas de magnetita estabilizadas con Bromuro de  $(\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@CTAB})$ /poli(sodio 4-estireno-sulfonato) (PSS) sobre substratos de FTO usando la técnica de electrodeposición LbL. Para tal objetivo, soluciones de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@CTAB}$  y PSS fueron depositadas sobre substratos de vidrio para probar a través de Espectroscopía UV-Vis la adhesión de las bicapas. Luego, el comportamiento catalítico de los filmes LbL para  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue elaborado con los análisis electroquímicos de las bicapas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@CTAB}$ /PSS sobre FTO.

La determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue basado en el ensamblaje de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@CTAB}$ /PSS, con el objetivo de proporcionar su uso como sustituto de peroxidasas en biosensores no-enzimáticos (enzymeless) en la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  será evaluado utilizando técnicas electroquímicas (voltametría cíclica y cronoamperometría).

En adición, novedosas aplicaciones electroquímicas para el ácido cítrico (2do sensor- ver **Apéndice**) son descritas. De la misma manera, este trabajo es una prueba del concepto de la aplicación de NPM como especies reactivas (útiles en algunos procesos catalíticos como una *enzima artificial* para sistemas catalíticos [79]).

## 2.14. Reparación de tejidos

Gupta *et al.* son los pioneros al discutir trabajos de regeneración de tejidos en base a sistemas de nanopartículas magnéticas utilizando métodos de soldadura, e.d., juntando dos superficies de tejidos y luego calentándolas lo suficiente para alcanzar su adhesión satisfactoria, donde proteínas o nanopartículas cubiertas con polímeros son localizadas como intermediarios entre dos superficies de tejido para mejorar la adhesión de los mismos. Con tal objetivo temperaturas superiores a 50 °C son utilizadas para inducir la unión de los tejidos [99]. Comportamiento inducido probablemente por la desnaturalización de las proteínas y el posterior

entrelazamiento de las cadenas de proteínas adyacentes [100].

### 2.14.1. Tejidos óseos (hueso)

El hueso es un tejido bien organizado cuyas funciones primarias consisten en soportar la sobrecarga mecánica y proteger los órganos vitales presentes en el cuerpo [101].

### 2.14.2. Composición química del hueso

**Fase inorgánica:** La componente inorgánica principal es el compuesto cristalino Hidroxiapatita (HAp) o  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ , la cual tiene morfología del tipo plaqueta (20 a 80 nm de largo y 5 nm de espesor). Pequeñas cantidades de impurezas presentes en la matriz de HAp mineralizada son por ejemplo: grupos carbonatos los cuales pueden reemplazar grupos fosfatos presentes en la estructura, considerando además los grupos fluoruros y cloruros, los cuales pueden reemplazar los grupos hidroxilos presentes en la estructura hexagonal. Debido a que la liberación de iones en la matriz mineral del hueso controla las funciones celulares, la presencia de impurezas puede afectar aspectos biológicos importantes (y subsecuentemente afectar propiedades químicas y mecánicas) que son de suma importancia para el funcionamiento normal del hueso [101].

**Fase orgánica:** Aproximadamente, 90 % de la fase orgánica del hueso es de colágeno Tipo-I. El 10 % restante consiste de proteínas, lípidos y otras macromoléculas (e.d. factores de crecimiento, citosina y proteínas adhesivas) [101].

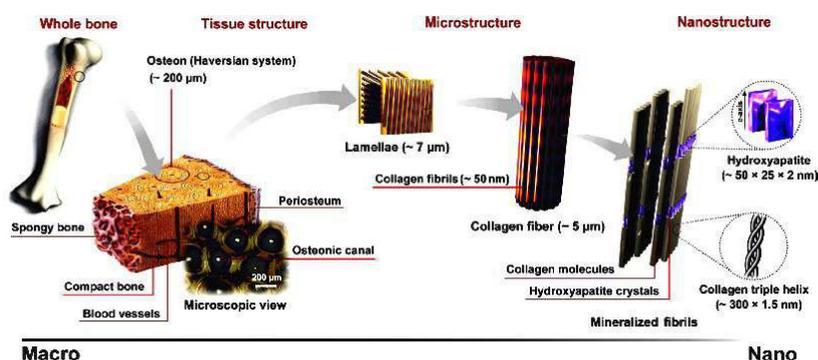


Figura 2.15: La estructura jerárquica del hueso a varias escalas de longitud. La microestructura del hueso cortical o compacto consiste de sistemas Harvesianos (círculos en sección transversal y vista microscópica) con canales osteónicos y lamellae, y en la nanoescala, el marco estructural corresponde a fibras de colágeno de paquetes de fibrillas de colágeno mineralizado. Descripción tomada de *Acta Biomaterialia* **9** 7591–7621 (2013), Shojai *et al.* [110].

## 2.15. Síntesis de Nano-Hidroxiapatita

La síntesis de **nano-Hidroxiapatita** (HAp) ha sido llevada a cabo por diversos métodos como síntesis hidrotérmal [102], sol gel [103], co-precipitación [104], síntesis bio-mimética [105], etc. Cada una de estas rutas químicas influye en la forma y tamaño de los granos nano-métricos. Aqif A. Chaudhry *et al.*, reportan la síntesis hidrotérmal de nanorods de HAp, este método posee algunas ventajas ya que no utiliza compuestos o matrices orgánicas en el proceso de síntesis y tampoco requiere de temperaturas altas de calcinado y sinterizado, como se observa en diversos artículos donde requieren periodos amplios para obtener la cristalización del material. El factor o parámetro físico que juega un rol importante en el control del tamaño y forma de los granos es la presión [102] La Fig.2.15 muestra la estructura jerárquica del hueso a varias escalas de longitud.

Recientemente, hidroxiapatitas magnéticas (mHAp) (dopaje) usadas en hipertermia para aplicaciones en vivo han sido desarrollados por Hou et al. [106]. En esta literatura, mHAp son diluidas en una solución de fosfato tampón (PBS) y posteriormente inyectadas alrededor de un tumor de riñón para aplicación in-vivo. Con el objetivo de alcanzar hipertermia, el ratón fue localizado dentro de un calentador inductivo con alta frecuencia y campo magnético alternante.

Solo el ratón con 15 de días con solución inyectada muestra la reducción del volumen. Además, Tampieri *et al.* [107] sintetizaron y caracterizaron un sistema HAp dopado con Fe para aplicaciones también en hipertermia. Luego Pansieri et al. [108] exploraron el efecto de introducir nanopartículas superparamagnéticas de Fe–HAp en células tipo osteoblasto. También, Zeng et al. estudiaron la adhesión celular, proliferación y diferenciación de respuesta magnética de mHAp via Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Microscopio Confocal laser de barrido (CLSM) y **3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro difeniltetrazolio (MTT)** y fosfato alcalino [109]. Como es descrito estos procesos complejos requieren el dopaje de los iones de calcio por iones de Fe en la estructura sólida de la HAp. En este trabajo, desarrollamos un modelo de interacción siguiendo una reacción de condensación como será descrito en detalle más adelante.



## Capítulo 3

# Técnicas experimentales

En este capítulo serán descritas las características de las técnicas de análisis utilizadas en la caracterización de las muestras.

### 3.1. Difractometría de Rayos-X (DRX)

La aplicación fundamental de la difracción de rayos-X es la identificación cualitativa de la composición mineralógica de una muestra cristalina. Existen varias técnicas para la obtención de un difractograma de polvo, éste puede ser obtenido usando una cámara de difracción. Sin embargo entre las más usuales está la que usa el difractómetro, equipo que permite el registro electrónico de los haces difractados por una muestra cristalina en polvo al irradiar con un haz de rayos-X monocromáticos como el del Cu  $K_{\alpha 1}$ .

La Difractometría de rayos-X fue llevada a cabo en el Laboratorio de Cristalografía de rayos-X del Instituto de Física de São Carlos-USP, SP-Brazil, utilizando un difractómetro Rigaku Rotaflex equipado con un monocromador de grafito y un tubo anódico rotatorio, operando con radiación Cu  $K_{\alpha 1}$ , 50 kV y 100 mA (Figs.3.1a y 3.1b). Los patrones de difracción en polvo fueron obtenidos en modo step scanning,  $2\theta = 8-80^\circ$ , con paso de  $0.01^\circ$  y 4 segundos/paso. El refinamiento Rietveld fue llevado a cabo usando el Software FULLPROF [111]. Todos los parámetros fueron refinados por el método de mínimos cuadrados [112]. La función pseudo-Voigt modificada por Thompson–Cox–Hastings fue utilizada como función de perfil de los picos [113]. Los parámetros de la función de resolución de instrumental fueron obtenidos se han obtenido a partir de un estándar de hexaborato de lantano,  $\text{LaB}_6$ . La estructura de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  basada en Sasaki [114] fue tomada como modelo para fijar los parámetros iniciales. El tamaño y forma de las partículas fueron determinados de los tamaños de los cristalitas anisotrópicos usando armónicos esféricos (SHP) [115].

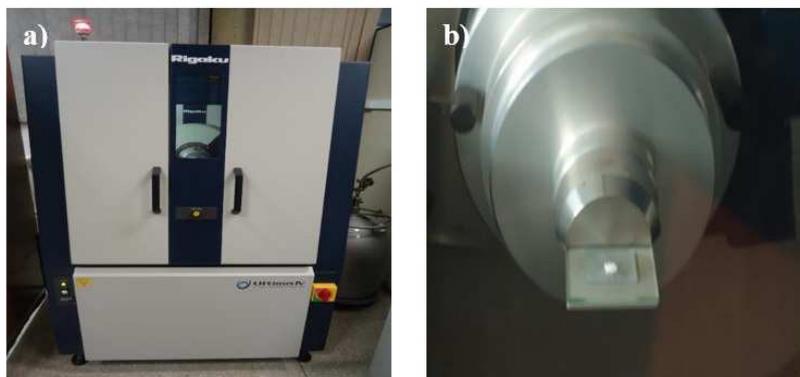


Figura 3.1: (a) Equipo Rigaku Rotaflex utilizado para las medidas de difracción de rayos-X y (b) Porta-muestra utilizado para sostener la muestra en polvo durante la medida.

### 3.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

El MET es un instrumento importante para la investigación de superficies [116] el cual nos proporciona imágenes de la morfología superficial de la muestra. En la Fig.3.2 se muestra un diagrama esquemático de las principales componentes del modo de funcionamiento de un MET.

Su fuente de emisión es un haz de electrones, donde generalmente el filamento es de tungsteno que utiliza la emisión termoiónica. A temperaturas por encima de 2700 K, el filamento de tungsteno emite una gran cantidad de electrones, donde tiende a acelerar a través de una diferencia de potencial variable entre 1 – 40 kV. El haz de electrones producido por dos o tres etapas de magnificación por lentes condensadores tiende a acelerar para formar un haz paralelo. El diámetro del haz de electrones es 2 – 10 nm. La imagen es mostrada en un tubo de rayos catódicos escaneado en sincronismo.

La preparación de muestras es sencilla para MET, la muestra tiene que estar seca y además debe ser conductora de corriente eléctrica como es el caso de los metales, pero si fuera un material no conductor (aislante) lo que se debe hacer a este tipo de materiales es cubrirlo con algún material conductor como el oro o carbón. La morfología y tamaño de partícula para la primera parte de esta Tesis fueron analizados usando un equipo MET modelo **JEOL/JEM-2100** con un voltaje de aceleración de 200 kV.

Para la segunda parte de esta Tesis de Maestría, las imágenes se han obtenido en un Microscopio electrónico **JEOL FEG-STEM 2010** con fuente de emisión de campo a 200 kV; perteneciente al Laboratorio Central de Microscopía del Instituto de Física de la UNAM-México, las imágenes de baja amplificación se han obtenido en el modo de campo claro, las otras imágenes son de alta resolución (resolución de planos y/o resolución atómica). Se utilizo

el software Image J para calcular el tamaño de las partículas.

### 3.3. Microscopía de Fuerza atómica (AFM)

Microscopía de sonda de barrido o SPM por sus siglas en inglés Scanning probe microscopy es un término general que refiere al número de técnicas que producen una imagen tridimensional debido a la interacción entre una sonda (probe) pequeña (Fig. 3.3) y constituyentes atómicos presentes en la superficie de la muestra. Microscopía de Fuerza atómica o AFM por sus siglas en inglés Atomic Force Microscopy provee imágenes tridimensionales (3D) de la superficie del material con resolución de  $\text{\AA}$  a nm. Las capacidades analíticas de AFM son limitadas a la capa atómica superior de una muestra porque su operación es basada en las interacciones con la nube electrónica en la superficie.

**Instrumentación.**- Las componentes típicas para un AFM son:

1. Cantilever/tip-dobla en respuesta a fuerzas entre la punta y la muestra (Vea Fig.3.3).
2. Laser/ detector- un haz de láser está limitada fuera del cantilever y dirigida hacia un detector de fotodiodos para registrar la deflexión del cantilever en respuesta a la superficie en estudio. Etapa de la muestra (Sample stage).- La muestra debe estar asegurada correctamente. Use un conductor piezoeléctrico para alterar la posición arriba o abajo para mantener el contacto entre la punta y la muestra.
3. Ordenador.- Traslada a señal del detector de fotodiodos y provee retroalimentación a la posición de la etapa de control.

El equipo utilizado para las medidas AFM fue un AFM Nanosurf Easyscan 2 con software de control SPM Versión 3.1 (Vea Fig.3.4) del Laboratorio de Nanomedicina e Nanotoxicología, Instituto de Física de São Carlos, Universidad de São Paulo (USP). El tratamiento de las imágenes obtenidas en formato \*.nid fue realizado con el programa Gwyddion 2.38 (<http://gwyddion.net/>).

### 3.4. Dispersión dinámica de la luz-Dynamic Light Scattering (DLS)

La dispersión dinámica de la luz (también conocido como PCS, Espectroscopía de Correlación de fotones) relaciona el movimiento Browniano con el tamaño de las partículas. Este proceso se lleva a cabo al iluminar las partículas con un láser y analizando las fluctuaciones en las intensidades en la dispersión de la luz.

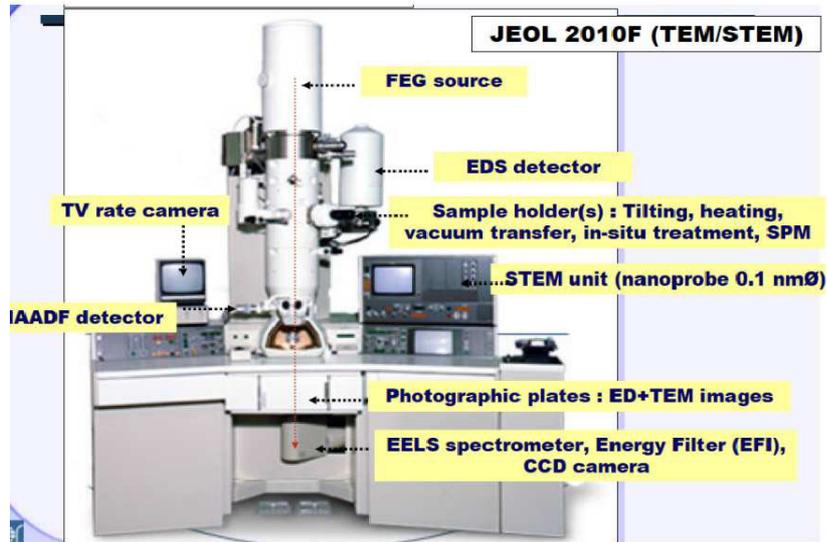


Figura 3.2: Diagrama esquemático de las principales componentes de MET JEOL 2010F.

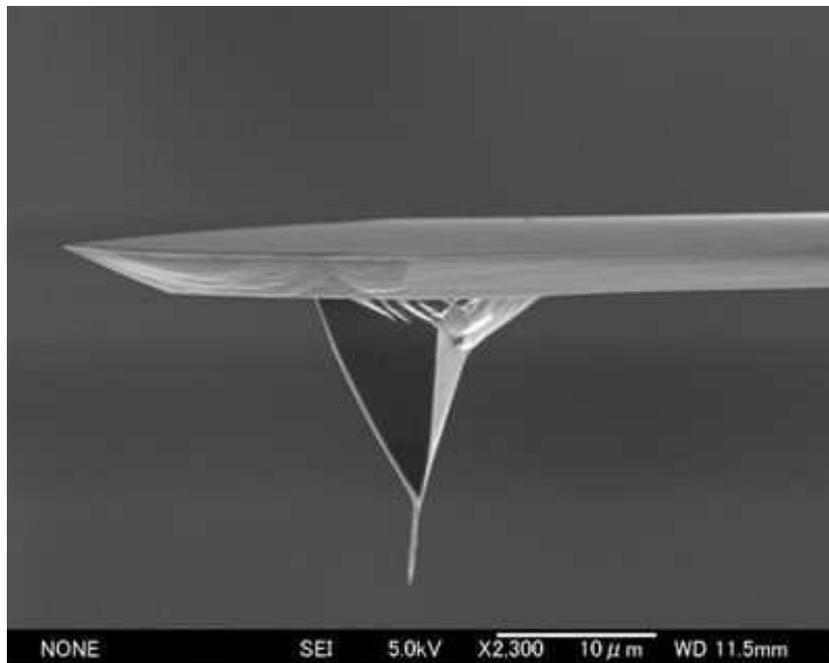


Figura 3.3: Imagen de Microscopía de barrido de la punta (tip) utilizada en Microscopía de Fuerza Atómica. La punta está unida al final de un cantiléver. Imagen tomada del sitio web: <http://nanotec-blog.blogspot.com/2012/04/mejoran-el-afm.html>



Figura 3.4: Equipo AFM Nanosurf Easyscan 2 con SPM control software Versión 3.1.

### 3.4.1. Diámetro hidrodinámico

El tamaño de una partícula es calculado del coeficiente de difusión traslacional al usar la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (3.1)$$

donde:  $d(H)$  = diámetro hidrodinámico,  $D$  = coeficiente de difusión traslacional,  $k$  = constante de Boltzmann,  $T$  = temperatura absoluta,  $\eta$  = viscosidad. Notemos que el diámetro que es evaluado por DLS según la Eq.3.1 es un valor que se refiere a como una partícula se difunde dentro de un líquido, e.d., que el diámetro que es obtenido por esta técnica es el diámetro de una esfera (Vea Fig.3.5) que tiene el mismo coeficiente de difusión traslacional que la partícula.

Un sistema DLS típico consiste de 6 componentes principales (Fig.3.6): Primero que todo un láser (1) el cual es utilizado para proveer una fuente de luz que ilumine las partículas en la muestra dentro de la celda (2). La gran mayoría de los haces del láser pasan directamente a través de la muestra, pero algunos son dispersados por las partículas dentro de la misma. Un detector (3) es usado para medir la intensidad de la luz dispersada. Como una partícula dispersa la luz en todas las direcciones, en teoría, es posible localizar el detector en alguna posición y será aún posible detectar la dispersión. Dentro de las series de equipos más utilizados se encuentra el Zetasizer Nano, dependiendo del modelo en particular, la posición del detector varía de 173°

o de  $90^\circ$ .

La intensidad de la luz dispersada debe estar dentro de un rango específico para la correcta colección de información en el detector. Si demasiada luz es detectada luego el detector llegara a sobrecargarse. Para solucionar este problema un atenuador (4) es utilizado para reducir la intensidad del láser y por tanto reducir la intensidad de la dispersión. La señal de intensidad de dispersión en el detector es convertida en una tarjeta de procesamiento de señal digital, correlador (5), el cual compara la intensidad de dispersión en intervalos sucesivos para derivar la tasa en la cual la intensidad es variante. Esta información, es enviada a un ordenador (6), donde el Software Zetasizer analizará los datos para su posterior análisis.

Para la preparación de la muestra se utiliza un beaker de laboratorio para diluir la concentración de las NPM en el solvente orgánico (ciclohexano). Se vierten  $40 \mu\text{L}$  de solución de NPM de magnetita con ayuda de una pipeta marca HIGH TECH-LAB MATE, capacidad ( $10\text{-}100 \mu\text{L}$ ). Posteriormente, se vierten  $1600 \mu\text{L}$  (pipeta marca HIGH TECH-LAB MATE, capacidad ( $100\text{-}1000 \mu\text{L}/1\text{mL}$ )) de ciclohexano en el beaker con las NPM. Ahora, se homogeniza la solución con ayuda de la pipeta formando un líquido transparente. Se vierte este líquido en el porta-muestra de vidrio del equipo cuidadosamente, luego el cabezal que contiene los electrodos es puesto sobre el porta-muestra sellándolo. Luego, se coloca en el equipo para realizar la medida.

### 3.5. Potencial Zeta-Estabilidad Coloidal ( $\zeta$ )

El Potencial Zeta se refiere al potencial electro-cinético en sistemas coloidales. En la literatura de la química coloidal se representa con la letra zeta griega,  $\zeta$ . Desde un punto de vista de la físico-química teórica, el potencial zeta se asigna al potencial eléctrico en la capa doble

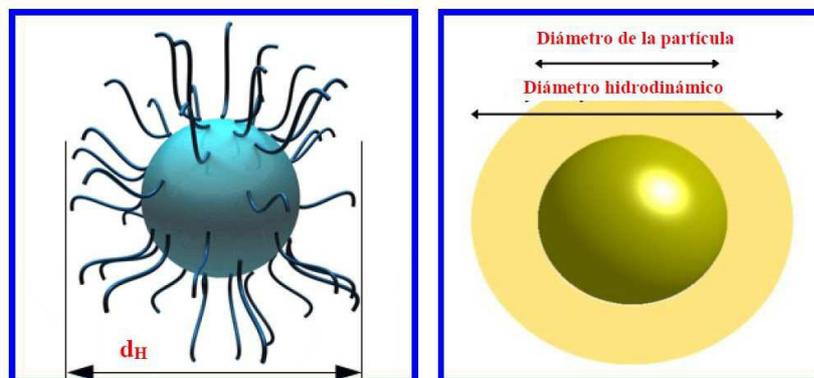


Figura 3.5: Modelo esquemático de la geometría de las partículas presentes en el coloide.

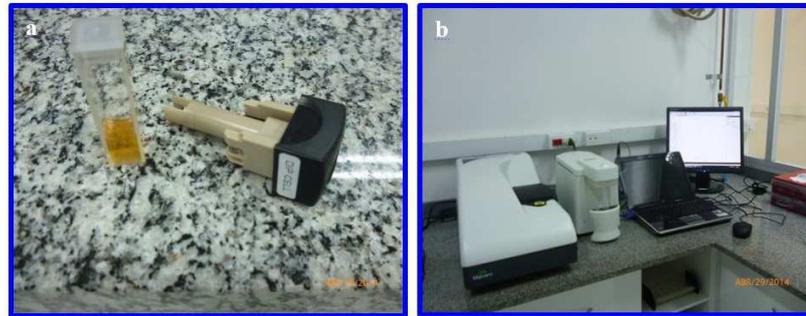


Figura 3.6: Equipo DLS utilizado para determinar el diámetro hidrodinámico de las NPM. b Celda utilizada como portamuestra.

interfacial en la locación del plano deslizante contra un punto en el fluido másico o bulk lejos de la interface. En otras palabras, potencial zeta es la diferencia de potencial entre el medio dispersor y la capa estacionaria del fluido unido o ligado a la partícula dispersada.

Cabe recalcar que la técnica solo se aplica a soluciones acuosas, no medios orgánicos hidrófobos. Un valor de 25 mV (positivo o negativo) puede ser tomado como el valor arbitrario que separa las superficies de baja carga de las superficies de carga más alta. El significado del potencial  $\zeta$  es que su valor puede ser relacionado a la estabilidad de la dispersión coloidal. El potencial zeta indica el grado de repulsión entre partículas cargadas similarmente y adyacentes en una dispersión. Para moléculas y partículas que son demasiado pequeñas, un valor alto del potencial  $\zeta$  será conferido a estabilidad; e.d, la solución o dispersión resistirá la agregación. Cuando el potencial es bajo, atracción excede la repulsión y la dispersión romperá y floculará. Así, los coloides con alto potencial  $\zeta$  (negativo o positivo) son eléctricamente estabilizados mientras que los coloides con bajo potencial  $\zeta$  tenderán a coagular o flocular, algunos valores de potencial zeta son indicando la estabilidad del coloide son resumidos en la siguiente Tabla 3.1:

Tabla 3.1: Rango de valores de potencial  $\zeta$  asignados a la alta o baja estabilidad del coloide.

Potencial $\zeta$ (mV)	Estabilidad del coloide
De 0 – $\pm 5$	Rápida coagulación o floculación
De $\pm 10$ – $\pm 30$	Inestabilidad incipiente
De $\pm 30$ – $\pm 40$	Estabilidad moderada
De $\pm 40$ – $\pm 60$	Buena estabilidad
Superior a $\pm 61$	Excelente estabilidad

Además, el potencial  $\zeta$  es determinado al medir  $U_E$ . Esta velocidad es la movilidad electroforética de la partícula dada por la Eq.3.2:

$$U_E = \frac{2\epsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta} \quad (3.2)$$

Donde:

$\zeta$  = Potencial Zeta (mV)  $\epsilon$  = constante dieléctrica del electrolito  $\eta$  = viscosidad

Tenemos dos casos esenciales:

$f(ka)$  = Función de Henry  $\approx 1.5$  (Aproximación de Smoluchowski), para partículas  $> \approx 200$  nm y electrolito  $\approx > 1 \times 10^{-3}$  M.

$f(ka)$  = Función de Henry  $\approx 1.0$  (Aproximación de Huckel) para partículas más pequeñas  $< 200$  nm y diluidas.

### 3.5.1. Medidas de Titulación (Titration Mode)

Revisar la opción clean que permite limpiar o lavar el sistema, en especial las delgadas mangueras que conectan las posiciones con soluciones de pH ácido, neutro y básico con la celda que contiene los electrodos, la solución de limpieza es automáticamente depositada en un vaso de precipitado o beaker de 100 mL. La calibración del pH es llevada a cabo con tres soluciones tampón con pH = 4, 7 y 10.

Seguidamente, el volumen se controla de acuerdo a que tan diluida es la muestra, si la muestra está muy diluida más volumen de solución ácida o básica será necesaria para hacer la medida y luego se producirá un overflow (desbordamiento o derrame) sobre el equipo, es por eso que el software permite predecir el volumen exacto necesario para un barrido desde un pH inicial. Se deja en el sonicador la solución de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@CTAB$  vertida en el recipiente de forma tubular (ver Fig.3.7) por diez minutos para agitar y dispersar las nanopartículas funcionalizadas por modificación de ligandos. Es importante que la solución tenga una concentración adecuada, ya que si la muestra está muy diluida, la medida de titulación no podrá ser llevada por el efecto overflow como se mencionó anteriormente. Luego 8 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  es mezclado con 2 mL de solución de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@CTAB$ . En el software Zeta-sizer aparece una opción donde se observa el valor actual del pH en la solución con ayuda del pH-metro (ver Fig.3.8).

El valor inicial del pH fue 7, por tanto se regulo el pH con HCl (0.1 M) hasta 3.2 para empezar la medida con un paso de uno hasta un pH=12 (medio básico). Se utilizaron tres soluciones de 0.01 M de HCl, 0.1 M y 0.01 M de NaOH. El índice de refracción y absorbancia del material son tomados en primera aproximación como sugerencia del software.

Sin embargo, es importante mencionar que estos dos parámetros mudan de acuerdo al tipo de síntesis y detalles de la pre-síntesis y podrían ser calculados satisfactoriamente utilizando

un refractómetro. Nótese que se utilizaron dos soluciones de medio básico ya que el barrido va de medio ácido a básico, las soluciones básicas ayudan a tener una estabilidad en dicho medio. Una barra magnética es introducida en el recipiente tubular ya que el equipo posee un agitador en la base que ayuda a que las nanopartículas en solución no decanten y estén bien dispersas en el coloide.

Se realizan 5 medidas por pH (para obtener una buena estadística), después se realiza un barrido de pH = 3.2 a 4.22 y así sucesivamente hasta un pH = 12. La solución muestra sensibilidad al cambio del pH, por tal se deshabilitó el tubo con NaOH (0.1 M) pues era una solución muy concentrada y hacia un barrido muy rápido de un pH bajo a un pH alto sin conservar los pasos de uno en uno.

Los tamaños, distribución y potencial  $\zeta$  de las NPM fueron determinados utilizando un equipamiento Zetasizer (**Nano-ZS90, Malvern Instruments Ltd., U.K.**), el cual está basado en el principio de dispersión dinámica de la luz. Para las medidas, 25  $\mu\text{L}$  de una solución con concentración de 1 mg/ml fue adicionada a 3 mL de agua destilada y ultra sonicación fue aplicada por 30 s. Para determinar los tamaños de partícula y distribución en la suspensión coloidal las medidas fueron evaluadas por 3 min a 25  $^{\circ}\text{C}$ , obteniendo el promedio de la data correspondiente a 3 medidas. Similarmente, el potencial zeta de las nanopartículas fue calculado sobre el promedio de 3 lecturas (cada lectura = 30 runs).

### 3.6. Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (NTA)

El Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA por sus siglas en inglés: Nanoparticle tracking analysis) es un método para la visualización y el análisis de partículas en líquidos que relaciona la velocidad del movimiento browniano al tamaño de partícula. La velocidad de movimiento se relaciona únicamente con la viscosidad y la temperatura del líquido; no está influenciada por la densidad de partícula o índice de refracción. NTA permite la determinación de un perfil de distribución de tamaño de partículas pequeñas con un diámetro de aproxima-

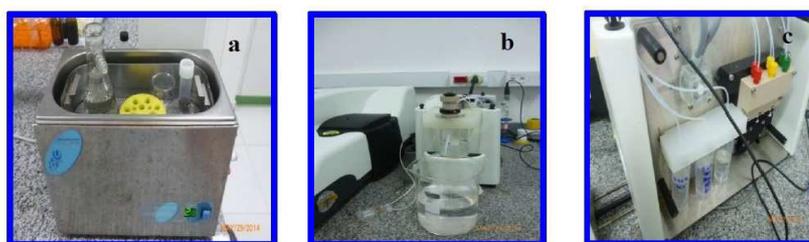


Figura 3.7: (a) Muestra diluida debe ser agitada por 10 minutos (b) El portamuestra debe ser lavado al menos 3 veces (c) Las soluciones tampón deben ser calibradas antes del experimento.



Figura 3.8: (a) Vista frontal del equipamiento con sus respectivas soluciones tampón (b) Proceso de lavado del electrodo con agua ultrapura y anteriormente almacenado en una suspensión de KCl (3M) con el objetivo de la conservación del mismo (c) Equipamiento listo y realizando las medidas de titulación.

damente 10-1000 nanómetros (nm) en suspensión líquida.

La técnica se utiliza en conjunto con un ultramicroscopio y una unidad de iluminación láser, los cuales permiten analizar las pequeñas partículas en suspensión líquida bajo movimiento browniano. La luz dispersada por las partículas se captura mediante una cámara CCD o EMCCD varios fotogramas. Los programas informáticos utilizan entonces para seguir el movimiento de cada partícula de cuadro a cuadro. La velocidad de movimiento de las partículas está relacionada con un **radio hidrodinámico** equivalente a una esfera tal como se calcula a través de la ecuación de **Stokes-Einstein**. La técnica calcula el tamaño de partícula sobre una partícula por partícula base, la superación de las deficiencias inherentes en las técnicas de conjuntos tales como dispersión de luz dinámica. Las muestras requieren una preparación mínima, reduciendo al mínimo el tiempo requerido para procesar cada muestra.

NTA opera en la actualidad para las partículas de aproximadamente 10 a 1000 nm de diámetro, dependiendo del tipo de partícula. Análisis de partículas en el extremo inferior de esta gama es posible sólo para las partículas compuestas de materiales con un alto índice de refracción, como el oro y la plata. El límite de tamaño máximo está limitado por el movimiento browniano limitado de partículas grandes; porque una partícula grande se mueve muy lentamente, la precisión disminuye. La viscosidad del disolvente también influye en el movimiento de las partículas, y, también, juega un papel en la determinación del límite de tamaño superior para un sistema específico. NTA fue inventado por Bob Carr, fundador y director de tecnología de **NanoSight Ltd.**

Las medidas NTA fueron llevadas a cabo con un equipo **NanoSight 3.0** (NanoSight, Amesbury, United Kingdom), equipado con una cámara de muestra con un láser de 640 nm y una junta tórica de fluoro-elastómero Viton. Las muestras se inyectaron en la cámara de muestra con jeringas estériles (BD Discardit II, Nueva Jersey, EE.UU.) hasta que el líquido alcanzó la punta de la boquilla. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. El software utilizado para la captura y el análisis de los datos fue el **2.0 Build NTA 127**. Las

muestras se midieron durante 40 s con ajustes de obturación y la ganancia manual. El obturador y la ganancia de modo único fueron parámetros utilizados para capturar las nanopartículas magnéticas monodispersas recubiertas con CTAB. Se realizaron tres mediciones de la misma muestra.

## 3.7. Espectroscopía de Infrarrojo

El primer propósito de la Espectroscopía en el Infrarrojo es identificar los grupos funcionales presentes en la molécula. La Espectroscopía de Infrarrojo trabaja al analizar el número y la energía presentes en los fotones de Infrarrojo absorbidos por la molécula.

### 3.7.1. Tipos de vibraciones moleculares

Las posiciones relativas de los átomos en una molécula no son exactamente fijas, sino que fluctúan continuamente como consecuencia de una multitud de tipos de vibraciones y rotaciones diferentes alrededor de los enlaces en la molécula formando grupos funcionales característicos y relacionados a ciertas frecuencias en el rango infrarrojo (Tablas 3.2 y 3.3). Para una molécula sencilla diatómica o triatómica es fácil definir el número y la naturaleza de tales vibraciones, y relacionarlas con las energías de absorción. Sin embargo, en el caso de las moléculas poliatómicas, se torna complicado, un análisis de este tipo, no solo debido al gran número de centros de vibración que poseen las moléculas grandes, sino también por las interacciones que aparecen entre algunos centros y que se deben tener en cuenta. Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Una vibración de tensión supone un cambio continuo en la distancia inter-atómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son de cuatro tipos: de tijereteo, de balanceo, de aleteo y de torsión. Los distintos tipos de vibraciones se representan esquemáticamente en la Fig.3.9.

Se utiliza un blanco de tal forma que no interfiera con la medida FTIR. Por tal motivo, elegimos el Si (111) que posee un rango de vibración molecular fuera del IR y que no afecta con la colección de datos en la medida.

Se utilizó un espectrómetro FTIR, perteneciente al Laboratorio de Nanomedicina y Nanotoxicología del IFSC-USP, modelo **Nicolet iS50**, U.S.A ( Ver Fig.3.10), las medidas fueron llevadas a cabo en el modo transmisión para utilizando una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ , en una región de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ . Se pingo con una micropipeta una gota de ca.  $10\ \mu\text{L}$  sobre un sustrato de Si (111) y se seco en una estufa a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos. El mismo sustrato de Si fue utilizado para el crecimiento de los filmes **LbL**. Además, también se realizaron medidas FTIR en polvo

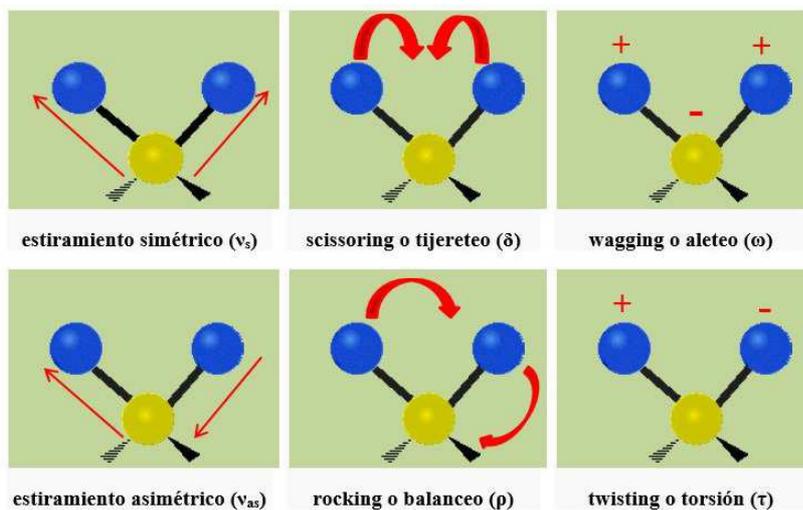


Figura 3.9: Tipos de vibraciones moleculares. Observación: + indica un movimiento del plano de la página hacia el lector; - indica un movimiento del plano de la página alejándose del lector.



Figura 3.10: Modelo FTIR Nicolet iS50.

Tabla 3.2: Regiones del espectro infrarrojo.

Región	Intervalo de longitud onda $\Delta\lambda$ ( $\mu\text{m}$ )	Intervalo de número onda $\text{cm}^{-1}$	Intervalo de frecuencias $\Delta\nu$ (THz)
Cercano	0.78-2,5	12800 a 4000	380-120
Medio	2.50-50	4000 a 200	120-6
Lejano	50-1000	200 a 10	6-0.3
La más utilizada	2.5-15	4000 a 670	120-20

utilizando una matriz en polvo de **Bromuro de Potasio (KBr)** y una prensa para formar pastillas transparentes homogéneas.

### 3.8. Espectrometría Ultravioleta-visible (UV-Vis)

El espectro electrónico de las soluciones fueron obtenidas usando un Espectrofotómetro Ultravioleta visible (UV-Vis) **Hitachi U2000** como se muestra en la Fig.3.11.

### 3.9. Espectroscopía Mössbauer

Los núcleos en los átomos sufren una gran variedad de transiciones de nivel energético, usualmente asociado con la emisión o absorción de un rayo gamma. En un átomo libre el retroceso del núcleo, debido a la conservación del momento, resulta en un rayo gamma emitido, siendo de menor energía que la energía de transición nuclear.

Por tanto, en estas circunstancias, emisión o absorción resonante no ocurre. En 1957, Rudolph Mössbauer descubrió el fenómeno de Fluorescencia de Resonancia Nuclear; un fenómeno que más tarde llegaría a ser comúnmente conocido como el Efecto Mössbauer. Para una descripción completa del Efecto Mössbauer, factor  $f$ , corrimiento isomérico, campos e interacciones hiperfinas véase [117].

Tabla 3.3: Tabla abreviada de las frecuencias de grupos orgánicos.

Enlace	Tipo de compuesto	Intervalo de frecuencias $\Delta\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensidad
C-H	Alcanos	2850-2970/1340-1470	Fuerte
C-H	Alquenos	3010-3095 675-995	Media Fuerte
C-H	Alquinos	330	Fuerte
C-H	Alquinos aromáticos	3010-3100 690-900	Media Fuerte
O-H	Alcoholes y Fenoles (monómeros)	3590-3650	Variable
	Alcoholes y fenoles (unidos por puentes de hidrógeno)	3200-3600	Variable, a veces ancha
	Ácidos carboxílicos (monómeros)	3500-3650	Media
	Ácidos carboxílicos (unidos por puentes de hidrógeno)	2500-2700	Ancha
N-H	Aminas, amidas	3300-3500	Media
C=C	Alquenos	1610-1680	Variable
C=C	Anillos aromáticos	1500-1600	Variable
	Alquinos	2100-2260	Variable
C-N	Aminas, amidas	1180-1360	Fuerte
	Nitrilos	2210-2280	Fuerte
C-O	Alcoholes, éteres, ácidos carboxílicos, ésteres	1050-1300	Fuerte
C=O	Aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres	1690-1760	Fuerte
NO <sub>2</sub>	Nitroderivados	1500-1570/1300-1370	Fuerte



Figura 3.11: Espectrofotómetro Ultravioleta visible (UV-Vis) Hitachi U2000.

## 3.10. Relajación

### 3.10.1. Relajación Espín-Red

Los estados electrónicos de un ión paramagnético son determinados por el Hamiltoniano de espín dados por la Eq.3.3 [117]:

$$\hat{H}_S = \hat{H}_{cf} + \hat{H}_Z + \hat{H}_{dd} + \hat{H}_{ex} + \hat{H}_{hf} + \hat{H}_Q \quad (3.3)$$

Aquí,  $\hat{H}_{cf}$  es el Hamiltoniano de espín del campo cristalino, el cual puede ser expresado por la Eq.3.4:

$$\hat{H}_{cf} = D[\hat{S}_z^2 - \frac{1}{3}S(S+1) + (\hat{S}_x^2) + \hat{S}_y^2] + \frac{1}{6}a[\hat{S}_\epsilon^4 + \hat{S}_\eta^4 + \hat{S}_\zeta^4 - \frac{1}{5}S(S+1)(3S^2 + 3S - 1)] \quad (3.4)$$

A temperaturas finitas, el campo cristalino es modulado debido a las oscilaciones térmicas de los ligandos. Esto resulta en la relajación espín red, e.d., transiciones entre los estados electrónicos inducidas por interacciones entre los espines iónicos y los fonones. La frecuencia de la relajación espín-red aumenta con el incremento de la temperatura debido a la dependencia de la temperatura de los estados fonónicos.

### 3.10.2. Relajación Espín-Espín

La Relajación Espín-Espín es primeramente inducida por las interacciones dipolar magnéticas entre los iones paramagnéticos. La tasa de relajación depende fuertemente de la concentración de los iones paramagnéticos en la muestra. La tasa de relajación puede ser expresada de acuerdo a la Eq.3.5:

$$R \approx |\langle i|H|f \rangle|^2 \varphi \quad (3.5)$$

Donde  $i$  y  $j$  son los estados del espín inicial y final,  $H$  es el Hamiltoniano del sistema y  $\varphi$  es un factor de fase.

### 3.10.3. Relajación superparamagnética y excitaciones colectivas

Los microcristales magnéticos con dimensiones por debajo de cierto tamaño crítico ( $\approx 50$  nm) se comportan como dominios magnéticos simples o monodominios, cuya energía de anisotropía magnética,  $E_{AM}$ , depende del volumen, superficie, forma, etc., del microcristal o partícula.

Los mínimos de  $E_{AM}$  de una partícula determinan las direcciones de fácil magnetización de la misma, de modo que  $E_{AM}$  puede expresarse respecto de estas direcciones en términos de los cosenos directores  $\alpha_x, \alpha_y, \alpha_z$  del vector de magnetización según la Eq.3.6:

$$E_{AM} = E_{AM}(\alpha_x, \alpha_y, \alpha_z) \quad (3.6)$$

En el caso más simple, como es el de una partícula con anisotropía uniaxial,  $E_{AM}$  puede expresarse según la Eq.3.7:

$$E_{AM}(\theta) = KV \text{sen}^2\theta \quad (3.7)$$

donde  $K$  es la denominada constante de anisotropía magnética,  $V$  es el volumen de la partícula y  $\theta$ , el ángulo entre una dirección de fácil magnetización y el vector de magnetización.

Los principales efectos relacionados con la  $E_{AM}$  de las partículas individuales son el superparamagnetismo y las excitaciones colectivas (Fig.3.12). Otros efectos, tales como el efecto de los átomos superficiales de la partícula o el efecto de interacción magnética entre partículas, pueden también ser significativos en el comportamiento magnético de los microcristales. Para un estudio detallado de estos conceptos véase [117].

Las medidas por Espectroscopía Mössbauer fueron llevadas a cabo en el Instituto de Física de Materia Condensada, perteneciente a la Universidad Técnica de Braunschweig, utilizando un espectrómetro convencional de transmisión Mössbauer, operativo con 1024 canales y un

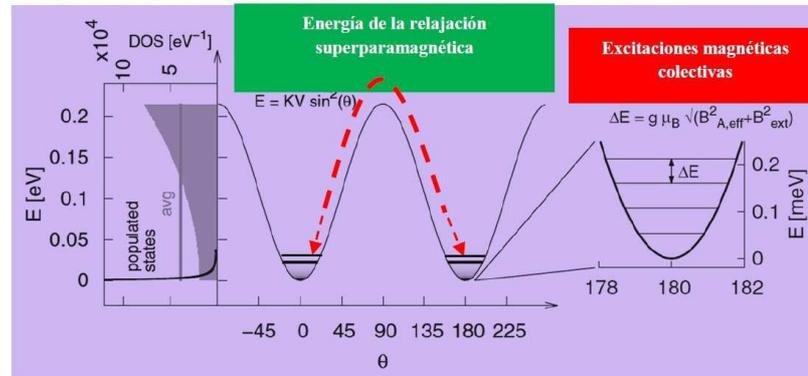


Figura 3.12: Esquema de las fluctuaciones del vector de magnetización de un microcristal uniaxial  $E(\theta)$ : energía asociada con la desviación  $\theta$  del vector de magnetización respecto de una dirección de fácil magnetización. spm: superparamagnetismo, emc: excitaciones magnéticas colectivas.

modulador de velocidad sinusoidal (Fig.3.13). Las medidas fueron obtenidas a diversas temperaturas y los datos obtenidos fueron ajustados con la ayuda del programa *Mathematica*. En este programa, el ajuste es controlado por el valor del  $\chi^2$ . La fuente empleada fue de  $\text{Co}^{57}$  embebida en una matriz de Rodio con una actividad de 5 mCi. Los corrimientos isoméricos y la escala de velocidad fueron calibrados con respecto a una lámina de  $\alpha\text{-Fe}$  a temperatura ambiente.

El criostato utilizado fue un criostato estandar con flujo de He (Cryovac), apropiado para un rango de temperaturas entre 2.5-350 K.



Figura 3.13: Espectrómetro Mössbauer utilizado.

### 3.11. Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR)

De la condición de Frecuencia de Bohr:  $\Delta E = h\nu = g\mu_B B$  se observa que la frecuencia requerida para que la transición ocurra es alrededor de 2.8 MHz por Gauss de campo magnético aplicado. Esto conlleva a que la radiación electromagnética requerida pertenece a la región de microondas. Para radicales orgánicos el campo magnético utilizado se encuentra en la región de 3400 Gauss y la frecuencia pertenece a la región microonda del espectro electromagnético ( $\nu \approx \mathbf{9-10\ GHz}$ ). Esta corresponde a la longitud de onda de 3.4 cm, aproximadamente; y es conocido como la frecuencia de banda-X. Otras frecuencias comúnmente usada (y comercialmente disponible) incluyen las siguientes bandas: banda-L ( $\nu \approx \mathbf{0.8-1.2\ Hz}$ ), banda-S ( $\nu \approx \mathbf{3.4-3.8\ Hz}$ ), banda-K ( $\nu \approx \mathbf{24\ GHz}$ ), banda-Q ( $\nu \approx \mathbf{34\ GHz}$ ) y banda-W ( $\nu \approx \mathbf{94\ GHz}$ ).

En EPR, la componente magnética de la radiación electromagnética aplicada (microonda) interacciona con los momentos magnéticos permanentes creados por el electrón. En muchas otras técnicas espectroscópicas, los momentos dipolares eléctricos o permanentes en la muestra interaccionan con la componente del campo eléctrico de la radiación electromagnética. Otra diferencia es el montaje experimental de la técnica, el cual es basado en una fuente de radiación monocromática acoplado con un campo magnético variable. En otras palabras el espectro EPR es esencialmente un gráfico de la derivada de la absorción microonda (a frecuencia constante) como una función del campo magnético aplicado.

Los espectros EPR fueron obtenidos en el rango de temperaturas de 4 K a 300 K en un **Espectrometro Bruker Elexsys9 E580** (Fig.3.14) operativo en la banda X y frecuencia de microondas 9.488 GHz, perteneciente al Laboratorio de Resonancia Magnética, Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos-USP, SP-Brasil. La temperatura fue controlada por un flujo continuo de helio líquido almacenado en un sistema **criogénico Oxford, modelo ITC503**.

### 3.12. Técnicas Electroanalíticas

#### 3.12.1. Cronoamperometría

La cronoamperometría es una técnica electroanalítica con la cual se mide, en función del tiempo, la corriente que atraviesa un electrodo. Esta a su vez es parcialmente útil en procesos redox donde el transporte de masa es solo controlado por difusión, el cual se desarrolla en la región situada a una distancia  $d$  de la superficie del electrodo (e.d., en las vecindades de la superficie), por lo que es necesario que la solución analítica no se agite y que se mantenga a



Figura 3.14: Equipo de Resonancia Paramagnética Electrónica.

temperatura constante (de tal forma que se evite la formación de gradientes térmicos). Si se cumplen estas condiciones, entonces el electrodo de proceso se rige por la ecuación de Cottrell (Eq.3.8), en la cual se expresa la relación entre la corriente  $i$  (farádica) que circulan en la celda y el tiempo de aplicación del paso de potencial [72].

$$i(t) = \frac{nFACD^{\frac{1}{2}}}{\pi^{\frac{1}{2}}t^{\frac{1}{2}}} = kt^{-\frac{1}{2}} \quad (3.8)$$

En donde:  $n$  es el número de electrones,  $F$  es la constante de Faraday,  $A$  es el área del electrodo,  $C$  es la concentración y  $D$  es el coeficiente de difusión.

### 3.12.2. Voltametría Cíclica (VC)

La técnica de Voltametría Cíclica (VC) consiste en ciclar el potencial de un electrodo (Fig.3.15), el cual está inmerso en una solución sin agitación, y que nos permite medir la corriente resultante. El potencial de este electrodo de trabajo es controlado por un electrodo de referencia como un electrodo de calomelano saturado (saturated calomel electrode-SCE) o un electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl). El potencial controlado el cual es aplicado a través de los dos electrodos puede ser considerado una señal de excitación. La señal de excitación en VC es un potencial lineal con forma de onda triangular. Esta señal de excitación de potencial triangular, se extiende por el potencial del electrodo entre dos valores.

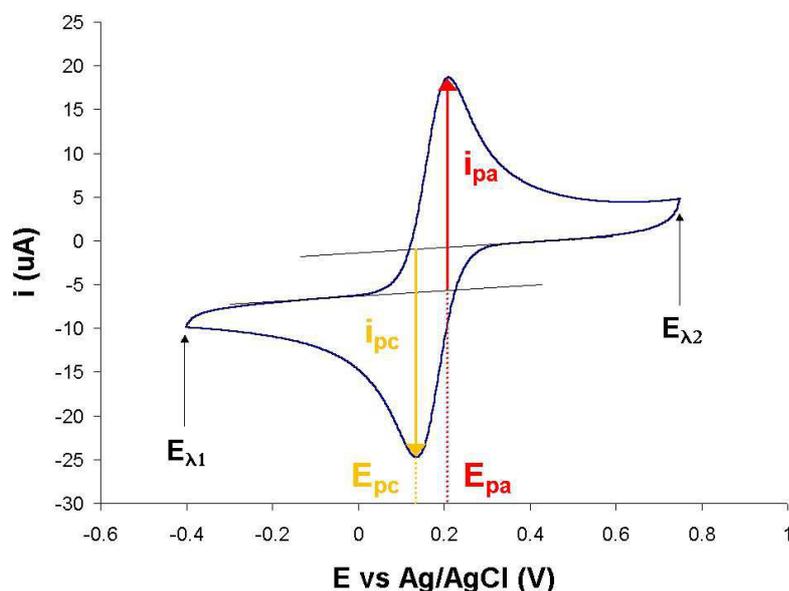


Figura 3.15: Dos máximos característicos en sistemas rápidos [72].

### 3.13. Medidas Electroquímicas

Las medidas electroquímicas fueron llevadas a cabo en un potentiostato/galvanostato (Autolab, Princeton, U.K.) perteneciente al Laboratorio de Nanomedicina y Nanotoxicología del IFSC-USP, usando una celda convencional de tres electrodos (Fig.3.16). Los filmes de 2-bicapas LbL de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB/PSS fueron utilizados como electrodos de trabajo. Como referente y contra electrodo, usamos Ag/AgCl/KCl (3M) y una placa de platino (0.5 cm x 1 cm), respectivamente. Voltagramas cíclicos respuestas Crono-amperométricas fueron registradas en una celda de volumen de 10 mL. Las medidas Crono-amperométricas fueron llevadas a cabo bajo un potencial aplicado de -0.2 V (vs. Ag/AgCl) bajo sucesivas adiciones de ácido cítrico 50  $\mu\text{M}$ . Todos los experimentos fueron evaluados a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). La solución de ácido cítrico fue preparada en una solución tampón de fosfato (0.1 M, pH 7.0). La corriente de respuesta fue almacenada después de ca. 1 min. Antes de cada medida, la solución fue cuidadosamente agitada por 1 minuto (para preservar la homogeneidad de la solución) y el sistema fue puesto en modo de circuito abierto. Todas las soluciones de ácido cítrico fueron preparadas antes de cada experimento (excepto para los experimentos dinámicos). Además se estudió la respuesta dinámica del ácido cítrico de los filmes de 2-bicapas LbL de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB/PSS en una solución bajo agitación.

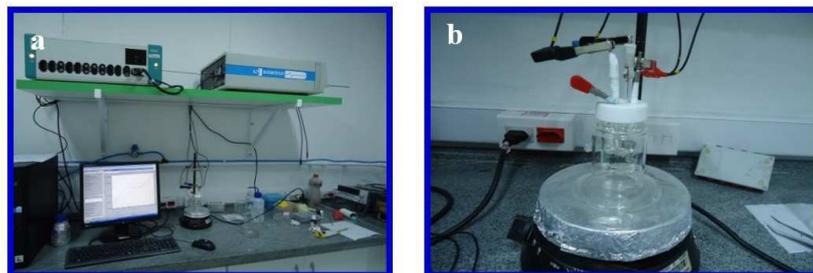


Figura 3.16: (a) Potenciostato/galvanostato (Autolab, Princeton, U.K.) (b) celda convencional de tres electrodos.

## 3.14. Tratamiento de las células SAOS-2 con nanopartículas

### 3.14.1. Cultura celular

La línea de células SAOS-2 fue suministrada por un Banco de Células de Río de Janeiro (Río de Janeiro - Brasil). SAOS-2 es una célula epitelial de la médula del Homo sapiens, que se cultivaron en 5A de McCoy (Vitrocell, Campinas, Brasil) medio modificado con 1.5 mM de L-glutamina y 2200 mg/L de bicarbonato de sodio y suero fetal bovino a una concentración final de 10%. Las células se mantuvieron en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C y la renovación medio de 1 a 2 veces por semana y la relación de sub-cultivo de 1: 2 a 1: 4. (Vea Fig.3.17/sala de cultivo).

### 3.14.2. Incubación del Nanomaterial en células de SAOS-2

Para todos los experimentos, SAOS-2 células fueron cultivadas en 96 pocillos o placas de 24 pocillos de una placa inicial de  $1 \times 10^5$  células por pocillo durante 24 h antes de separar el medio de crecimiento y se reemplaza con medio de cultivo fresco que contiene nanomaterial. Los nanomateriales utilizados para las pruebas fueron: A-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ; B-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HAP}$ ; C-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@}\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ; D- nanoHAp y E- macroHAp. Cada nanomaterial se añadió a las células a concentraciones de 25, 75 y 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se incubaron durante 2, 12 y/o 24 h dependiendo de la prueba.

### 3.14.3. Ensayos Citotóxicos

La citotoxicidad se evaluó mediante el ensayo de cristal violeta. Después de la incubación de células SAOS-2 con nanomateriales para 12 y 24 h, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de solución de etanol (70%) a cada pocillo durante 10 min. Se añadió 60  $\mu\text{L}$  de cristal violeta (Sigma-Aldrich, Brasil) a cada pocillo. Después de que las células SAOS-2 se incubaron durante 30 min en presencia



Figura 3.17: Sala de cultura del Laboratorio de Nanomedicina y Nanotoxicología del IFSC-USP-Brazil.

de 0.5% de cristal violeta, los pocillos se lavaron exhaustivamente con tampón fosfato salino (PBS), y 100  $\mu\text{L}$  de SDS al 1% se añadió a cada pocillo durante 30 min de incubación.

Después de la solubilización del cristal violeta, se midieron las densidades ópticas a 540 nm con un lector de ELISA (Dy nex). La viabilidad celular se expresó como el porcentaje relativo a las células de control no tratadas.

#### 3.14.4. Inhibición del ensayo de adhesión celular

Para la inhibición de las pruebas de adhesión celular, el colágeno tipo I (10 g/pocillo) se inmovilizó sobre placas de 96 pocillos durante 12 horas a 4 °C. Los pocillos se bloquearon con una solución de albúmina de suero bovino (BSA al 1% solubilizado en 200 mL/pocillo de la solución tampón: HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl 25 mM y 0.25 mM de  $\text{MnCl}_2$ , pH 7.4, 200 ml/pocillo) durante 2 h. La etapa de bloqueo se realizó para asegurar que las proteínas de adhesión celular se inmovilizaron sólo en los pozos debido a BSA no afecta a la adhesión celular.

La segunda etapa consistió en la incubación de las células SAOS-2 ( $1 \times 10^5$  células/pocillo) con los nanomateriales para 30 min a 37 °C en tubos Eppendorf. Estas células SAOS-2 se transfirieron a placas de 96 pocillos y se incubaron durante 60 min a 37 °C. Después de lavar los pocillos con tampón de adhesión para eliminar las células no adherentes, las células restantes se fijaron con etanol al 70% (100 mL) durante 10 min. Las células adherentes se tiñeron con

0.5 % de cristal violeta (60  $\mu\text{L}$  durante 20 min). A continuación, los pocillos se lavaron varias veces con PBS para eliminar el exceso de tinte. Finalmente, las células teñidas se solubilizaron en SDS al 1% (100 mL) durante 30 min. Las densidades ópticas a 540 nm se midieron en un lector de ELISA (Dynex). Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado en tres experimentos independientes.

### 3.14.5. Generación intracelular de ROS

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células de SAOS-2 se determinó utilizando la oxidación de 2', 7'- diacetato dichlorodihydrofluorescein (H2DCFDA) de Sigma-Aldrich, Brasil.

El medio de cultura de los pozos fue removido y reemplazado con 100  $\mu\text{L}$  de los nuevos medios que contengan nanomateriales. Después de 2 horas de incubación con los nanomateriales, el cual fue un tiempo suficiente para estimular la producción de ROS intracelular, las células fueron lavadas 3 veces con PBS para eliminar los nanomateriales entrantes. Las células fueron incubadas con 100  $\mu\text{L}$  de H2DCFDA (5  $\mu\text{M}$  en PBS) a 37 °C durante 30 minutos. Después de esto, los pocillos se lavaron dos veces en PBS para eliminar el exceso de colorante y 200  $\mu\text{L}$  de PBS se añadieron a cada pocillo. Se midió la fluorescencia con excitación a 485 nm y emisión a 530 nm. Las intensidades de fluorescencia de las células tratadas se representan como unidades de fluorescencia relativa (RFU). Para el control positivo las células fueron tratadas con 50 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y para el control negativo no se realizó ningún tratamiento sobre las mismas.



## Capítulo 4

# Preparación de las muestras

Diversos métodos han sido propuestos para la síntesis de NPM de magnetita y maghemita. La más conocida y utilizada es la ruta de co-precipitación. Sin embargo, NPM obtenidas por este método poseen poca estabilidad en medio acuoso [15], ya que al carecer de carga superficial debido a su carácter hidrófobo tienen una alta tasa de sedimentación por lo cual floculan o precipitan rápidamente. Es importante resaltar que al no estar estabilizadas electrostáticamente la interacción dipolar no es lo suficientemente fuerte para mantenerlas dispersas en medio acuoso.

Ahora bien el método de síntesis hidrotermal produce NPM con buena estabilidad pero con mucha rugosidad superficial y altas presiones [43], siendo este método uno de los más caros a ser optados para la síntesis y funcionalización. Por otro lado, debido a que la gran área superficial que poseen las NPM contribuye al incremento de la interacción tipo dipolo-dipolo entre ellas. Este tipo de interacción tiende a aglomerar y flocular el sistema coloidal, lo cual algunas veces no es deseable para aplicaciones biomédicas [15].

Por tal motivo, la funcionalización de nanopartículas con agentes que inhiban este comportamiento no-estable en medio acuoso debe ser evaluado. Algunas rutas para funcionalizar nanopartículas magnéticas son llevadas a cabo mediante reacción de intercambio; la cual fue descrita en el Capítulo 2 de la presente Tesis, proceso que consiste en reemplazar los polímeros o surfactantes enlazados inicialmente en la superficie de las NPM sin cambiar o modificar la fase previa, la cual contiene las nanopartículas suspendidas en estado coloidal [49].

Por otro lado, las reacciones de modificación de ligandos cambian totalmente el comportamiento de la fase adicionada en principio a la superficie de las NPM al enlazar una capa hidrófila en vez de la hidrófoba inicialmente presente. Este proceso ha sido llevado a cabo en NPM para cambiar las capas hidrófobas de ácido oleico (AO)/Oleilamina (OAM) presentes en la superficie de las NPM con los estabilizadores hidrófilos: dopamina (DPA) y polietileno

glicol (PEG) en medio acuoso [118].

Una ruta más sencilla para modificar la fase hidrófoba presente en la superficie de las NPM puede ser llevada a cabo utilizando el surfactante Cetiltrimetilamonio (CTAB) el cual ayuda a incrementar la estabilidad de las NPM en solución acuosa.

Por tanto, en este capítulo se propone el cambio de fase, polaridad y estabilidad en medio acuoso por medio del recubrimiento de las NPM con el surfactante CTAB, cuyas cadenas apolares interaccionan con los estabilizantes, dejando los grupos polares expuestos y proporcionando estabilidad en medio acuoso.

## 4.1. PRIMERA PARTE

### 4.1.1. Reactivos

Todos los reactivos químicos utilizados en esta parte fueron de grado analítico y utilizados sin ninguna purificación extra.  $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ , ácido úrico, Oleilamina, ácido oleico, Ciclohexano, CTAB,  $\text{KOH}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  fueron comprados de Sigma Aldrich. El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30 %) y  $\text{NaOH}$  fueron comprados de Synth. El agua ultrapura usada para la síntesis de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@CTAB$ , crecimiento de los filmes LbL y experimentos electroquímicos fue obtenida de sistema de agua ultrapura (Megapurity System, resistividad de 18.3  $\text{M}\Omega\text{ cm}$ ).

Los sustratos de vidrio cubiertos con FTO (Sigma-Aldrich) fueron utilizados debido a su bajo costo y superficie anfótera. Los sustratos de FTO fueron limpiados por sonicación secuencialmente en: acetona, etanol, alcohol isopropílico y una solución de  $\text{NaOH}$  durante 10 minutos cada una. Luego, los sustratos fueron lavados con agua deionizada y secados bajo flujo de  $\text{N}_2$ .

### 4.1.2. Síntesis de NPM de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ vía descomposición térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$

Una solución de  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  de 0.7 g y 2.58 g de 1,2-hexadecanediol fue disuelta en 20 mL de bencil éter a 100 °C bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ , para evitar la oxidación e hidroxilación de la especie [119,120], y bajo agitación magnética. Después de 30 minutos, 1.97 mL de ácido oleico (AO) y oleilamina (OAM) fueron adicionados. El sistema fue mantenido a 300°C, durante dos horas bajo vigorosa agitación (Figs.4.1, 4.2, 4.3 y 4.4).

Luego el calentamiento fue retirado. Cuando el sistema alcanza la temperatura ambiente (RT), la misma cantidad de etanol absoluto (100 %) fue adicionado. Las partículas fueron separadas magnéticamente y suspendidas en ciclohexano.

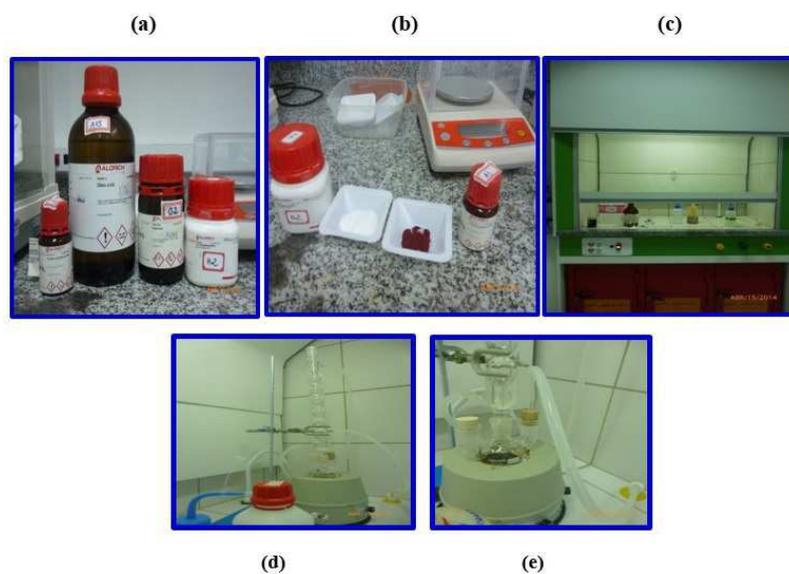


Figura 4.1: (a) Reactivos utilizados para la síntesis de descomposición térmica  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  (b) Estimación de las masas a utilizar en las reacciones químicas con sensibilidad E-4 (c) Capela o campana utilizada para la extracción de gases tóxicos formados durante el proceso de reacción química. (d) vista del equipo de condensación o de reflujo. (e) aproximación de la imagen (d) donde se observa la mezcla de  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  y 1,2 hexadecanol solubilizados en solvente orgánico (bencil éter).



Figura 4.2: (a) Introducción de los agentes estabilizantes, Oleilamina y ácido oleico en la solución orgánica. (b) Control de temperatura en la síntesis con un termómetro digital. (c) solución final obtenida y suspendida en etanol absoluto.



Figura 4.3: (a) NPM obtenidas inmediatamente después del tiempo de síntesis. (b) NPM suspendidas en etanol absoluto. (c) NPM son decantadas con ayuda de un imán en la base del becker para ser sometidas al proceso de lavado.

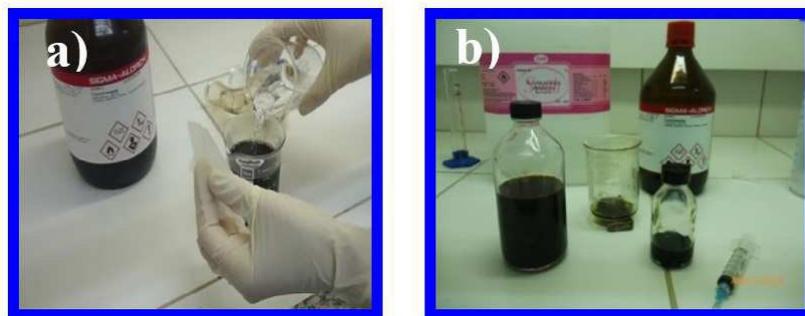


Figura 4.4: (a) NPM suspendidas en ciclohexano. (b) Esquema final de las NPM obtenidas suspendidas en etanol absoluto y en ciclohexano.

### 4.1.3. Modificación de ligandos en la superficie de las NPM de $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Una solución con 9 mL de CTAB (0.1 mol/L) fue mezclada con 2 mL de isopropanol bajo vigorosa agitación, 700  $\mu\text{L}$  de NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  suspendidas en ciclohexano fueron adicionados. El sistema fue mantenido por 3 horas en el baño sonicador (siendo agitado cada 15 minutos). Luego, el sistema fue agitado magnéticamente a 35 °C manteniendo el frasco abierto hasta que el isopropanol y ciclohexano fueran completamente evaporados alcanzando un estado hidrófilo en forma de micro-emulsión (Figs. 4.5, 4.6 y 4.7).

## 4.2. SEGUNDA PARTE

### 4.2.1. Reactivos

Los reactivos  $\text{FeO}_4\text{S} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$ (28-30 %), ácido cítrico (AC),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , NaOH, CTAB y macro-HAP fueron todos de grado analítico y obtenidos de Sigma Aldrich sin ninguna purificación posterior. Los reactivos utilizados para el cultivo celular son descritos en la parte experimental. El agua ultrapura utilizada en todos los experimentos (resistividad de 18.3  $\text{M}\Omega\text{cm}$ ) fue obtenida de un sistema de agua Milli-Q (Millipore Inc.).



Figura 4.5: (a) Solución de CTAB. (b) Preparación de la solución de NPM con isopropanol y CTAB. (c) Sonicar por tres horas.

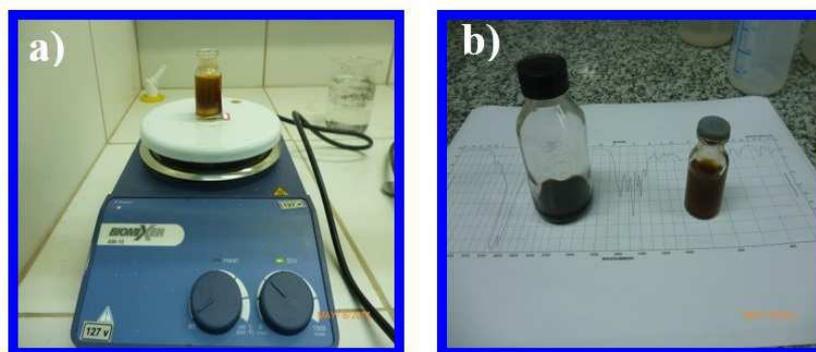


Figura 4.6: (a) Agitar a 35 °C. (b) NPM en estado hidrófobo e hidrófilo.

#### 4.2.2. Funcionalización de nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con HAP

En un experimento típico de co-precipitación, 25 % de solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10 mL) fue depositado gota a gota en una solución acuosa con 1.85 mmol de  $\text{FeO}_4\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 3.7 mmol de  $\text{FeCl}_3$  bajo vigorosa agitación mecánica. La reacción fue calentada a 80 °C por 30 minutos. La dispersión magnética fue agitada por una hora y media a 90 °C después de la adición de una solución de ácido cítrico (0.1 M), pH del medio = 5, no precisa que sea gota a gota la introducción de esta solución.

Nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) fue burbujeadado a través de la reacción. Subsecuentemente, las nanopartículas fueron separadas magnéticamente con ayuda de una barra magnética en la base del becker y lavadas repetidas veces. Luego las nanopartículas fueron re-dispersas en suspensión acuosa (25 mL) (Fig.4.8).

Después, 50 mL de solución acuosa (pH=11) con 33.7 mmol de nitrato de calcio tetra hidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) y 20 mmol de fosfato de sodio di-básico ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) fueron adicionados gota a gota en la suspensión magnética obtenida por 30 minutos bajo agitación constante. La solución lechosa fue calentada a 90 °C por dos horas, la mezcla resultante es dejada enfriar a temperatura ambiente y dejada durante toda la noche. El precipitado marrón claro formado fue filtrado y lavado repetidamente con agua mili-Q, y secada en una estufa a 60 °C (Figs.4.9 y 4.10).

Finalmente, las grajeas obtenidas luego del proceso de secado fueron molidas delicadamente con un mortero o cristal de ágata con el fin de obtener un polvo fino que posteriormente fue calcinado a 400 °C por 3h con una tasa de ascenso de 1.5 °C/min (Fig.4.11).

El ácido cítrico es usado para dar estabilidad en solución acuosa a nanopartículas metálicas y magnéticas [121]. Además, es utilizado para transferir fases hidrófobas presentes inicialmente sobre la superficie de nanopartículas magnéticas vía ATRP [49]. Es conocido que los tres grupos carboxílicos que forman la estructura molecular del ácido cítrico se separan a momento

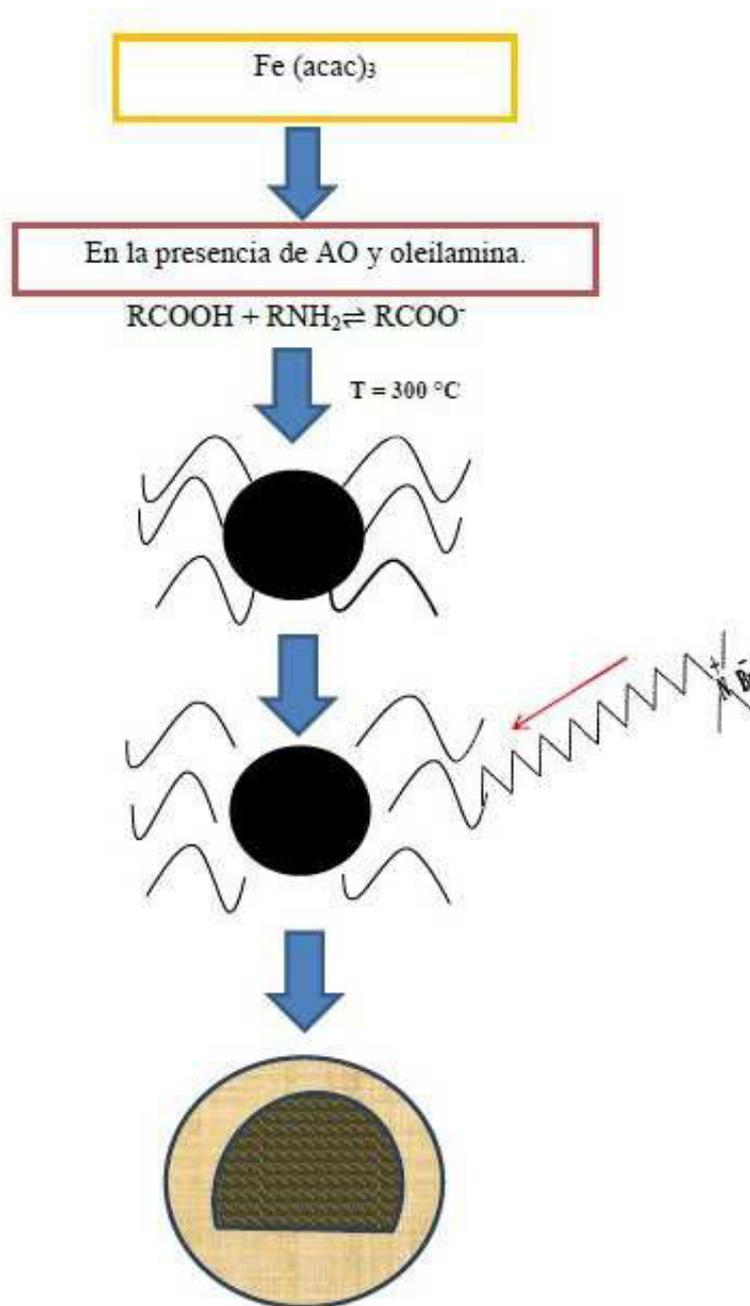


Figura 4.7: Diagrama utilizado en la funcionalización y modificación de ligandos en la superficie de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . La esfera negra representa el núcleo del óxido férrico, mientras que las siluetas en forma ondulada se asigna a las cadenas apolares del surfactante.



Figura 4.8: (a) Reactivos de grados analíticos utilizados en la preparación de las muestras (b) Preparación de las NPM utilizando el método de co-precipitación.

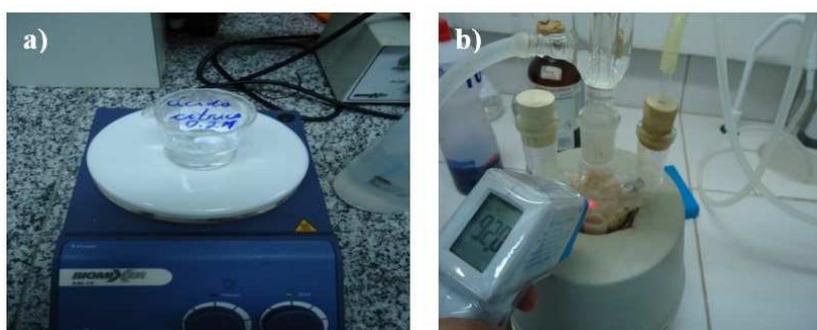


Figura 4.9: (a) Preparación de la solución molar de ácido cítrico (0.1 M) (b) Funcionalización de las NPM con HAp.

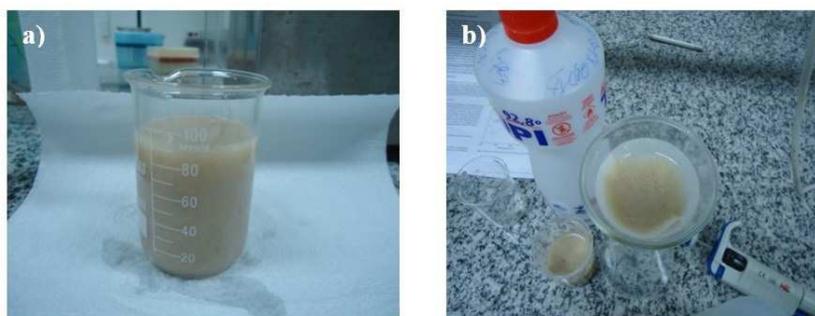


Figura 4.10: (a) Solución lechosa obtenida después del proceso de síntesis (b) Proceso de filtrado de las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HAp}$ .

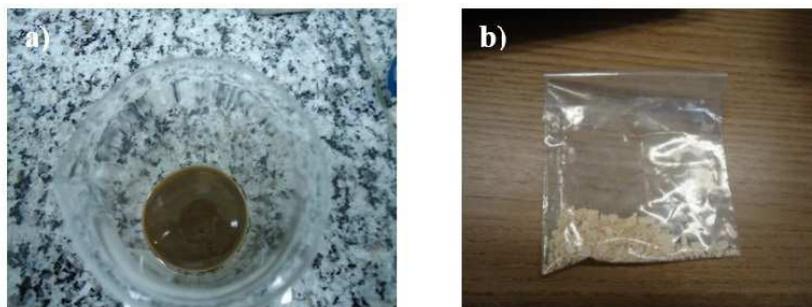


Figura 4.11: (a) Nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HAp}$  obtenidas luego del proceso de lavado y filtrado (b) Polvo obtenido luego del calcinado a  $400\text{ }^\circ\text{C}$  durante un periodo de 3 h.

de interactuar con la superficie de las nanopartículas dando estabilidad y carga negativa en medio acuoso vía interacción no-covalente del tipo ión dipolo [122].

Tabla 4.1: Resumen de las muestras preparadas en esta Tesis.

Denominación	Núcleo	Recubrimiento
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@OAM/OA}$	$\text{Fe}_3\text{O}_4$	Ácido oleico y oleilamina
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@CTAB}$	$\text{Fe}_3\text{O}_4$	CTAB
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Ácido cítrico
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HAp}$	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	HAp
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@}\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Difosfato de dicalcio
Nano-HAp	HAp	Sin recubrimiento

Siguiendo este concepto, tratemos de explicar el mecanismo que ocurre al momento de hacer funcionalizar con la nanoHAp. Por tal, un modelo de reacción de condensación es propuesto para explicar la formación de este complejo nanocomposito (Fig.4.12). En esta reacción los grupos hidróxilos permiten a las especies interactuantes reaccionar formando moléculas de agua y dejando los átomos de O libres, los cuales tienen gran afinidad a los grupos fosfatos, generando así el enlace en la estructura de la HAp.

Para la muestra  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  (difosfato dicalcio) se varió la concentración de la solución inicial, la cual contenía 10 mL de solución acuosa ( $\text{pH}=11$ ) con 33.7 mmol de nitrato de calcio tetra-hidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) y 20 mmol de fosfato de sodio di-básico  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,

siendo estos dos últimos gota a gota en la suspensión magnética (25 mL) obtenida por 30 minutos bajo agitación constante. La solución lechosa fue calentada a 90 °C por dos horas, la mezcla resultante es dejada enfriar a temperatura ambiente (TA) y dejada durante toda la noche. El precipitado marrón claro formado fue filtrado y lavado repetidamente con agua mili-Q, y secada en una estufa a 60 °C. Finalmente, las grajeas obtenidas luego del proceso de secado fueron molidas delicadamente con un mortero o cristal de agata con el fin de obtener un polvo fino que posteriormente fue calcinado a 400 °C por 3h con una tasa de ascenso de 2.5 °C/min (Fig. 4.11). Como se mostrara más adelante esta rampa o tasa de ascenso en la temperatura juega un rol crucial en la formación de la HAp y sus fases secundarias como la fase de difosfato de calcio ( $\beta$ - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) también formada para una concentración de iones fosfato y calcio diferentes - Vease Tabla 4.1.

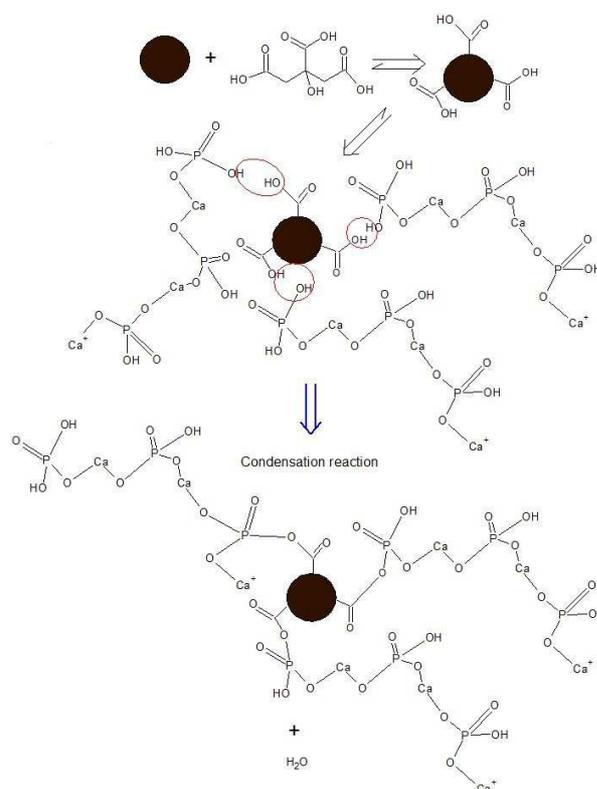


Figura 4.12: Modelo de la reacción de condensación llevada a cabo entre  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y HAp.



## Capítulo 5

# Resultados

### 5.1. NPM como sensores no-enzimáticos

En esta parte se estudiará el sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB utilizando diversas técnicas espectroscópicas, así como su posterior aplicación en el desarrollo de un sensor no-enzimático para la detección del  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### 5.1.1. Difractometría de rayos-X

El patrón de difracción en polvo de Rayos-X es mostrado en la Fig.5.1. Este muestra una fase espinel inversa característica de la estructura cúbica de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Los planos de Miller han sido indexados usando la carta cristalográfica JCPDS 85-1436. Los picos anchos están asociados al tamaño nanoscópico de los cristalitas. El difractograma en polvo de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  exhibe los siguientes picos de difracción a  $2\theta = 30.6, 35.5, 43.4, 53.8, 57.3, 62.7, 71.2$  y  $74.8^\circ$ . Estos picos son asignados a la dispersión de las moléculas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  con espaciamiento interplanar regular [123].

Antes de realizar un refinamiento a la data obtenida, estudiaremos un modelo propuesto por Kim *et al.* [124] basado en la deconvolución del pico 511 de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , el puede dar en base a las áreas de las curvas de ajuste la relación o radio porcentual entre ambas especies difícil de identificar a primera instancia en un difractograma de rayos-X debido a su estructura estequiométrica tan similar y al ensachamiento de los picos a escala nanométrica. Al ampliar la región comprendida entre  $2\theta = 55\text{-}60^\circ$  con radiación  $\text{Cu } K_{\alpha 1}$ , y al realizar un ajuste con dos gaussianas utilizando el software Origin 8.0 (Fig.5.2a) se observa que la posición para el pico 511 de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  coincide con la descripción teórica (PDF 85-1436) a  $2\theta = 56.96^\circ$ , mientras un pico a  $2\theta = 57.9^\circ$ , característico de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  siguiendo el PDF 39-1346 es observado, sin embargo la razón entre las áreas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  es de 2/1, lo cual indicaría que existe un

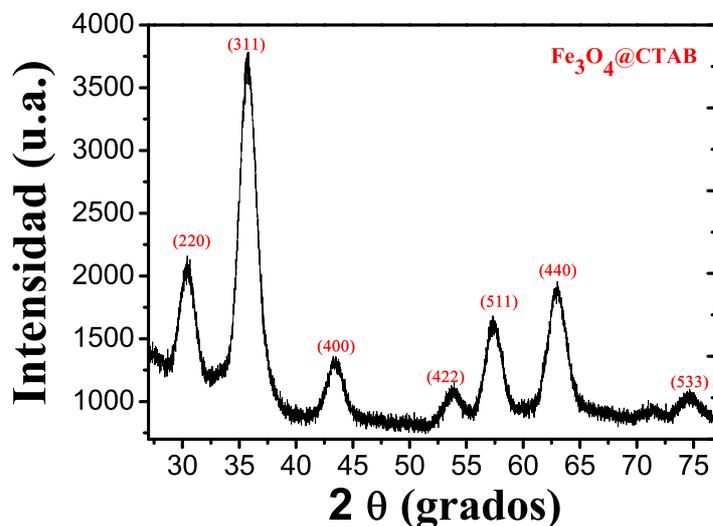


Figura 5.1: Difractograma indexado para el sistema de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

50% de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , lo cual no es lógico pues según la Ref. [124] para este porcentaje tendríamos una clara coexistencia de dos picos de difracción uno para la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y otra para la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  donde se observaría un alargamiento del pico 511 hacia la derecha. Por tanto se realiza el ajuste con un solo pico, el cual muestra efectivamente que la posición para el pico 511 coincide con la posición angular para la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a  $2\theta = 57.3^\circ$  con PDF 88-0315 (Fig.5.2 b). Recalcando que la muestra en solución conserva su estado inicial,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , esto es mostrado al analizar el espectro FTIR en la sección 4.9.

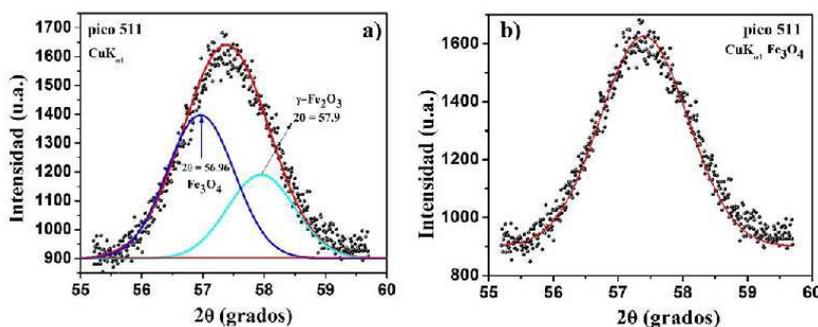


Figura 5.2: (a) Pico 511 de la estructura cristalográfica para la supuesta coexistencia de nano- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y nano- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . (b) Pico 511 para la fase pura de nano- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

El refinamiento Rietveld fue llevado a cabo considerando solo las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  usando valores iniciales para los parámetros de la red obtenidos por Sasaki [114]. Los parámetros estructurales refinados y factores de convergencia para el refinamiento (factores R para

el patrón de difracción) para el sistema cristalino cúbico y grupo espacial Fd3m fueron:  $a = 8.341 (2) \text{ \AA}$ ;  $V = 580.4 (0.5) \text{ \AA}^3$ ;  $R_p = 3.84\%$ ;  $R_{wp} = 4.83\%$  y  $\chi^2 = 2.74$  (bondad del ajuste). Los difractogramas observados ( $I_{obs}$ ) y calculados ( $I_{calc}$ ) y la línea residual ( $I_{obs}-I_{calc}$ ) así como los índices para las principales refracciones de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  son mostrados en la Fig.5.3.

El tamaño promedio de los cristalitas fue hallado en el rango de  $33(1) \text{ \AA}$ . Es interesante notar las características asimétricas en las direcciones de tamaño aparente: a lo largo de las direcciones [100], [110] y [111] el tamaño aparente para las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  son, respectivamente, 36, 40 and  $25 \text{ \AA}$ .

La Fig.5.4 muestra las proyecciones de los cristalitas para el sistema de nanopartículas. Un gráfico de la forma global aparente del cristallito fue generado usando el programa GFourier [125]. La morfología del cristallito en dos dimensiones a lo largo de la dirección [100] muestra una morfología tipo estrellada con seis bordes. La Tabla 5.1 resume las coordenadas atómicas. Un modelo propuesto para la celda unitaria del sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  usando los parámetros de celda refinados es mostrado en la Fig.5.5. El modelo propuesto es solo un modelo especulativo para las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  basado en la estructura obtenido por Sasaki [114].

Tabla 5.1: Coordenadas atómicas del sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Átomo	x	y	z
$\text{Fe}_1$	0.12500 (2)	0.12500 (2)	0.12500 (2)
$\text{Fe}_2$	0.50000 (2)	0.50000 (2)	0.50000 (2)
$\text{O}_1$	0.24718 (2)	0.24718 (2)	0.24718 (2)

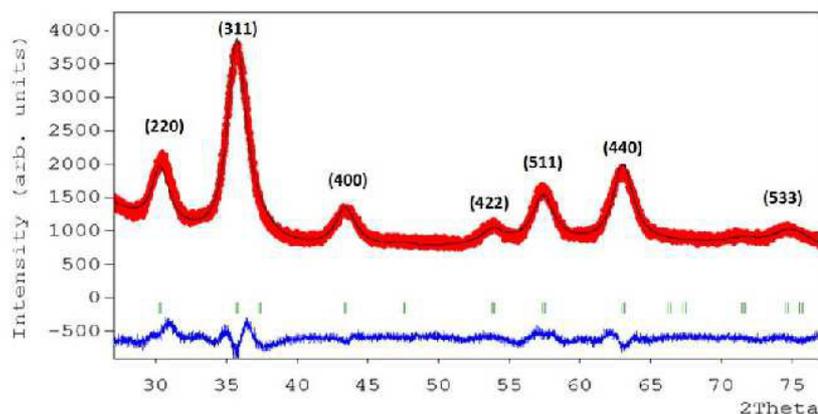


Figura 5.3: Refinamiento Rietveld de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

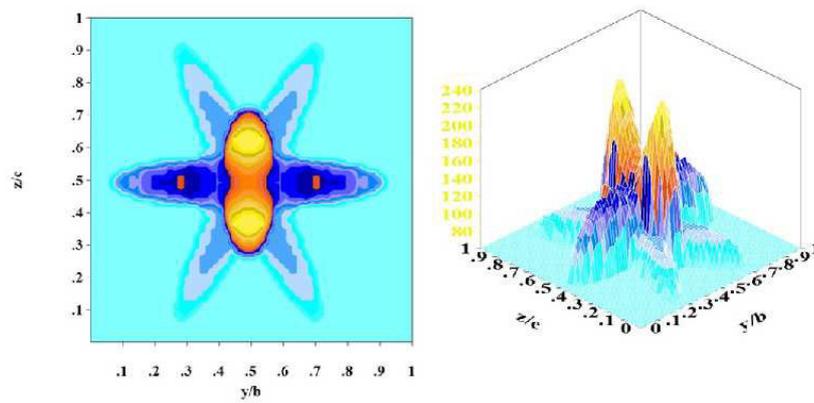


Figura 5.4: Forma aparente de los cristalitas para el sistema de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (2D-izquierda y 3D-derecha).

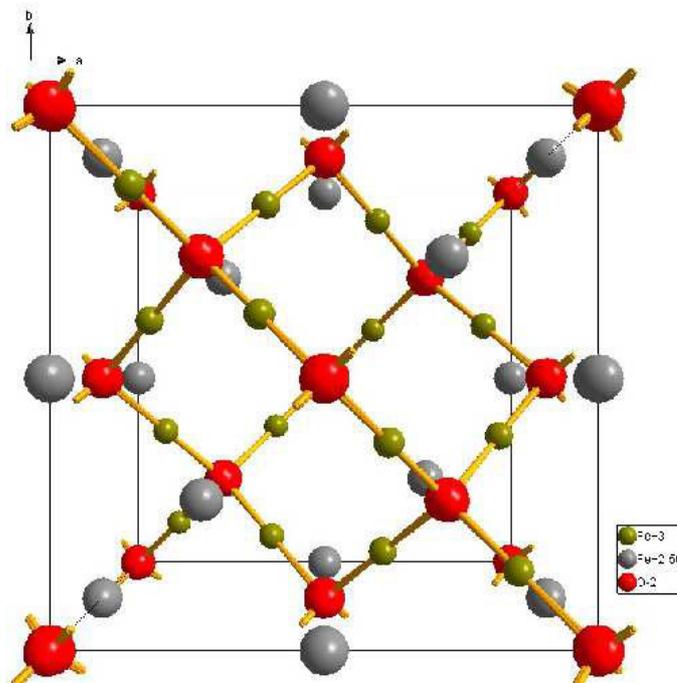


Figura 5.5: Estructura cúbica de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

### 5.1.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

La imagen MET (Figs.5.6 y 5.7) de las NPM revestidas con ácido oleico y oleilamina revela que el sistema es monodisperso como era esperado al seguir la ruta de descomposición térmica [119]. Características de morfología esférica y homogénea del sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4@OAM/OA$  sin aglomeración y alta estabilidad en medio orgánico son también observadas.

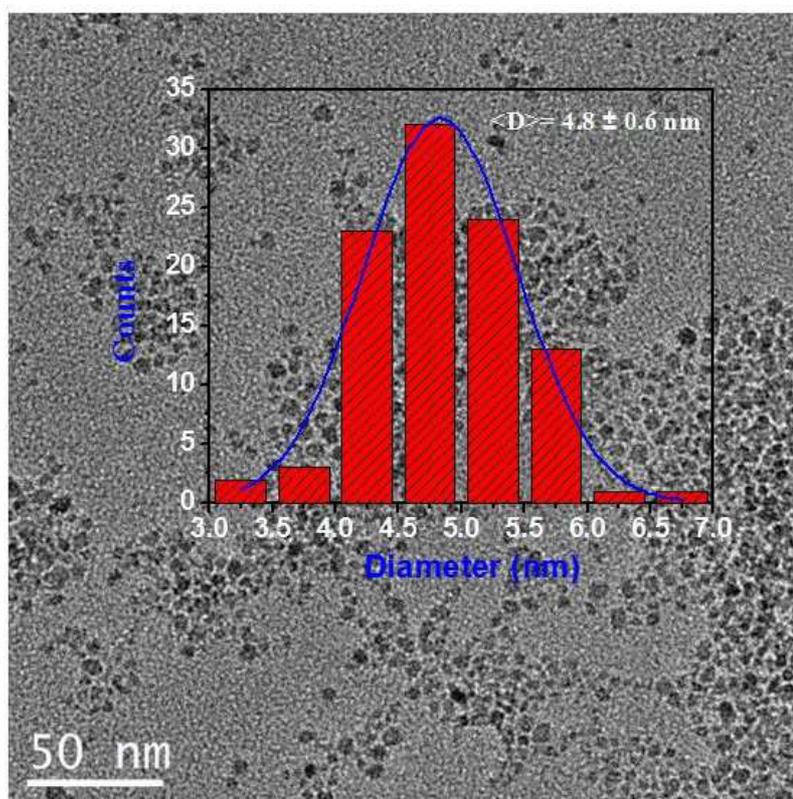


Figura 5.6: Imagen MET del sistema de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@OAM/OA$ . El histograma en la parte superior derecha muestra la distribución de tamaños con un diámetro promedio de  $\langle D \rangle = 4.8 \pm 0.6$  nm y factor de polidispersión de 13%.

Como se mencionó en el capítulo de conceptos fundamentales, la inclusión de polímeros o surfactantes que permitan un crecimiento controlado de los núcleos de magnetita es llevado a cabo en el método de descomposición térmica donde el ácido oleico y oleilamina tienen el rol de agente dispersor donde el proceso de nucleación debe ser más rápido que el proceso de crecimiento.

Además, la suspensión estabilizada en medio acuoso del sistema nanoscópico  $\text{Fe}_3\text{O}_4@CTAB$  es mostrada en la Fig.5.8. Donde las nanopartículas magnéticas se encuentran embebidas en la matriz de CTAB con diámetro promedio de  $\langle D \rangle = 4.7 \pm 0.8$  nm y factor de polidispersión

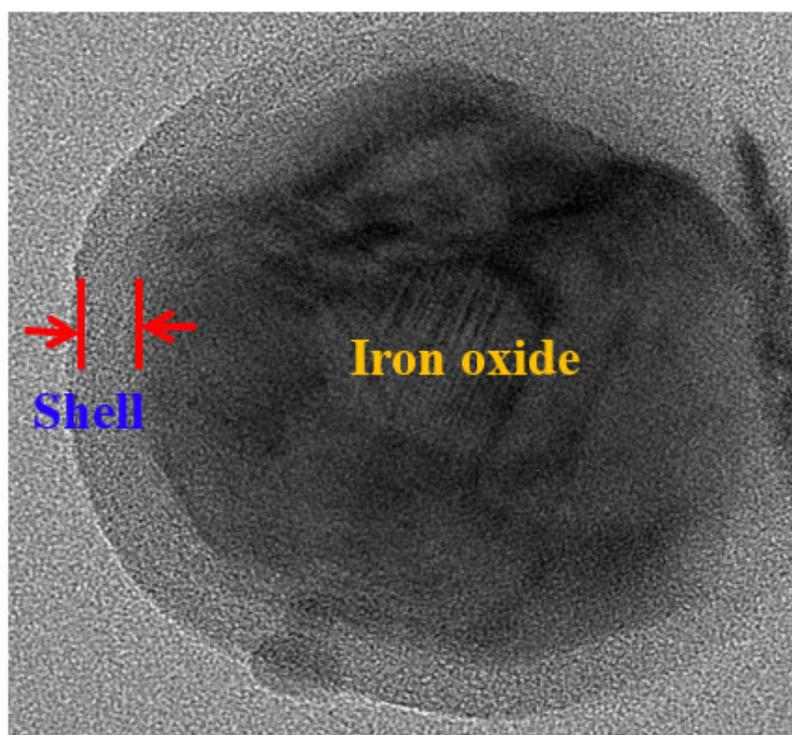


Figura 5.7: Imagen de una nanopartícula aislada de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @OAM/OA (core-shell).

de aproximadamente 17%.

La Fig.5.10 muestra la imagen de Microscopía Electrónica de Barrido de alta resolución en modo de enfoque oscuro (Dark HR-TEM) para las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estabilizadas con los surfactantes OAM/OA en su superficie después de secadas en una estufa a 80 °C. Se observa que luego del secaje estas aglomeran un poco con respecto a la Fig.5.6 siendo esta una característica de la pérdida de estabilidad si es que son resuspendidas. El histograma en la parte izquierda inferior de la imagen revela la distribución de tamaños de partículas (PSD: particle size distribution) para un conteo de  $N = 500$  partículas, donde los datos ajustados con una distribución normal o gaussiana:  $y = y_0 + \frac{A}{w\sqrt{2}}e^{-2\frac{(x-x_c)^2}{w^2}}$ , conllevan a un diámetro promedio de  $\langle D \rangle = 4.9 \pm 0.9\text{nm}$ , ancho de línea de la distribución y desviación estándar de  $w = 1.7$  y  $0.9$ , coeficiente de determinación,  $R^2 = 0.97$  y valor de poli-dispersión de ca. 13%. El tratamiento de la imagen fue realizada con el software de acceso libre ImageJ desarrollado por el Instituto Nacional de la Salud en los E.E.U.U. (National Institute of Health-US)

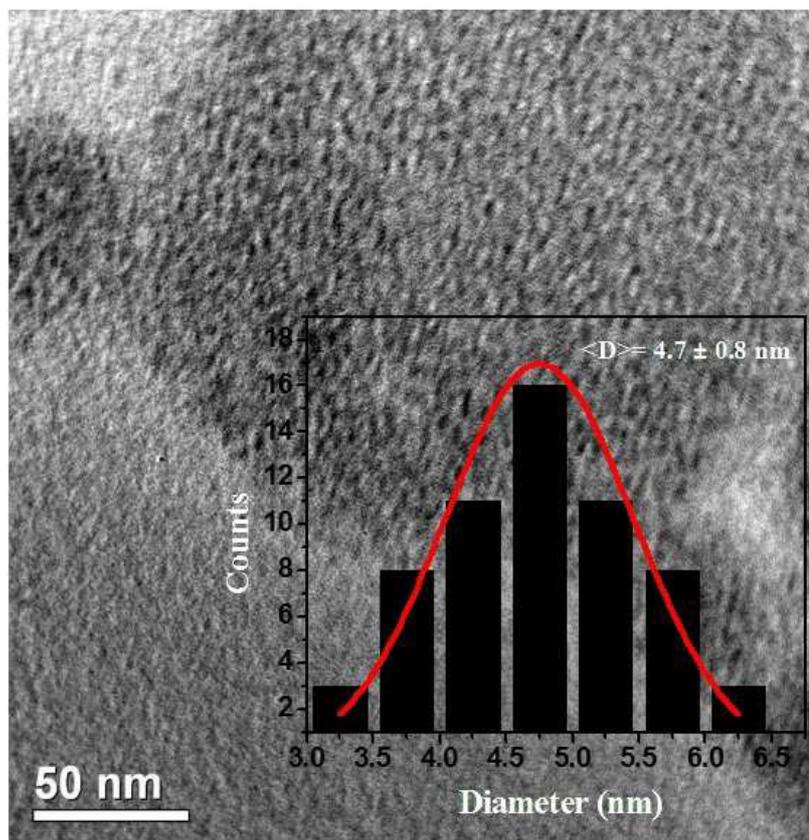


Figura 5.8: NPM estabilizadas con CTAB.

### 5.1.3. Resultados obtenidos por UV-VIS

La espectroscopía UV-VIS de las nanopartículas magnéticas cubiertas con oleilamina y ácido oleico ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@OAM/OA}$ ) suspendidas en ciclohexano mostrada en la Fig.5.11 es típica de las NPM, con una cola de absorción ancha, de manera similar a los semiconductores de banda prohibida indirecta [126]. Este perfil será importante para caracterizar los filmes LbL más adelante.

Es importante mencionar que se pudo obtener el espectro UV-VIS en la Fig.5.11 debido a la alta estabilidad de la suspensión, atribuido a la interacción molecular entre el surfactante y la superficie de las nanopartículas, como se observara en los experimentos de espectroscopía vibracional. Luego, la modificación de la superficie de las nanopartículas les da un carácter hidrófilo. Una banda de absorción no esperada es observada a 257 nm (Fig.5.12). Un estudio reciente atribuye esta banda inesperada como un fenómeno característico de las transiciones electrónicas (orbitales-d) del complejo agua e iones de  $\text{Fe}^{+3}/\text{Br}^-$  presentes en la solución acuosa [79]. También, el espectro UV fue colectado para el polímero PSS (Fig.5.13).

## JEOL SEM FEG 7800



Figura 5.9: Microscopio JEOL SEM 7800

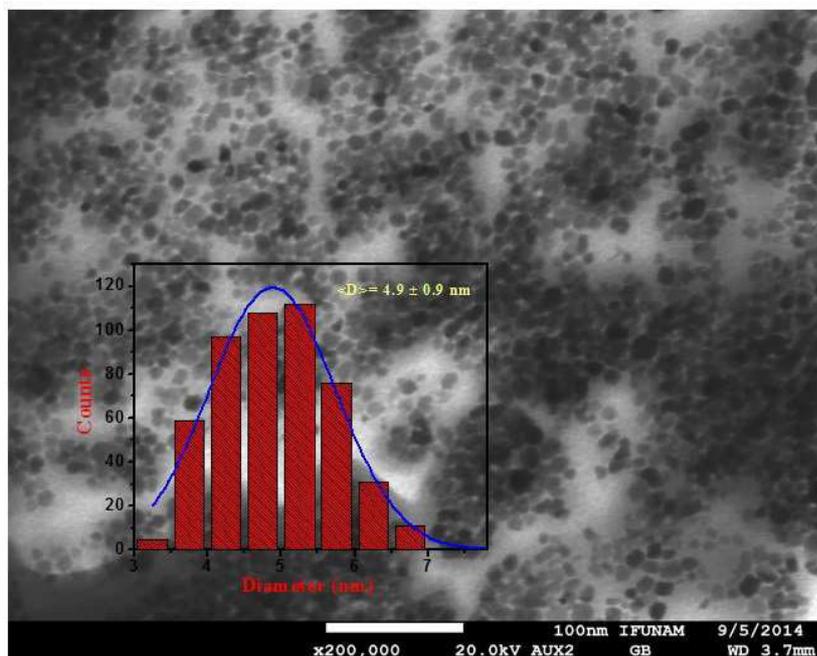


Figura 5.10: Imagen obtenida con el Microscopio JEOL SEM 7800 Fig.5.9; el cual es un microscopio de barrido con fuente de emisión de campo con capacidad para hacer STEM y dentro de esto, hacer imágenes de campo claro y campo oscuro.

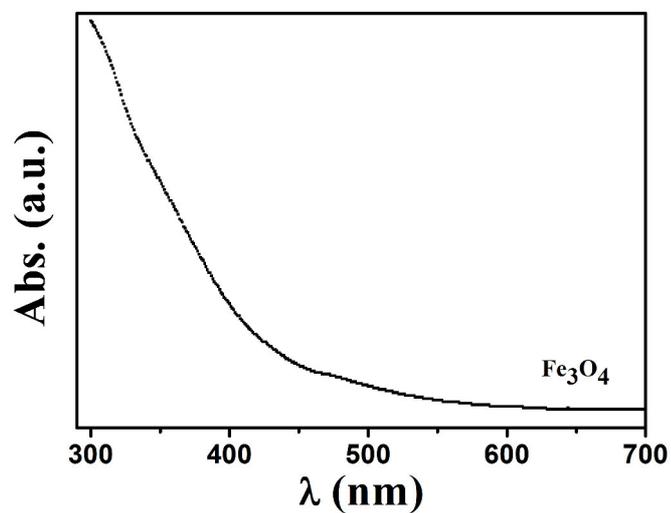


Figura 5.11: Espectro UV-VIS obtenido para las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OAM/OA.

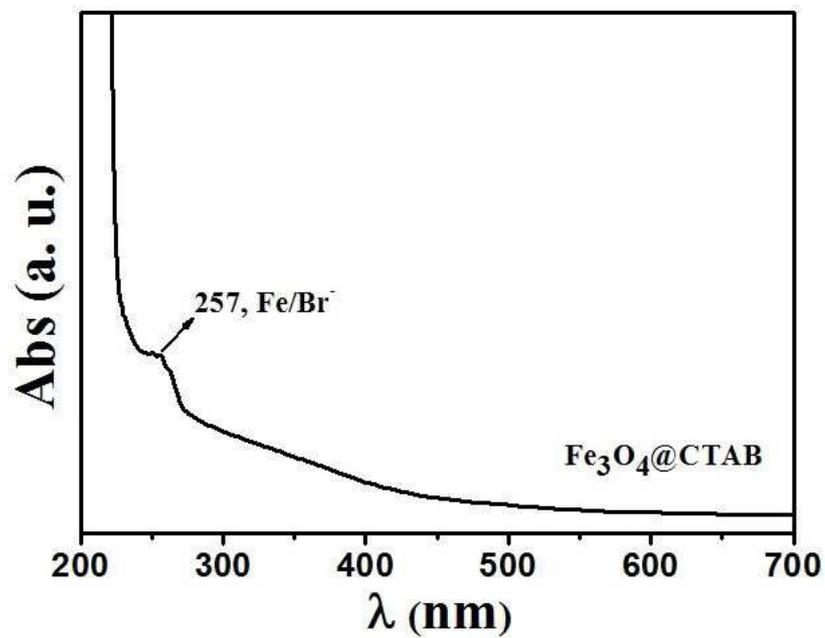


Figura 5.12: Espectro UV-VIS obtenido para la muestra de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@CTAB.

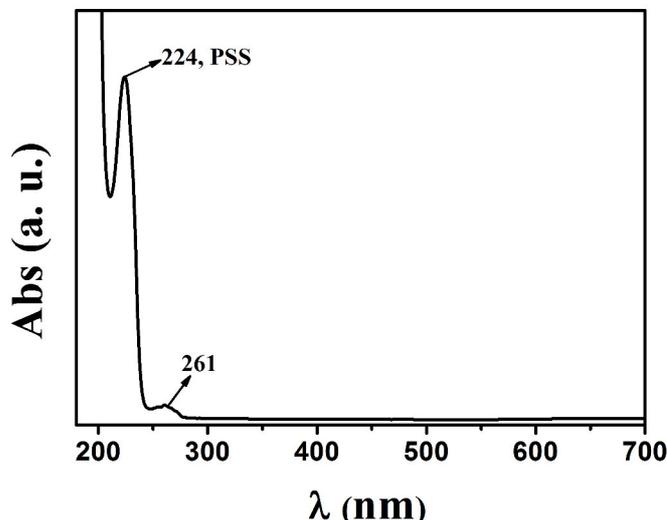


Figura 5.13: Espectro UV-VIS para la solución de PSS usada para la deposición LbL.

#### 5.1.4. Deposición Layer-by-Layer (LbL)

El valor de  $pK_a$  del PSS es alrededor de 1.0 y las nanopartículas de  $Fe_3O_4@CTAB$  están cargadas positivamente en su superficie a un valor de pH de 7.0. Los filmes LbL fueron hechos por auto-ensamblaje a través de la deposición alternante de nanopartículas de  $Fe_3O_4@CTAB$  y poli(sodio 4-stireno-sulfonato) (PSS): Primeramente, los sustratos de FTO fueron inmersos en una solución de  $Fe_3O_4@CTAB$  (pH 12) por 5 minutos, luego, sumergidos en una solución de NaOH (pH 12) por algunos segundos y secados ligeramente con flujo de  $N_2$ .

Después, la segunda capa fue formada por la inmersión del sustrato en una solución de PSS

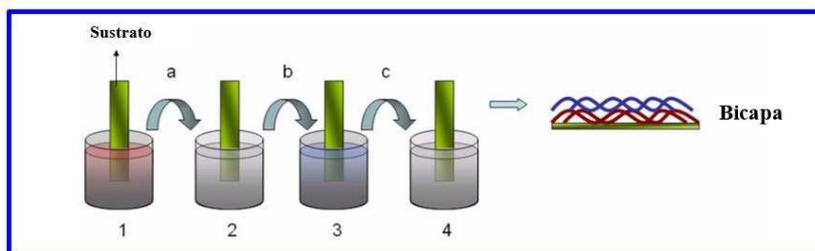


Figura 5.14: Esquema de una bicapa formada por el método Layer-by-Layer (LbL). Un sustrato sólido, portando cargas negativas, es inicialmente inmerso en una solución policatiónica (1). En el siguiente paso (a), el exceso de moléculas puede ser removido al sumergir el sustrato en una solución de lavado (2). El sustrato conteniendo la capa catiónica es subsecuentemente (b) inmerso en la solución polielectrolítica aniónica (3). Las moléculas no efectivamente enlazadas pueden ser removidas (c) en la solución de lavado (4).

(agua, 1 g/L, pH 7) por 3 min, y luego sumergida en una solución de agua y secado en flujo de  $N_2$ . El proceso fue repetido una y otra vez hasta obtener 2-bicapas, y subsecuentemente 4, 5, 6, 8 y 10-bicapas (ver Fig.5.14). El crecimiento de los filmes fue monitoreado por absorción electrónica usando Espectroscopía UV-VIS (Hitachi U-2900, China).

El crecimiento del filme fue monitoreado al medir la banda de absorción a 390 nm, atribuida a la formación del complejo  $Fe_3O_4@CTAB/PSS$ , hasta alcanzar la deposición de bicapas sucesivas (asumimos que el crecimiento lineal ( $R^2 = 0.975$ ) indica la deposición de la misma cantidad absorbida de material para cada deposición de bicapas). La deposición LbL de la solución de  $Fe_3O_4@CTAB/PSS$  sobre la superficie del sustrato de vidrio muestra buena reproducibilidad como se puede observar en la Fig.5.15 (cada punto corresponde al promedio de tres sustratos diferentes).

La Espectroscopía UV-Vis de los filmes LbL del sistema  $Fe_3O_4@CTAB$  el cual presenta una cola de absorción ancha (característico de los semiconductores de banda prohibida indirecta), sin la presencia de ninguna banda plasmónica en el rango visible. Donde, el incremento en la absorción en el espectro con el número de bicapas es debido a los efectos de dispersión o scattering. El auto-ensamblaje de los filmes LbL puede ser explicado utilizando la técnica de Potencial  $\zeta$  de las especies químicas inmersas en las soluciones (tres medidas): a) ZP para PSS en solución con pH 7 fue  $-(64.6 \pm 4.5)$  mV; b) ZP para PSS en solución de NaOH (pH 12) fue  $-(44 \pm 4)$  mV; c)  $Fe_3O_4@CTAB$  en solución de pH 7 fue  $+(90.4 \pm 4.5)$  mV; y d)  $Fe_3O_4@CTAB$  en solución con pH 12 fue  $+(76 \pm 4)$  mV. Marangoni et al. reportan un potencial zeta de +68 mV para una suspensión de nanopartículas magnéticas estabilizada con Poli (Cloruro dedi-metil-dialil-amonio)( $Fe_3O_4@PDAC$ ) con pH 10 [74].

Los filmes LbL de  $Fe_3O_4@CTAB/PSS$  fueron depositados en sustratos de vidrio (carga negativa en la superficie) por la inmersión alternada de los sustratos en las suspensiones de nanopartículas y solución de PSS, respectivamente.

### 5.1.5. Microscopía de Fuerza Atómica

La imagen de Microscopía de Fuerza Atómica de la muestra de nanopartículas de  $Fe_3O_4@CTAB$  (Fig.5.16) revela una morfología cuasi circular (2D) para las partículas depositadas en el sustrato de Si (111). Esta información corrobora la data obtenida por MET.

Los aspectos morfológicos sobre la superficie del sistema multicapas también fue estudiado con AFM. La Fig.5.17 muestra que las nanopartículas auto-ensambladas preservan su forma circular pero formando agregados con diámetros uniformes de 50 nm, aproximadamente. Ahora bien estos agregados pueden ser consecuencia del polímero presente en el sustrato o encapsulan-

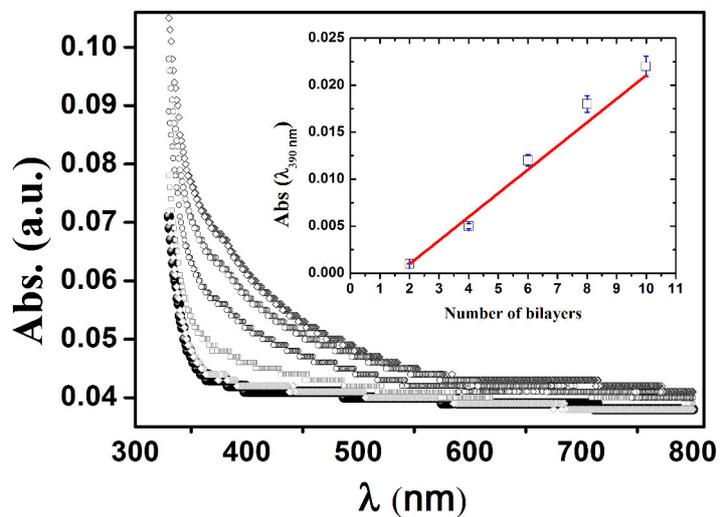


Figura 5.15: Espectro electrónico para filmes de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB/PSS depositados en la superficie del vidrio con diversos números de bicapas. El recuadro muestra la absorbancia vs. número de bicapas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB/PSS.

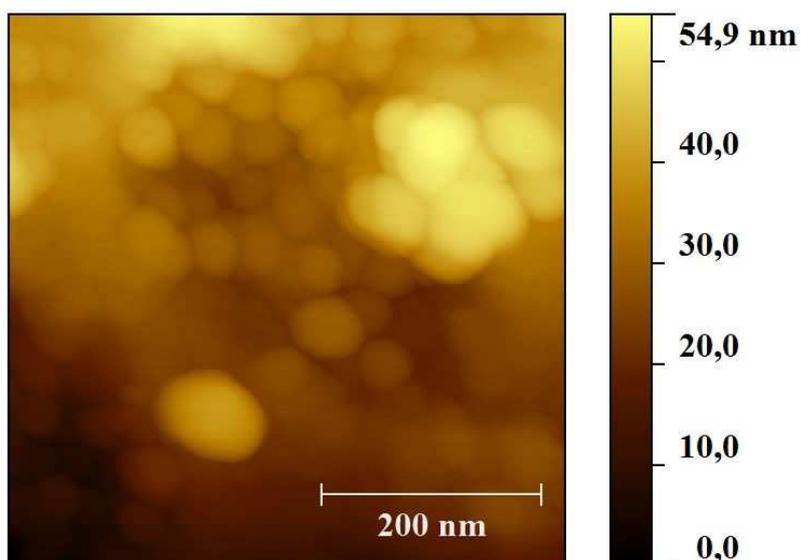


Figura 5.16: Medidas AFM de la muestra de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB.

do al sistema de partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}$ . La Fig.5.18 revela los aspectos tridimensionales del número de gránulos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}$  cubriendo la superficie del vidrio para 2, 5 y 10 bicapas. Después de incrementar el número de bicapas hasta 10 una disminución en los valores de la rugosidad es observada. Adicionalmente, la Tabla 5.2 resume los valores de la rugosidad promedio ( $R_a$ ) y la rugosidad media cuadrática ( $R_q$ ) para el número de bicapas depositado en el sustrato de vidrio.

La rugosidad promedio,  $R_a$ , es calculada de acuerdo a la Eq.5.1:

$$R_a = \sum_{j=1}^N \frac{|Z_j - Z^*|}{N} \quad (5.1)$$

Y la rugosidad media cuadrática,  $R_q$ , se calcula de acuerdo a la Eq.5.2:

$$R_q = \sqrt{\sum_{j=1}^N \frac{|Z_j - Z^*|^2}{N - 1}} \quad (5.2)$$

Donde  $Z_j$  es el valor individual (puntos) de la altura de la  $j$ -ésima medida,  $Z^*$  es el valor promedio de los puntos relacionados a la altura y  $N$  es el número de medidas hechas.

Tabla 5.2: Valores para rugosidad promedio ( $R_a$ ) y rugosidad media cuadrática ( $R_q$ ) obtenidos para diferentes cantidades de bicapas depositadas sobre el sustrato de vidrio.

Número de bicapas	$R_a$ (nm)	$R_q$ (nm)
2	$8.5 \pm 1.1$	$10.6 \pm 2.2$
5	$10.6 \pm 2.2$	$10.7 \pm 2.2$
10	$4.8 \pm 0.1$	$6.0 \pm 0.2$

### 5.1.6. Medidas de Titulación

La Fig.5.19 muestra los valores de potencial  $\zeta$  obtenidos a diferentes valores de pH para el sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}$ , la muestra revela alta estabilidad y valores positivos para un rango completo de pH, de medio ácido a básico desde  $95 \pm 5$  mV para bajos valores de pH y  $76 \pm 4$  mV a altos valores de pH. Los valores positivos de los potenciales  $\zeta$  obtenidos confirman la correcta adhesión de las moléculas de CTAB en la superficie de las nanopartículas, recordando que CTAB es una amina cuaternaria como ciclodextrina la cual es usualmente utilizada para dar estabilización a puntos cuánticos en medio acuoso como es reportado por Wang *et al.* para nanopartículas metálicas [35].

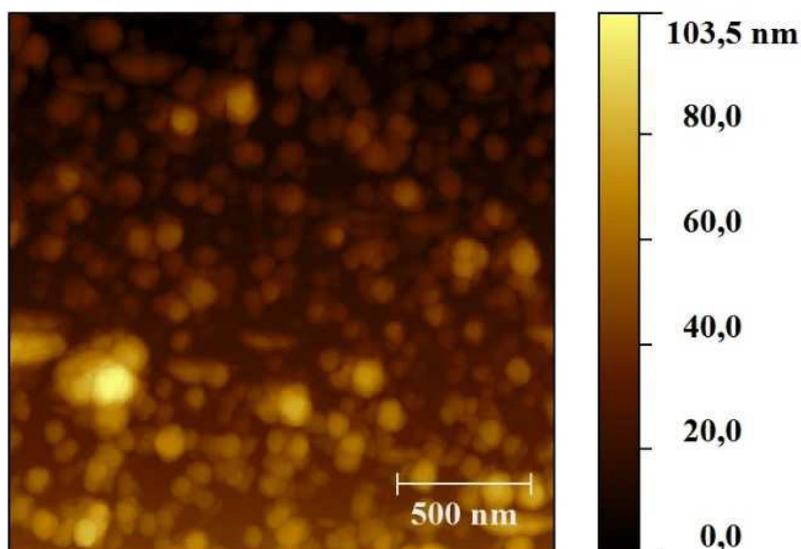


Figura 5.17: Imagen topográfica AFM para el sistema de 10 bicapas depositados por electro-deposición LbL sobre el sustrato de vidrio.

### 5.1.7. Dispersión Dinámica de la Luz

La técnica de Dispersión Dinámica de la Luz revela nanopartículas con diámetro hidrodinámico promedio de  $2.5 \pm 0.5$  nm, para el sistema de NPM recubiertas con OA/OAM suspendidas en ciclohexano (ver Fig.5.20). El histograma revela una distribución de tamaño estrecha, lo cual confirma a primera instancia el éxito de la síntesis por descomposición térmica, cuya ventaja es obtener núcleos pequeños con crecimiento controlado por los surfactantes.

Después del recubrimiento con CTAB un estudio de estabilidad coloidal fue llevado a cabo para el sistema de NPM en medio acuoso mediante la técnica de dispersión dinámica. Los diámetros hidrodinámicos de estas partículas fueron medidos durante un período de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 meses con índice de polidispersión (PDI) promedio de  $0.24 \pm 0.03$ . Se puede observar de la Fig.5.21 que ningún cambio significativo en el diámetro hidrodinámico fue producido, lo cual confirma la estabilidad de estas nanopartículas en agua. Además estas nanopartículas pueden ser almacenadas por meses a temperatura ambiente, y el grado de dispersión se mantiene constante después del período de almacenamiento (esta asunción es basada en el valor del PDI y el pH).

### 5.1.8. Resultados por NTA

La técnica NTA es introducida como un método alternativo para caracterizar y reforzar la información de diámetro hidrodinámico y estabilidad coloidal obtenida por DLS y potencial

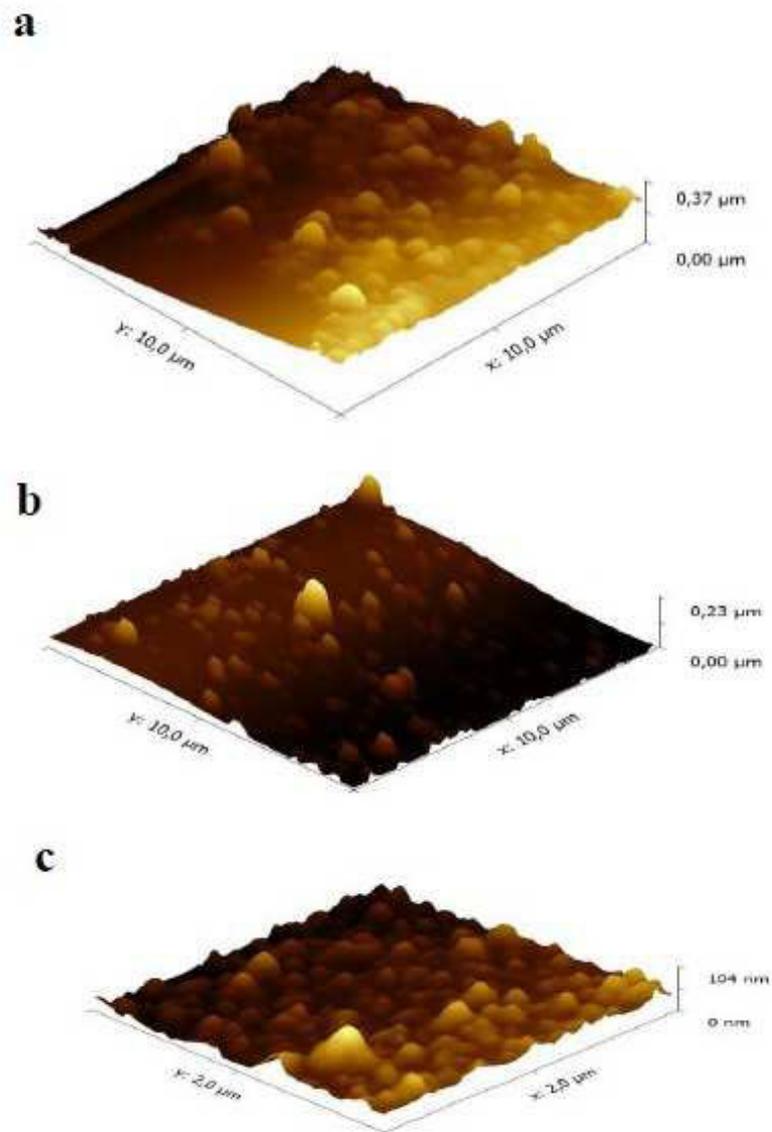


Figura 5.18: Imágenes topográficas AFM de los filmes de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@CTAB/PSS}$ , aislados de los experimentos de absorción y bajo condiciones de equilibrio, usando modo de contacto (tapping mode) sobre el sustrato de vidrio. (a) Vista 3D para 2 bicapas, (b) 5 bicapas y (c) 10 bicapas.

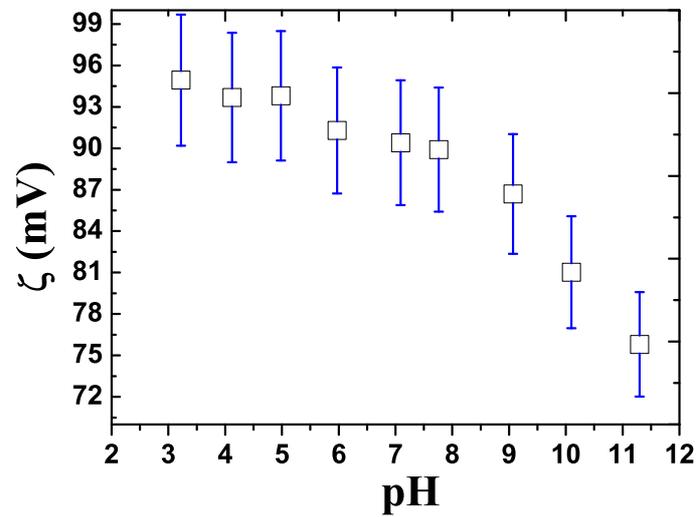


Figura 5.19: Dependencia del potencial  $\zeta$  vs. pH para la solución coloidal de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB. Las barras de errores son incluidas en el gráfico para asignar la precisión de nuestros datos.

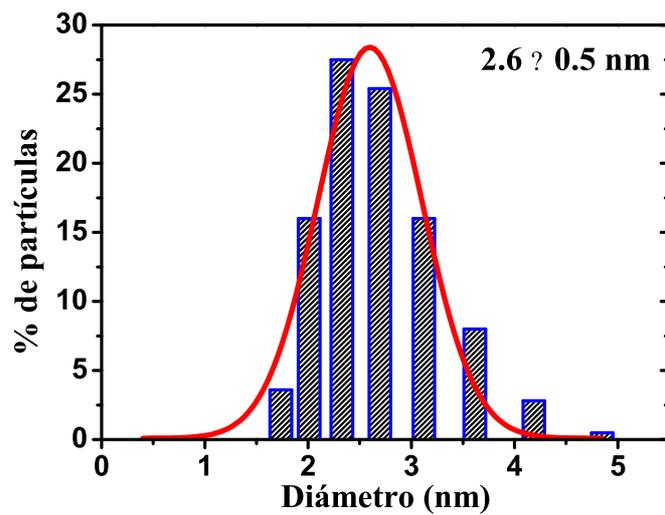


Figura 5.20: DLS para el sistema de nano- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @OAM/OA.

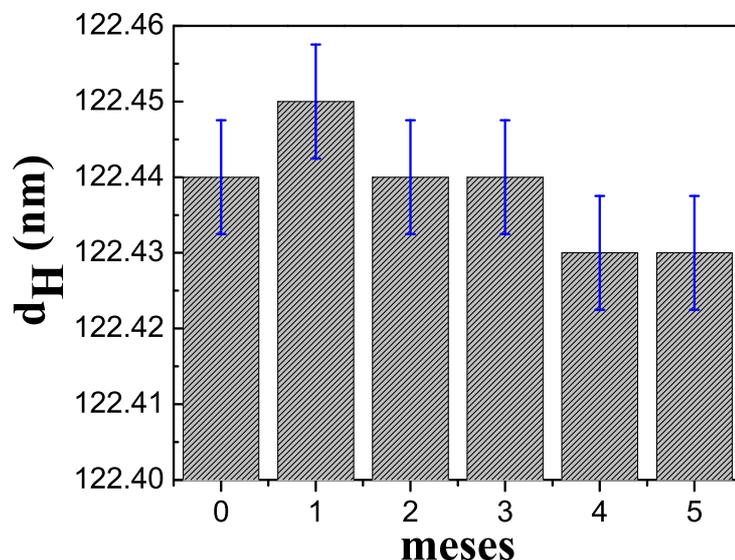


Figura 5.21: Diámetro hidrodinámico (nm) del sistema nano- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB para un período de almacenamiento de 5 meses.

$\zeta$ . Las NPM en la solución coloidal describen un movimiento Browniano relacionado por la fórmula derivada basada en la relación de Stokes-Einstein (Eq.5.3) [127]:

$$\overline{(x, y)^2} = \frac{2k_B T}{3r_h \pi \eta} \quad (5.3)$$

Donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $\overline{(x, y)^2}$  es la rapidez cuadrática media de la partícula medida a temperatura absoluta  $T$ , en un medio de viscosidad  $\eta$ , con un radio hidrodinámico  $r_h$ . Comparando con DLS, NTA permite una visualización directa en tiempo real y a su vez una cantidad aproximada de la concentración de las partículas en el medio, están son importantes características para estimar el tamaño de las nanopartículas.

La Fig.5.23 muestra una imagen capturada del video almacenado del movimiento del sistema de nanopartículas magnéticas. Fluorescencia no fue observada en la concentración utilizada para este experimento. Además, la distribución de tamaños es observada en la Fig.5.22 mostrando una distribución estrecha claramente relacionada a las nanopartículas magnéticas monodispersas mostrando dos picos intensos asignados a la formación de clusters de NPM recubiertas con CTAB. El diámetro hidrodinámico promedio fue  $147.3 \pm 6.2$  nm con desviación estándar (SD) de  $72.1 \pm 5.0$  nm y concentración de partícula de  $1.75 \times 10^9$  partículas/mL (Ver Fig.5.24 para la representación 3D). El diámetro obtenido por NTA es casi cercano en valor al obtenido por DLS, proponiendo por tanto una forma alternativa para medir sistemas de

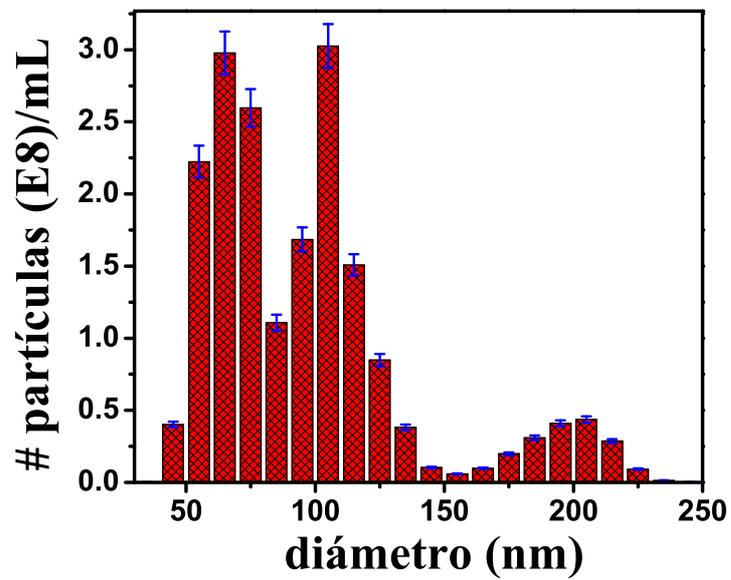


Figura 5.22: Distribución de tamaños de las NPM obtenida de la medida NTA.

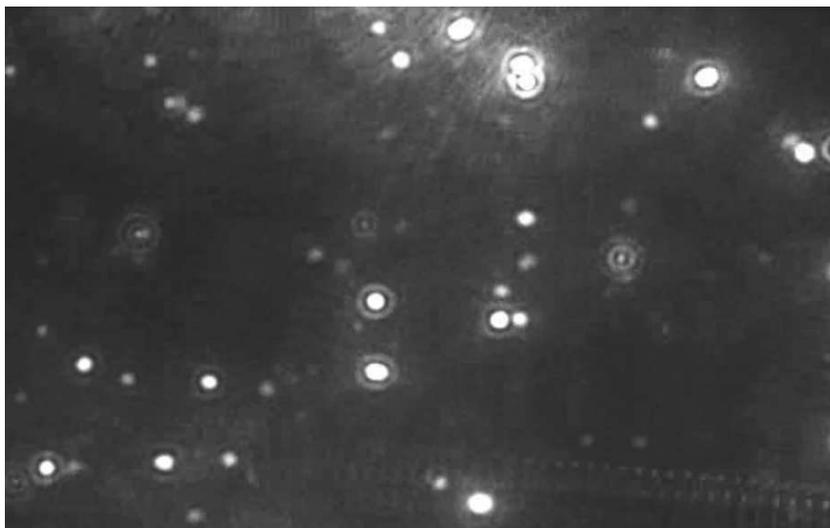


Figura 5.23: Imagen captada del video almacenado durante el movimiento Browniano descrito por el sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4@CTAB$ .

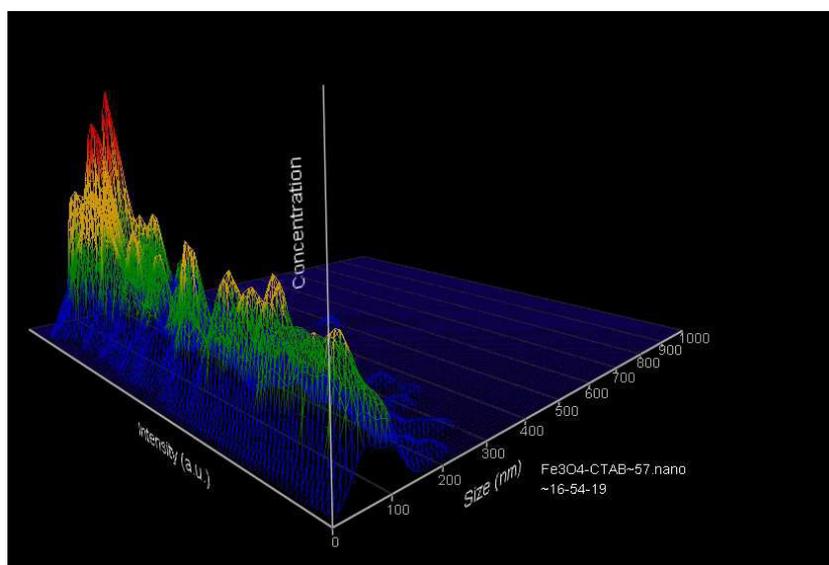


Figura 5.24: Gráfico 3D (tamaño vs. intensidad vs. concentración) obtenido usando el software NTA 2.0 Build 127.

nanopartículas recubiertas suspendidas en agua con precisión.

### 5.1.9. Espectroscopía de Infrarrojo por (FTIR)

Los espectros FTIR en la Fig.5.25 confirman la adhesión de los grupos funcionales carboxílicos y aminos sobre la superficie de las NPM. Los picos principales asociados a las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@OAM/OA$  suspendidas en ciclohexano son observadas en la región de  $400-800\text{ cm}^{-1}$  en la Fig.5.25a. Las bandas de baja frecuencia en la región  $620, 588$  y  $442\text{ cm}^{-1}$  son asociados al grupo funcional  $\text{Fe}-\text{O}$ .

En la región de  $4000$  a  $3000\text{ cm}^{-1}$  la banda vibracional a  $3005\text{ cm}^{-1}$  es asignada al modo de vibración  $\nu(=\text{C}-\text{H})$  o  $\nu\text{CH}(\text{C}=\text{C})$ . En la región  $3000-2500\text{ cm}^{-1}$  se observa los modos de vibración simétrico ( $\nu_s\text{CH}_2$ ) y asimétrico ( $\nu_{as}\text{CH}_2$ ) con frecuencias o bandas vibracionales a  $2853$  y  $2923\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. En la región  $2500-1000\text{ cm}^{-1}$  podemos observar la banda vibracional correspondiente al grupo  $\nu_{as}\text{COO}^-$  con frecuencia de  $1528\text{ cm}^{-1}$ . La asunción anterior confirma la ecuación  $\text{RCOOH} + \text{RNH}_2 \rightleftharpoons \text{RCOO}^-$ , la cual es característica de este tipo de reacciones ácido-base tipo Lewis. Los grupos  $\nu_s\text{CO}_2 + \gamma\text{-COH}$  como es reportado en el trabajo de Zhang et al. con frecuencia  $1417\text{ cm}^{-1}$  ó  $\text{CH}_2$  bending son correspondientes al ciclohexano [128].

La Fig.5.25c confirma la modificación de ligandos alcanzada con ayuda del surfactante CTAB en la superficie de las NPM. Las bandas características de las cadenas alquílicas del CTAB (Vea Fig.5.25b) aparecen como enlaces simétricos  $\text{CH}_3$  en  $1395\text{ cm}^{-1}$ . Las vibraciones

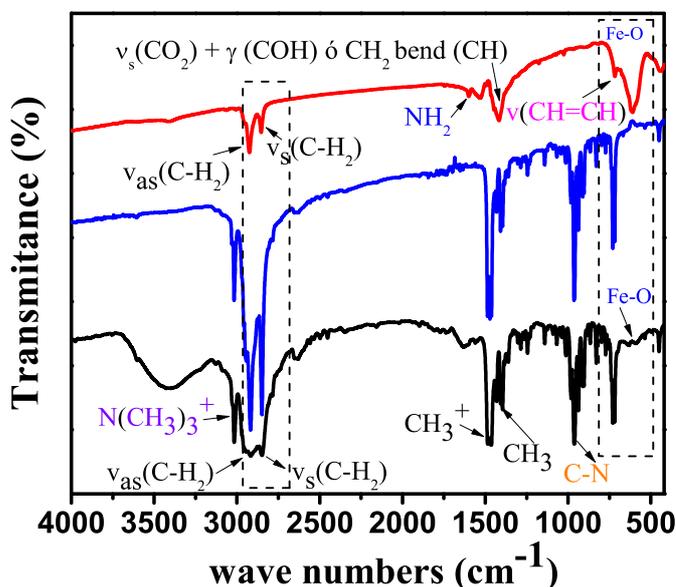


Figura 5.25: Espectros FTIR de las NPM suspendidas en ciclohexano (a), (b) CTAB puro (0.1 M) y (c) NPM suspendidas en medio acuoso funcionalizadas con CTAB.

de los enlaces  $\text{CH}_3^+$  en el plano simétrico de enlace con  $\text{CH}_2$  aparece en  $1465 \text{ cm}^{-1}$ , las vibraciones simétricas y antisimétricas para el  $\text{CH}_2$  aparecen en  $2845$  y  $2922 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Estas últimas dos bandas son una notable superposición de los grupos iniciales presentes de OAM/OA y de las cadenas polares de CTAB confirmando la presencia del mismo en la superficie de las NPM.

La vibración antisimétrica  $\text{NCH}_3^+$  en la región de  $3015 \text{ cm}^{-1}$  también es observada. Los enlaces C–N evidencian estiramientos alrededor de  $960$  y  $1034.5 \text{ cm}^{-1}$  [129]. Sin embargo cambios significativos relacionados a la intensidad en las bandas Fe–O son observados, probablemente asignados a la modificación de la superficie y estabilización de las NPM.

La Fig.5.26 muestra los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) de CTAB (0.1 M),  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ CTAB, PSS, solución de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ CTAB/PSS y filmes de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ CTAB/PSS crecidos sobre el sustrato de Si y sus frecuencias son listadas con sus respectivos grupos funcionales en las Tablas 5.3 y 5.4, respectivamente. En la región espectral  $3550\text{--}2500 \text{ cm}^{-1}$ , los modos vibracionales simétrico y asimétrico por estiramiento C–H son asignados a la solución de CTAB pura. El doblete a  $1462$  y  $1472 \text{ cm}^{-1}$  son atribuidos a los modos vibracionales por flexión  $\text{CH}_2$ . Las bandas características de las cadenas alquílicas del CTAB aparecen como enlaces simétricos  $\text{CH}_3$  en  $1395 \text{ cm}^{-1}$ . Las vibraciones de los enlaces  $\text{CH}_3^+$  en el plano simétrico es observado a  $1465 \text{ cm}^{-1}$ , las vibraciones simétricas y asimétricas para el  $\text{CH}_2$  son mostrados

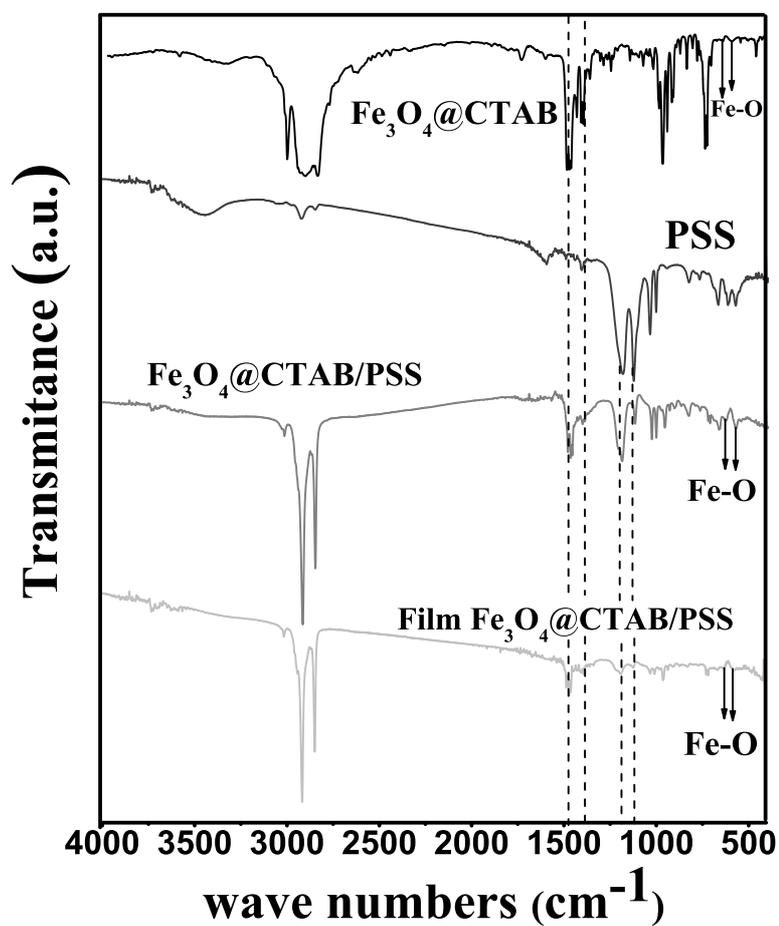


Figura 5.26: Espectros FTIR de las muestras (a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@CTAB, PSS, solución de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@CTAB/PSS y filmes de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@CTAB/PSS.

Tabla 5.3: Asignación de los grupos funcionales de los espectros FTIR de las diferentes muestras presentes en la Fig.5.26.

Muestra	Bandas de adsorción IR ( $\text{cm}^{-1}$ )	Descripción
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @CTAB	3015	N(CH <sub>3</sub> ) <sup>3+</sup>
	2919	$\nu_{as}$ CH <sub>2</sub>
	2849	$\nu_s$ CH <sub>2</sub>
	1472, 1462	CH <sub>2</sub>
	1395	CH <sub>3</sub>
	960	C-N
	630, 588	Fe-O
	PSS	3400
1600, 1500, 1450, 1410		-C=C
1190, 1130		$\nu_{as}$ -SO <sup>3-</sup>
1040, 1005		$\nu_s$ -SO <sup>3-</sup>
836, 771, 682		=C-H
620		Ring in-plane
Solución de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @CTAB/PSS	3015	N(CH <sub>3</sub> ) <sup>3+</sup>
	2919	$\nu_{as}$ CH <sub>2</sub>
	2849	$\nu_s$ CH <sub>2</sub>
	1472, 1462	CH <sub>2</sub>
	1395	CH <sub>3</sub>
	960	C-N
	630, 588	Fe-O
	3400	OH <sup>-</sup>
	1600, 1500, 1450, 1410	-C=C
	1190, 1130	$\nu_{as}$ -SO <sup>3-</sup>
	1040, 1005	$\nu_s$ -SO <sup>3-</sup>
	836, 771, 682	=C-H
	620	Ring in-plane

Tabla 5.4: Asignación de los grupos funcionales de los espectros FTIR de las diferentes muestras presentes en la Fig.5.26.

Muestra	Bandas de adsorción IR ( $\text{cm}^{-1}$ )	Descripción
Filmes de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB/PSS	3015	$\text{N}(\text{CH}_3)^{3+}$
	2919	$\nu_{as}$ $\text{CH}_2$
	2849	$\nu_s$ $\text{CH}_2$
	1472, 1462	$\text{CH}_2$
	1395	$\text{CH}_3$
	960	C–N
	630, 588	Fe–O
	3400	$\text{OH}^-$
	1600, 1500, 1450, 1410	–C=C
	1190, 1130	$\nu_{as}$ $-\text{SO}^{3-}$
	1040, 1005	$\nu_s$ $-\text{SO}^{3-}$
	836, 771, 682	=C–H
	620	Ring in-plane

en 2845 y 2922  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.

En adición, el modo de vibración asimétrico correspondiente al  $\text{N}(\text{CH}_3)^{3+}$  es observado a 3015  $\text{cm}^{-1}$ . Los modos de vibración por estiramiento C–N son observados a 960 and 1034.5  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas características de adsorción de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a 630, 588 y 442  $\text{cm}^{-1}$  son atribuidas a los enlaces tipo Fe–O. En especial, la banda a 588  $\text{cm}^{-1}$  se refiere a la deformación  $\text{Fe}_\text{O}$  en los sitios octraedrales y tetrahedrales en la estructura cúbica espinel inversa de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Para el espectro del PSS: 1. 3700 - 3000  $\text{cm}^{-1}$ : vibración de estiramiento del  $\text{H}_2\text{O}$ ; 2. 3100  $\text{cm}^{-1}$  (tres bandas): vibraciones de estiramiento aromático =C–H; 3. 2920  $\text{cm}^{-1}$  (dos bandas): vibraciones de estiramiento alquílicas C–H; 4. 1810 and 1925  $\text{cm}^{-1}$ : vibraciones de flexión fuera del plano del radical aromático C–H; 5. 1640  $\text{cm}^{-1}$ : O–H: vibraciones de flexión del  $\text{H}_2\text{O}$ ; 6. 1600, 1500, 1450 y 1410  $\text{cm}^{-1}$ : Vibraciones por estiramiento del radical –C=C–; 7. 1190 y 1130  $\text{cm}^{-1}$ :  $-\text{SO}^{3-}$  vibraciones de estiramiento asimétrica; 8. 1040 y 1005  $\text{cm}^{-1}$ :  $-\text{SO}^{3-}$  vibraciones de estiramiento simétrica; 9. 836, 771 y 682  $\text{cm}^{-1}$ : =C–H vibraciones de deformación fuera del plano; 10. 620  $\text{cm}^{-1}$ : Vibraciones de deformación Ring in-plane. Se observa que la solución de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB y PSS describen intensidad media y fuerte. Sin

embargo, las intensidades decrecen para los filmes de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}$  probablemente como consecuencia de los procesos químicos y dislocaciones de los grupos funcionales presentes en los filmes.

### 5.1.10. Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR)

La Fig.5.27 muestra los espectros EPR obtenidos para algunas temperaturas seleccionadas. A la temperatura más alta el espectro es compuesto de una línea ancha casi simétrica alrededor de 3386 G ( $g \approx 2.005$ ) característica de nanopartículas superparamagnéticas [130] y una banda pequeña alrededor de 1700 G ( $g \approx 3.98$ ). Para una mejor visualización, la banda a bajo campo fue graficada en una escala magnificada. Esta banda de absorción es atribuida los iones paramagnéticos trivalentes ( $\text{Fe}^{+3}$ ,  $3 d^5$ ) con bajo grado de simetría o relacionado a cristalinidad rómbica. Es observado que estas líneas decrecen cuando el sistema es enfriado [131].

La forma de línea intensa en  $g \approx 2.005$  puede ser ajustada por una superposición de más de dos líneas lorentzianas, sin embargo un modelo teórico no ha sido aplicado aún.

La banda característica a bajo campo,  $g \approx 3.98$ , es característico de la transición a campo medio observada para sistemas con espín  $S = 1$  con desdoblamiento a campo nulo o a campo cero [132]. Tal arreglo de espín electrónico puede resultar de un acoplamiento par electrónico debido a una interacción de intercambio magnético.

A bajas temperaturas los espectros poseen un ensanchamiento en las bandas lo cual dificulta el ajuste utilizando líneas lorentzianas. La dependencia de la temperatura de la línea central relacionada a la posición del campo, expresada por  $g = \frac{h\nu}{\beta H}$  es mostrada en la Fig.5.28, donde  $h$  es la constante de Planck ( $6.626 \times 10^{-27}$  erg.seg),  $\nu$  es la frecuencia de la radiación microondas,  $\beta$  es el magnetón de Bohr ( $0.927 \times 10^{-20}$  erg/Gauss) y  $H$  refiere a la línea en la posición del campo magnético. El cambio en los valores de  $g$  son observados de 2.005 a 200 K hacia 3.5 a 5 K. Ningún cambio en el valor del factor de Landé es observado, e.d., que se podría asumir que al momento del cambio de fase de hidrófobo a hidrófilo no se produce ningún cambio en la estructura cristalina.

El ancho de línea cambia de 34 G a 200 K a 2700 G a 15 K. Aparentemente, bajo 15 K el ancho de línea decrece, alcanzado 2300 G a 5 K (ver Fig.5.29). Yüksel Köseoglu *et al.* reportan el incremento en el campo resonante y ancho de línea con el incremento del grosor de las capas en la superficie de las nanopartículas. En esta literatura el ancho de línea a bajas temperaturas es explicado como un incremento en el desorden magnético asociado a los átomos antiferromagnéticos en la superficie de las NPM [130].

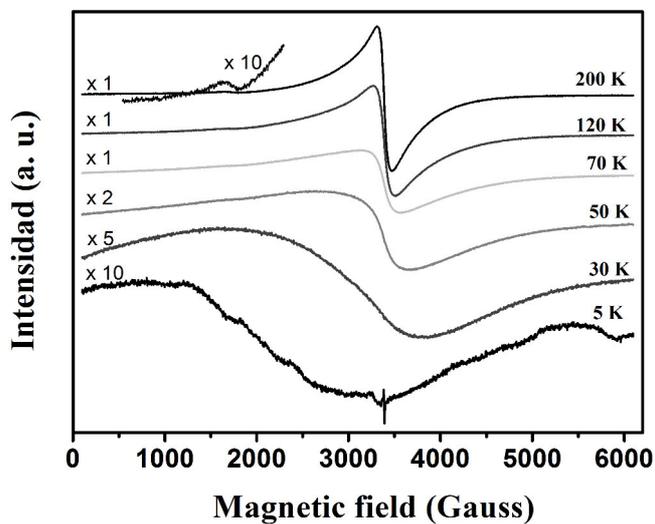


Figura 5.27: Espectros EPR a diferentes temperaturas. La escala magnificada (x10) es asignada a la banda de absorción relacionada a la baja simetría presente en las NPM.

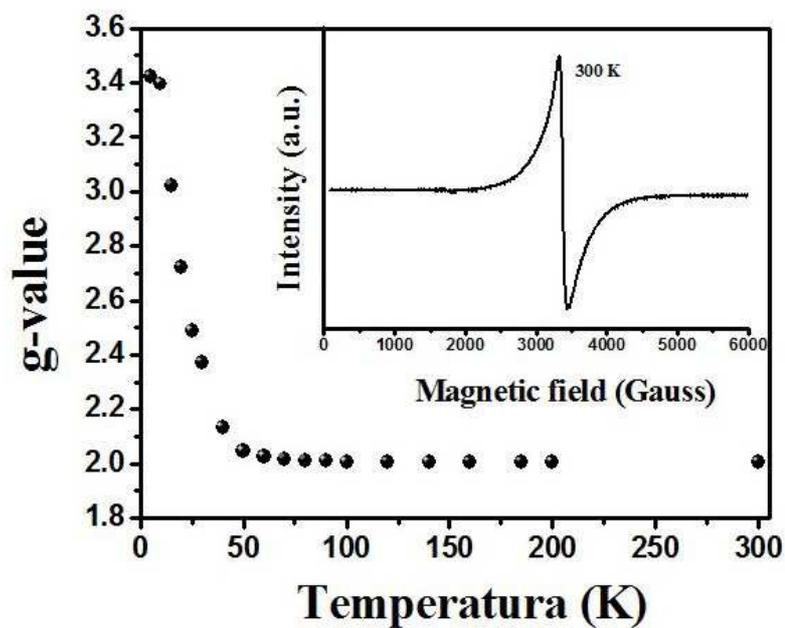


Figura 5.28: Dependencia de la temperatura de la posición del campo de la línea central EPR, expresada como el valor de  $g$ . El recuadro muestra el espectro EPR observado a 300 K.

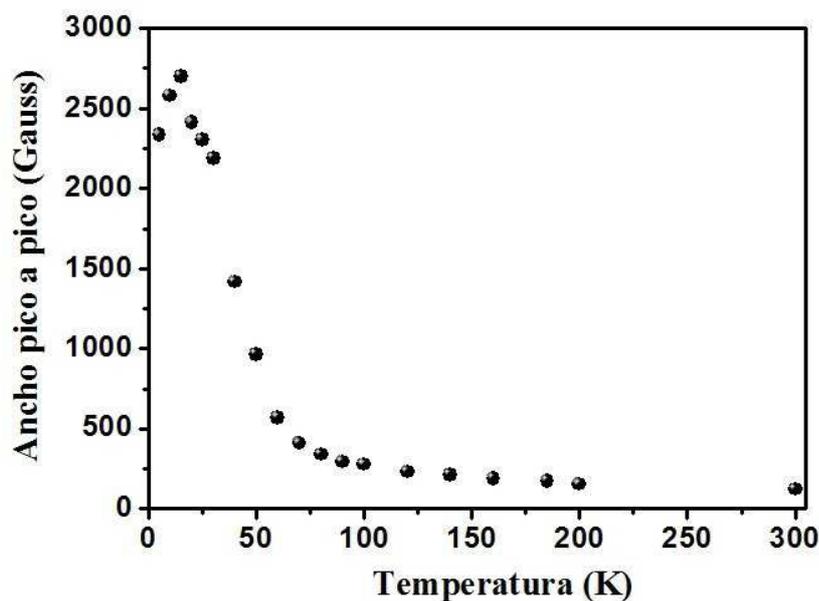


Figura 5.29: Dependencia de la temperatura del ancho de línea pico a pico de la línea central EPR.

### 5.1.11. Resultados Electroquímicos

Las propiedades de detección del sistema de 2 bicapas obtenidas por LbL de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}$  fueron evaluados utilizando una solución de PB/ phosphate buffer o tampón fosfato a 0.1 M, pH 7.2) y después de la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $500 \mu\text{M}$ ) a  $50 \text{ mVs}^{-1}$ , en una solución purgada y sin purgar con  $\text{N}_2$ . Al observar los voltagramas es evidente que los filmes LbL muestran respuesta al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo cual es más evidente en una solución sin purgar (Fig.5.30).

Este incremento en la respuesta VC en la solución electrolítica con  $\text{N}_2$  es debido posiblemente a la reducción catalítica del oxígeno en el sustrato [133]. Luego, las medidas subsecuentes en la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fueron realizadas purgando la solución electrolítica con  $\text{N}_2$ . El potencial de reducción para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los sustratos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}$  es alrededor de  $-0.5 \text{ V}$ .

La Fig.5.31 muestra que la corriente del pico catódico incrementa con la concentración del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , indicando una excelente actividad electro-catalítica de los filmes LbL hacia la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (en solución purgada). El recuadro en la Fig.5.31 se muestra la curva analítica del filme conteniendo 2-bicapas LbL después de la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El sensor tiene una buena relación lineal con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el rango de  $100 \mu\text{M}$  a  $1.8 \text{ mM}$  ( $R^2 = 0.994$ ).

El pH de la solución adoptado para la solución electrolítica (PB, pH 7.2) fue basado en el pH más común utilizado para la detección electroquímica del  $\text{H}_2\text{O}_2$  [134]. Luego, en este estudio no podemos inferir un mecanismo Fenton debido a la neutralidad de la solución [135]. En una reacción tipo Fenton (ver Eq.5.4), el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es catalizado vía los iones  $\text{Fe(II)}/\text{Fe(III)}$

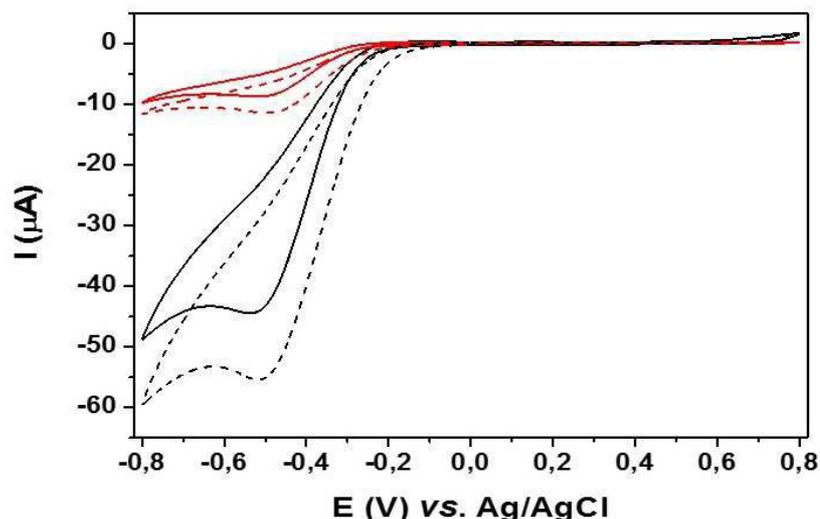
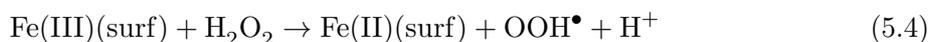
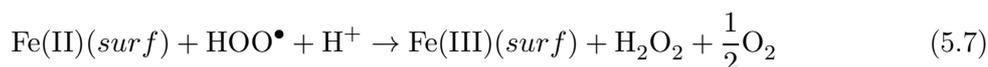
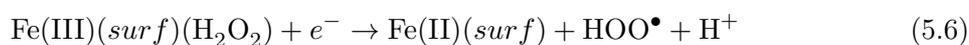
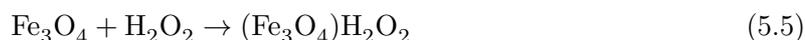


Figura 5.30: Voltagramas cíclicos usando los filmes LbL de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@CTAB/PSS}$  (2 bicapas) como electrodos de trabajo en fosfato tampón (BS, 0.1 M, pH 7.1) en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (500  $\mu\text{M}$ ) sin purgar (línea punteada) y con purga (línea continua) con  $\text{N}_2$  a una tasa de barrido de  $0.05 \text{ Vs}^{-1}$ .

resultando en radicales altamente reactivos [136, 137].



Mientras tanto en nuestro caso, en el electrodo la reacción podría estar sujeta a dos etapas (Eqs. 5.5, 5.6 y 5.7) 1): adsorción de la especie química en el electrodo and 2) proceso de catálisis en la superficie (Fig. 5.32):



La Fig. 5.33 muestra la dispersión homogénea de las nanopartículas superparamagnéticas después de la modificación con CTAB (Fig. 5.32a) y cuando un campo magnético externo y homogéneo fue aplicado (Fig. 5.33b).

Los filmes LbL de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@CTAB/PSS}$  son estables y la disolución de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a  $\text{FeO}$  reportada por Hui *et al.* [138] no ocurre debido al bajo coeficiente de difusión: valor promedio estimado de  $8.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  obtenido mediante la relación de Stokes-Einstein (Eq. 5.8),

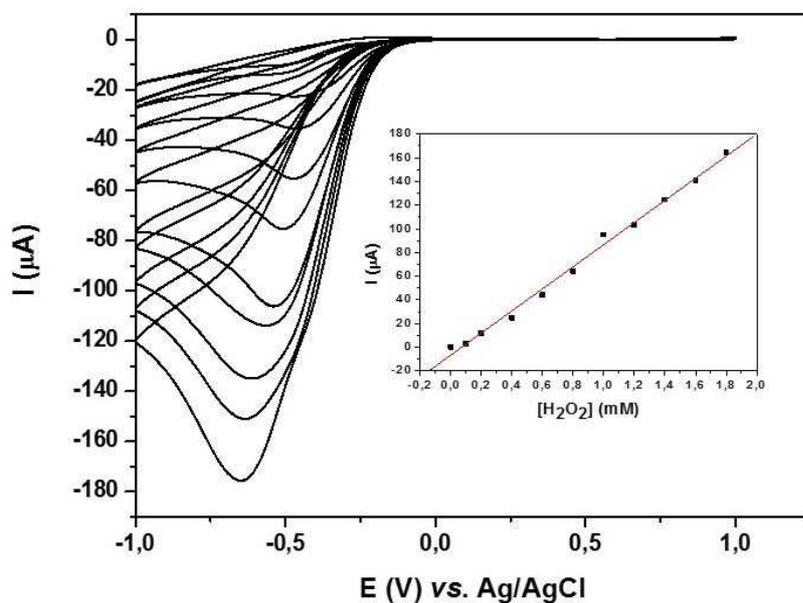


Figura 5.31: Voltagramas cíclicos almacenado a  $0.05 \text{ Vs}^{-1}$  en  $0.1 \text{ M BS}$  ( $0.1 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 7.0$ ) para un filme de 2-bicapas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@CTAB/PSS}$  en la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a concentraciones de  $0.1$  a  $1.8 \text{ mM}$ . Recuadro: Curva analítica de filmes de  $[\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@CTAB/PSS}]_2$  obtenidos por voltametría cíclica: intensidad del pico de reducción vs.  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  a ca.  $-0.6 \text{ V}$ .

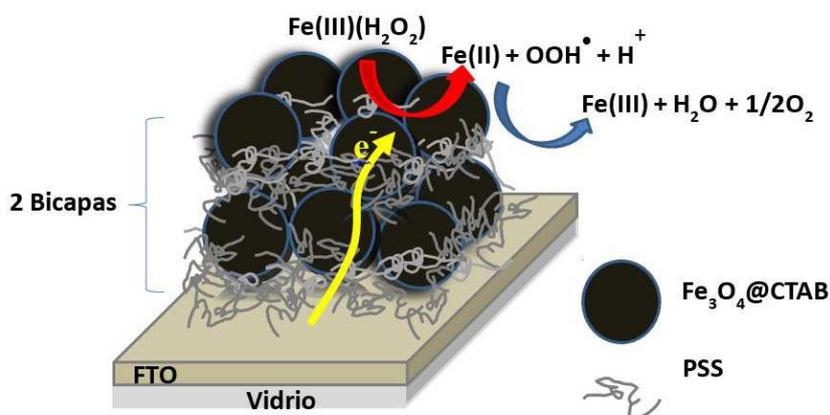


Figura 5.32: Mecanismo llevado a cabo para la detección del  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

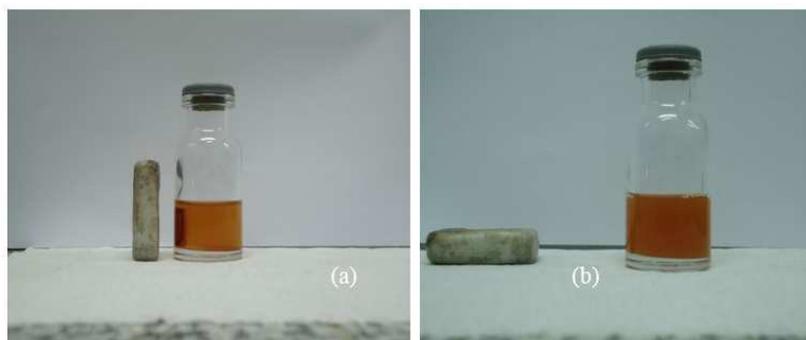


Figura 5.33: NPM después de la modificación de superficie con CTAB sin (a) y en la presencia de un campo magnético constante (b).

$$D = (k_B T) / (3\pi\eta\phi) , \quad (5.8)$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann ( $1,3806 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ),  $T$  es la temperatura (296 K),  $\eta$  es la viscosidad del agua ( $0.938 \times 10^{-3} \text{ kgm}^{-1}\text{s}^{-1}$  a 296 K) y  $\phi$  es el diámetro promedio de las nanopartículas.

Martins *et al.* reportan un coeficiente de difusión de  $0.9 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  para el sistema PDAC/FeOOH/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@ con nanopartículas con diámetro estimado de 20 nm [79]. El coeficiente de difusión obtenido en este estudio es casi diez veces mayor para un diámetro promedio de 5 nm. Además, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> es más estable que Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y los iones Fe<sup>3+</sup> no son solubles en una solución tampón fosfato mientras que los iones de Fe<sup>2+</sup> por el contrario forman un precipitado blanco (FePO<sub>4</sub>) a un valor de pH de 7 [139] (en ambos casos, aquí y en Martins *et al.*, el radio hidrodinámico no fue considerado). Las áreas superficiales efectivas del mismo tamaño de los electrodos (limitados por Epoxy Industries) fue determinado de los voltagramas cíclicos (VC) de 1.0 mM de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> utilizado como molécula de sondeo en 0.1 M de solución de KCl, a diferentes tasas de barrido (scan rates). Luego, estudios de cinética fueron llevados a cabo al registrar los VC de los filmes LbL de 0.015 a 0.400 Vs<sup>-1</sup> (temperatura: 22 ± 3 °C).

La Fig.5.34 muestra la respuesta de los VC del sistema de filmes de 2 bicapas LbL a diferentes tasas de barrido. El pico a ca. 0.320 V y 0.210 V (50 mV s<sup>-1</sup>) están asociados a la oxidación y reducción de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>, respectivamente. En la Fig.5.34 se observa un corrimiento en el pico anódico a potenciales positivos y un corrimiento del pico catódico a valores negativos, con el incremento de la tasa de barrido. La relación de respuesta del pico anódico al catódico es  $\frac{I_{pa}}{I_{pc}} = 0.85 \pm 0.06$ , diferente del valor teórico de 1 para sistemas reversibles.

El método de Randles-Sevick [140, 141, 143] es incluido con el objetivo de determinar el área efectiva,  $A$ , de los electrodos, de acuerdo a la Eq.5.9:

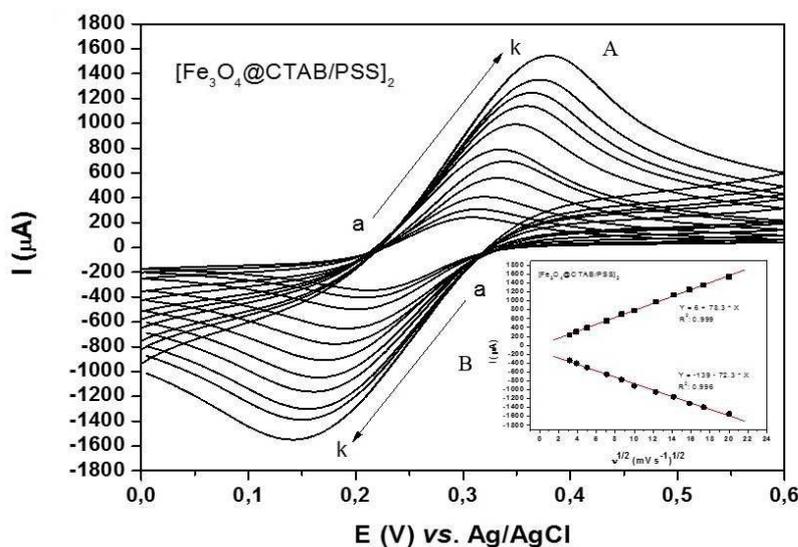


Figura 5.34: Voltagramas cíclicos a diferentes tasas de barrido (a) 0.010, (b) 0.015, (c) 0.025, (d) 0.050, (e) 0.075, (f) 0.100, (g) 0.150, (h) 0.200, (i) 0.250, (j) 0.300 y (k) 0.400  $Vs^{-1}$  para un sistema de 2-bicapas LbL de  $Fe_3O_4@CTAB/PSS$ . (A) Relación final entre la intensidad del pico del par redox de la solución de  $K_3Fe(CN)_6$  (1 mM) y la raíz cuadrada de la tasa de barrido (B). Electrolyto de soporte: KCl 0.1M.

$$I_p = 2.687 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} A D^{\frac{1}{2}} \nu^{\frac{1}{2}} C \quad (5.9)$$

Donde  $I_p$  es la corriente de pico,  $A$  es el área superficial del electrodo ( $cm^2$ ),  $D$  es el coeficiente de difusión ( $cm^2s^{-1}$ ), y  $C$  es la concentración másica (bulk)  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  ( $molcm^{-3}$ ),  $n$  es el número de transferencia de electrones,  $F$  es la constante de Faraday ( $96,485 C mol^{-1}$ ),  $R$  es la constante universal de los gases ( $8,314 JK^{-1}mol^{-1}$ ),  $T$  es la temperatura (298 K) y  $\nu$  la tasa de barrido ( $Vs^{-1}$ ).

El área superficial efectiva de los electrodos puede ser calculada de la pendiente del gráfico  $I_p$  vs.  $\nu^{\frac{1}{2}}$  (asumiendo el coeficiente de difusión del  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  con valor  $7.6 \times 10^{-6} cm^2s^{-1}$ ) [144]. Los valores de  $A$  para diferentes electrodos fueron determinados como sigue: para filmes de 2-bicapas, la superficie del electrodo es  $0.0127 cm^2$  mientras que para los filmes de 5-bicapas se obtuvo  $0.0124 cm^2$  (virtualmente la misma área) y para los filmes de 10-bicapas el área decrece a  $0.0114 cm^2$ . Estos resultados concuerdan con la disminución de la rugosidad superficial calculada por el análisis AFM (Tabla 5.2).

El mismo estudio de cinética fue hecho para la catálisis de  $H_2O_2$  y los resultados confirman que la reacción fue difusión controlada en el rango de barrido estudiado ( $5 - 500 mVs^{-1}$ ) (ver Fig.5.35). El coeficiente de difusión para el  $H_2O_2$  fue estimado usando la ecuación de Randles-Sevick para filmes conteniendo 2-bicapas LbL de  $Fe_3O_4@CTAB/PSS$ . El coeficiente de difusión

para  $\text{H}_2\text{O}_2$  tiene un valor de  $2.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$  (asumiendo  $n = 2$ ). El valor obtenido para  $D$  fue casi idéntico al reportado para otros sistemas bio-miméticos. Por ejemplo, Guascito et al. reportan un valor de  $1.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$  para el coeficiente de difusión del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en filme de polivinil alcohol (PVA) conteniendo nanopartículas de plata inmovilizada sobre un electrodo de Platino (Pt) [145]. Asimismo, aplicando el valor del coeficiente de difusión calculado para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la relación de Stokes-Einstein, el radio hidrodinámico del  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede ser estimado en  $1.0 \times 10^{-10} \text{ m}$ . Este valor es confirmado considerando simulaciones de dinámica molecular (valor promedio de  $2.4 \times 10^{-10} \text{ m}$ ) reportado por Fogolari et al. [146].

El mayor potencial aplicado en la determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por crono-amperometría fue también investigado (ver Fig.5.36). Para confirmar el mejor potencial aplicado de trabajo para el sistema de filmes de 2-bicapas LbL ( $[\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}]_2$ ), la corriente de respuesta fue almacenada como función del potencial aplicado en la presencia 1.4 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La corriente catódica alcanza un máximo valor alrededor de -0.5 V (este valor es confirmado por las curvas VC), después del cual la corriente permanece prácticamente constante a un valor de ca.  $39 \mu\text{A}$ . Alrededor del 80 % de la corriente de respuesta es alcanzada al potencial elegido de -0,3 V. El sensor alcanza un estado estable, el 95 % de la señal de respuesta máxima, dentro de los 60 s.

La Fig.5.37 presenta los resultados crono-amperométricos para adiciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , con un potencial de trabajo aplicado de -0.3 V vs. Ag/AgCl en PB (0.1 M, pH 7.2). El gráfico analítico es el promedio de tres distintos electrodos (ver recuadro Fig.5.37). El rango lineal para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es 100  $\mu\text{M}$  - 1.6 mM ( $R^2$ : 0.992). El gráfico analítico es el promedio de tres distintos electrodos (tiempo de respuesta de 60 s).

El límite de detección (LOD) para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue calculado de acuerdo al criterio  $3\frac{\sigma}{b}$ , donde  $\sigma$  es la desviación estándar ( $n = 7$ ) del blanco (PB, 0.1 M a pH 7.2) y  $b$  es la pendiente de la curva analítica. El valor de LOD estimado fue de 103  $\mu\text{M}$  (este valor resulta en 4.5  $\mu\text{M}$  en el análisis de VC). La sensibilidad del sistema  $[\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}]_2$  para peróxido de hidrógeno es 16  $\text{nA}\mu\text{M}^{-1}$  (coeficiente angular del gráfico  $I_p$  vs.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (la sensibilidad obtenida por VC fue de 94  $\text{nA}\mu\text{M}^{-1}$ ). La respuesta ampero-métrica es altamente reproducible con una desviación estándar ( $n = 4$ ) de ca. 7.7 %, similar a lo que ha sido reportado en la literatura.

La re-utilización del sensor también fue investigada al coleccionar sucesivas respuestas amperométricas donde los sensores podrían ser utilizados para 3 mediciones con una disminución de aproximadamente 10 % en la señal (después de la primera medición). La reproducibilidad LbL se examinó para tres unidades de sensores que resulta en una desviación estándar relativa (RSD) de 6.4 % para 100 M de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 7.8 % para 400 M de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y 2.8 % para 1.6 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Seis especies fueron estudiadas por ampero-metría en condiciones hidrodinámicas para

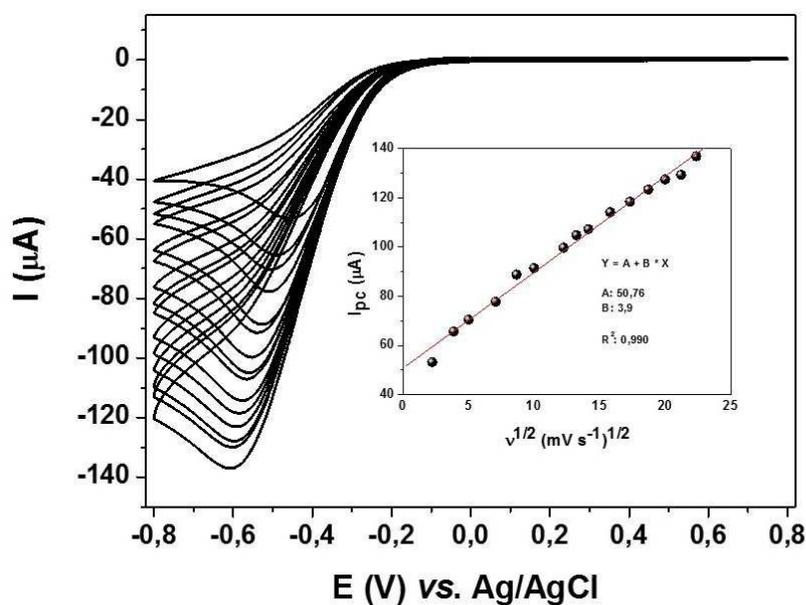


Figura 5.35: Voltagramas cíclicos a diferentes tasas de barrido de (a) 0.005, (b) 0.015, (c) 0.025, (d) 0.050, (e) 0.075, (f) 0.100, (g) 0.150, (h) 0.200, (i) 0.250, (j) 0.300, (k) 0.350, (l) 0.400, (m) 0.450 y (n) 0.500  $\text{Vs}^{-1}$  para un filme de 2-bicapas LbL de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB/PSS. Recuadro: Relación lineal entre la intensidad del pico de reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y raíz cuadrada de la tasa de barrido. Electrolyto de soporte: 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en solución PB (0.1 M, pH 7.1).

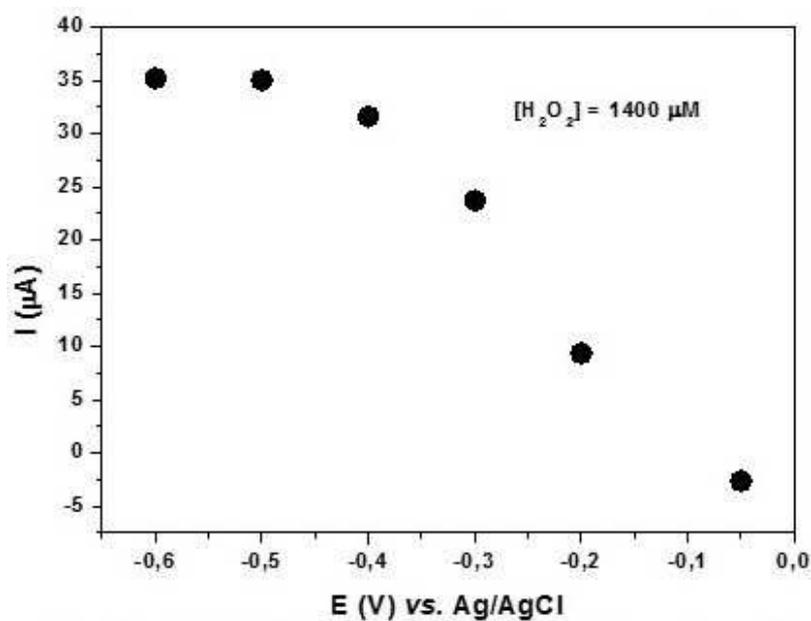


Figura 5.36: Influencia del potencial aplicado (pH 7.2) sobre la respuesta de la corriente de reducción de estado estacionario de 1.4 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la solución tampón de fosfato 0.1 M. Electrodo de trabajo: Filme de 2-bicapas LbL de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB/PSS.

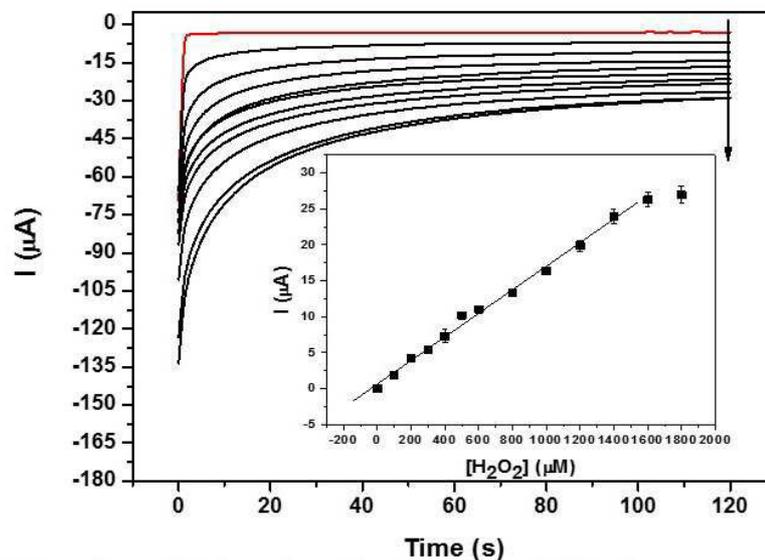


Figura 5.37: Curvas de respuesta típica para la corriente estacionaria vs. Ag/AgCl obtenidas por cronamperometría del sensor  $[\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}]_2$  en función del incremento en la concentración del peróxido de hidrógeno. Recuadro: Gráfico analítico del sensor LbL  $[\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}]_2$  con el incremento del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (cada punto es el valor promedio para 3 diferentes electrodos) ( $R^2 = 0.994$ ). Electrolito de soporte: PB a 0.1 M, pH 7.1. Potencial aplicado: -0.3 V. Tiempo de respuesta: 60 s.

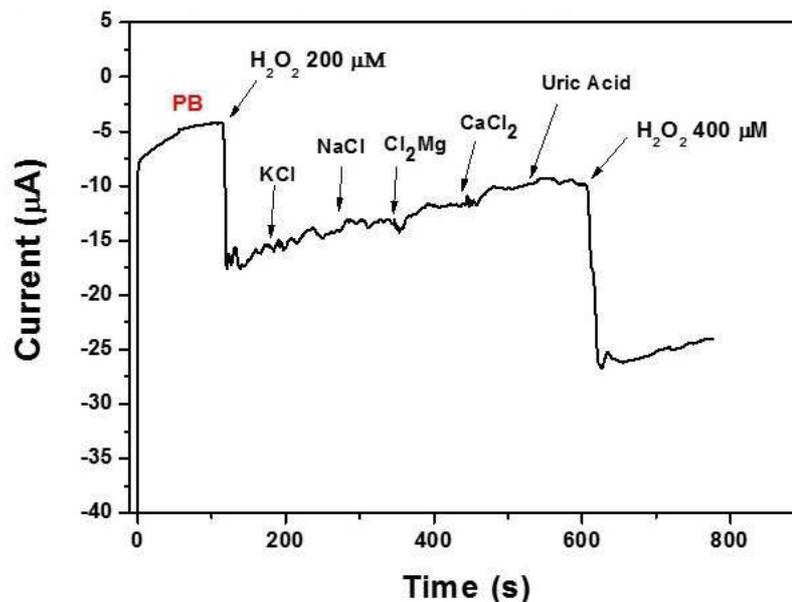


Figura 5.38: Curva amperométrica para un filme de 2-bicapas LbL de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}$  vs. Ag/AgCl después del  $\text{H}_2\text{O}_2$  e interferentes: KCl (670  $\mu\text{M}$ ), NaCl (800  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (300  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CaCl}_2$  (600  $\mu\text{M}$ ), ácido úrico (300  $\mu\text{M}$ ). Electrolito de soporte: PB (0.1 M, pH 7.1).

evaluar la interferencia en la catálisis del  $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y ácido úrico (como se observa en la Fig.5.38. El resultado sugiere que las especies en estudio no tienen interferencia obvia en la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . He et al. reportan el recubrimiento ca. 100 % of  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la presencia de :  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  como interferentes [147].

Al comparar la Fig.5.37 por Cronoamperometría se observa que para un concentración de  $\approx 200\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  la señal de corriente se encuentra en el rango de  $5\mu\text{A}$ . Esto es corroborado en el análisis por interferentes en la Fig.5.38 donde no se produce cambio en la señal amperométrica debido a las especies iónicas.

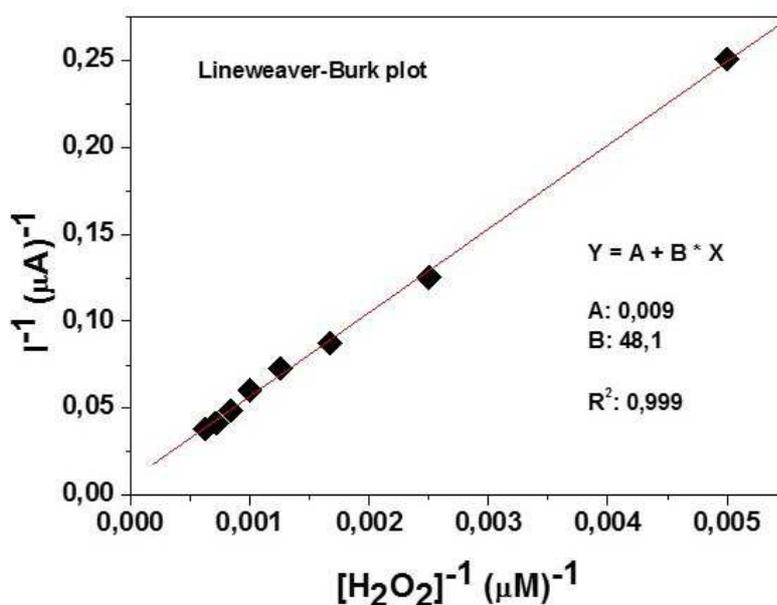


Figura 5.39: Cálculo de la constante  $K_m^{app}$  del gráfico Lineweaver-Burk derivado de la curva analítica para un filme de 2-bicapas LbL del sistema bio-mimético  $[\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}]_2$ ,  $R^2 = 0.999$ .

Con el objetivo de comparar este estudio con otros sistemas bio-miméticos, el gráfico Lineweaver-Burk (Fig.5.39) fue construido y la constante de Michaelis-Menten ( $K_m^{app}$ ) fue calculado de acuerdo a la Eq.5.10 [148]:

$$\frac{1}{I_{Sat}} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_m^{app}}{I_{max}} \frac{1}{[\text{H}_2\text{O}_2]} \quad (5.10)$$

Donde  $I_{Sat}$  es la corriente de estado estacionario después de la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $I_{max}$  es la corriente máxima medida bajo condición de saturación y  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  es la concentración bulk del  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La constante  $K_m^{app}$  obtenida posee un valor de 5.3 mM. Este valor es cercano a 4.6 mM y 4.51 mM para biosensores basados en la enzima HRP en un filme de sol-gel/hidrogel y HRP inmovilizado dentro de una matriz de ormosil modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple y nilo blue como agente mediador, respectivamente [149, 150]. En adición, el valor de 5.3 mM es más pequeño que 7.6 mM para otro biosensor basado en HRP [151], 54.3 mM para la catalasa y 34.7 mM para nanopartículas de  $\text{Co}_3\text{O}_4$ /catalasa mímica [149].

Es importante mencionar que el sistema bio-mimético mencionado en esta tesis presenta mejores características en algunos casos y es comparable con algunos biosensores como puede ser observado en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5: Lista de referencias para la detección vía métodos electroquímicos amperométricos. Abreviaciones:  $E_{appl}$ : potencial de trabajo aplicado; SCE: electrodo de calomelano saturado; GS-Nafion/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /Au-HRP: NPM cubiertas con HRP y filmes de grafeno/Nafion;  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /Ag: submicroesferas magnéticas (diámetro de 400 nm) decorada con nanopartículas de Ag; GCE- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /CS-Hb: hemoglobina inmovilizada sobre un electrodo de carbón vidrioso basado en microesferas de quitosan conteniendo NPM;  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -BMIM-PF6-CP: Electrodo de pasta de carbón modificado con  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y butil-3-metylimidazolium hexa-fluoro-fosfato (BMIM-PF6).

sensor	$E_{appl}$ (V)	Sensibilidad ( $\text{nA}\mu\text{M}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{M}$ )	Ref.
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB/PSS Ag/AgCl	-0.3 vs.	16	103	Aquí
GS-Nafion/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Au-HRP Ag/AgCl	-0.3 vs.	-	12	[150]
Hb/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pt	-0.4 vs. SCE	1500	0.03	[78]
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Ag Ag/AgCl	-0.5 vs.	-	1.2	[82]
GCE- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /CS-Hb Ag/AgCl	-0.15 vs.	0.315	4	[152]
$\text{Fe}_2\text{O}_3$ -BMIM-PF6-CP	-0.1 vs. SCE	206.51	0.8	[153]

## 5.2. Sistema NPM y proliferación de osteoblastos

En este parte el sistema de nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  encapsuladas en una matriz de HAP será caracterizado por las técnicas de FTIR, Difractometría de rayos-X y Espectroscopía Mössbauer. Seguidamente, los análisis de viabilidad celular fueron llevados a cabo en base a los ensayos de citotoxicidad, cambios morfológicos, liberación de especies oxidativas (ROS) y proliferación celular.

### 5.2.1. Espectroscopía de Infrarrojo FT-IR

En la Fig.5.40a los grupos funcionales Fe–O asignados a la  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> son notablemente observados [154,155]. Las bandas a bajas frecuencias (800-400 cm<sup>-1</sup>) son asignadas a la estructura espinel inversa de los grupos funcionales Fe–O asociados a la fase  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. La interpretación de estas dos han sido propuestas por R. D. Waldron [156] y B. White [157]: La banda  $\nu_1$  (580 cm<sup>-1</sup>) refiere a la deformación en los sitios octaédricos y tetraédricos, mientras que la banda  $\nu_2$  (420 cm<sup>-1</sup>) refiere solo a la deformación Fe–O en los sitios octaédricos de la  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

De forma similar pero no tan representativa, dos bandas a 1630 cm<sup>-1</sup> y 1415 cm<sup>-1</sup> correspondientes a los grupos citratos del ácido cítrico son observados. Esto es debido a la baja concentración de 0.1 M utilizada en la síntesis, esto será discutido en comparación a la Ref. [121] en la sección de Microscopía Electrónica más adelante.

Dos bandas de adsorción a 561 y 601 cm<sup>-1</sup> son descritas a los modos de vibración por flexión  $\nu_4$  de los grupos funcionales fosfato PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> [158,159]. Las bandas características a 1024 y 1091 cm<sup>-1</sup> son asignadas a los modos de vibración por estiramiento del PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. La banda a 958 cm<sup>-1</sup> fue también relacionada al modo de estiramiento  $\nu_1$  del PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. El típico desdoblamiento a 561 y 601 cm<sup>-1</sup> fue también observado en el espectro (Fig. 5.40b, c-d).

### 5.2.2. Difractometría de rayos-X

La identificación cristalográfica de las nanopartículas de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, HAp y  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> encapsulada en una matriz de HAp y  $\beta$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> se realizó utilizando el software Cristalografía con las siguientes cartas cristalográficas: 39-1346 para  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 74-566 para HAp y 9-346 para  $\beta$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (difosfato dicalcio). La fase cristalina  $\beta$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> posee un grupo espacial tetragonal R3c. Los difractogramas de las muestras confirman la presencia de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pura (Ver Fig.5.41) indicados por los picos de difracción:  $2\theta = 18^\circ, 30.2^\circ, 35.5^\circ, 43.2^\circ, 53.54^\circ, 57.27^\circ, \text{ and } 62.9^\circ$  con índices de Miller (220), (311), (400), (422), (511) y (440). Es importante mencionar que los picos correspondientes a los (hkl) = (400) y (511) son cruciales en la identificación de residuos secundarios de magnetita, como se estudio en los resultados de la primera parte de esta Tesis.

Los difractogramas en las Figs.5.42 y 5.43 muestran que los picos de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> son retenidos en los compositos, junto con los nuevos picos a  $2\theta = 25.9^\circ, 31.8^\circ, 32.2^\circ, 32.9^\circ, 34.1^\circ, 39.8^\circ, 46.7^\circ$  y  $49.5^\circ$  correspondiente a los planos cristalográficos (002), (211), (112), (300), (202), (310), (222) y (213) de la HAp o Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>OH, así como los índices de Miller asignados a la fase  $\beta$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

Los análisis de Difractometría de rayos-X muestran el pico principal de difracción (311) asignado a las nanopartículas de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como fase secundaria, al parecer nanopartículas de HAp (fase principal) presentan ligación a las nanopartículas de óxido de Fe confirmando

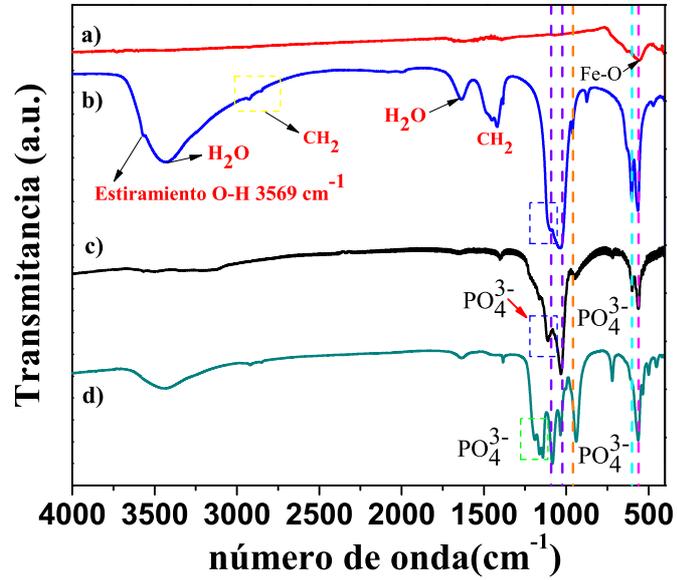


Figura 5.40: Espectros FTIR para (a)  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@citrato, (b) HAP, (c)  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@HAP y (d)  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@ $\beta$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

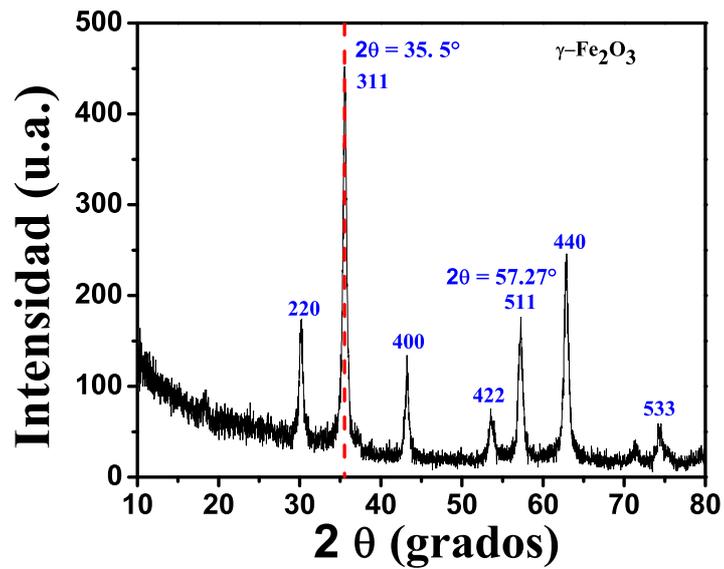


Figura 5.41: El difractograma de rayos-X de las muestra en polvo de nano  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> estabilizadas con ácido cítrico.

el modelo propuesto de una reacción tipo condensación. Además, en la Figs.5.44 y 5.45 se observa los picos característicos de la HAp en escala nanoscópica. Así mismo la estructura cristalográfica es mostrada en la Fig.5.46.

### 5.2.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Haciendo una comparación entre las imágenes MET para las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  funcionalizadas con surfactantes OAM/OA en medio orgánico observamos que la Fig.5.6 tiene una distribución más homogénea que las obtenidas para medio acuoso (Fig.5.47), es común que el método de co-precipitación siempre produzca aglomerados (distribución no homogénea) si es que no se usan surfactantes en el medio que reduzcan la interacción tipo Wan der Waals, lo interesante y lo cual merece una discusión detallada es que el rol de estabilizante, el cual es dado por el ácido cítrico con potencial zeta negativo en la superficie de  $-38.7$  mV en promedio de tres medidas, de un tamaño con diámetro promedio de  $12.3 \pm 1.9$  nm. Veamos, cuando sintetizamos nanopartículas magnéticas por el método de co-precipitación, lo esperado es que obtengamos dichas nanopartículas con superficies hidrófobas [121], sin cargas, esto inhibe al sistema a estabilizarse y a su posterior floculación, con baja dispersión en tamaño y predominio de tamaños polidispersos causando aglomerados. La introducción del ácido cítrico en la síntesis puede ser llevado a cabo en varias etapas [121]: 1) Pre-síntesis: Al mezclar la solución que contiene la razón molar  $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3} = 0.5$  en una solución de ácido cítrico con concentración de  $0.5$  M antes de introducir la solución con carácter básico (NaOH o  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), 2) Síntesis: Luego de la formación de los núcleos de NPM, fase donde ya predomina la precipitación de las nanopartículas y 3) Post síntesis: Luego del secaje y re-suspensión de las nanopartículas.

Siguiendo el paso 1 es posible obtener partículas con tamaño ultra-pequeño de diámetro ca.  $6$ nm, ya que al ser el método de co-precipitación un método donde la nucleación y crecimiento juegan un rol importante durante la reacción química, al introducir los grupos funcionales citratos estos inhiben el posterior crecimiento de los núcleos, debido a la interferencia de las cargas en la superficie; similarmente en el paso 2, la agregación inmediata de la solución de ácido cítrico obstaculiza el posterior crecimiento después de la nucleación, sin embargo puede que algunos núcleos ya hayan aglomerado después de la reacción en el medio básico produciendo un tamaño mayor de  $11$  nm aproximadamente [121]. El tercer paso sin embargo no muestra una variación en el diámetro promedio de las nanopartículas. No obstante, por observaciones en diversas síntesis al secar las nanopartículas están aglomeran a tal grado que al ser resuspendidas pierden estabilidad en medio acuoso, debido a la agregación y formación de clusters.

Como se describió en el Capítulo 3 se utilizó una solución con  $0.1$  M de ácido cítrico, en nuestro caso estamos en el proceso 2 de la síntesis, tal vez esto a comparación de la Ref. [121]

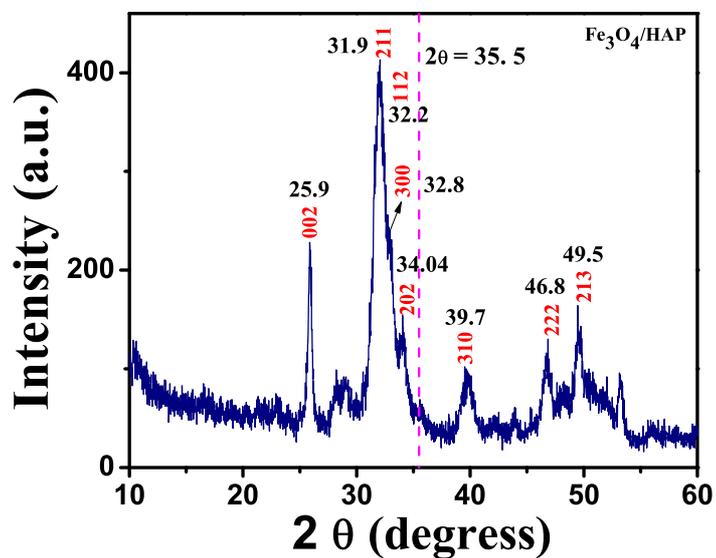


Figura 5.42: Patrón de difracción de la muestra en polvo de nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  funcionalizadas con HAp.

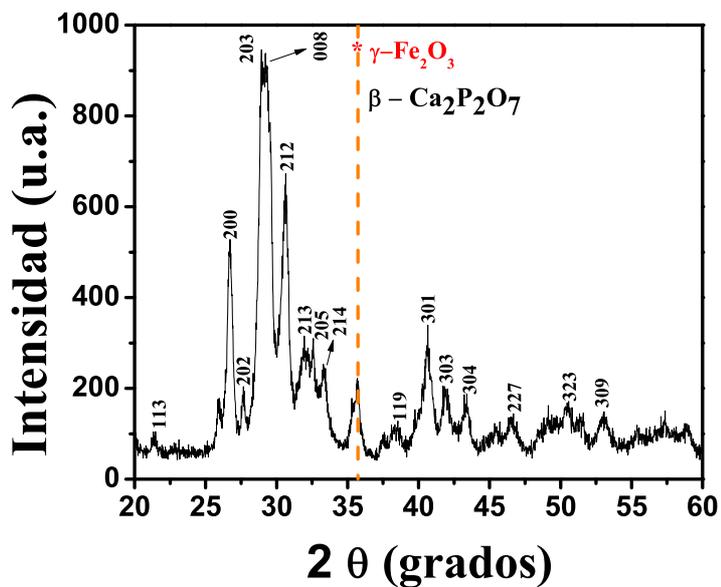


Figura 5.43: Patrón de difracción de la muestra en polvo de nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  funcionalizadas con  $\beta\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ .

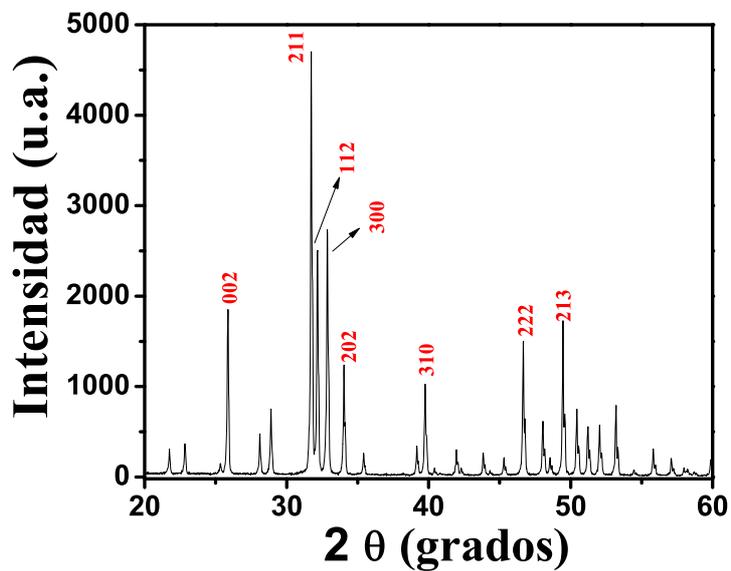


Figura 5.44: Se observa el difractograma (negro) para la muestra HAp bulk (Sigma-Aldrich).

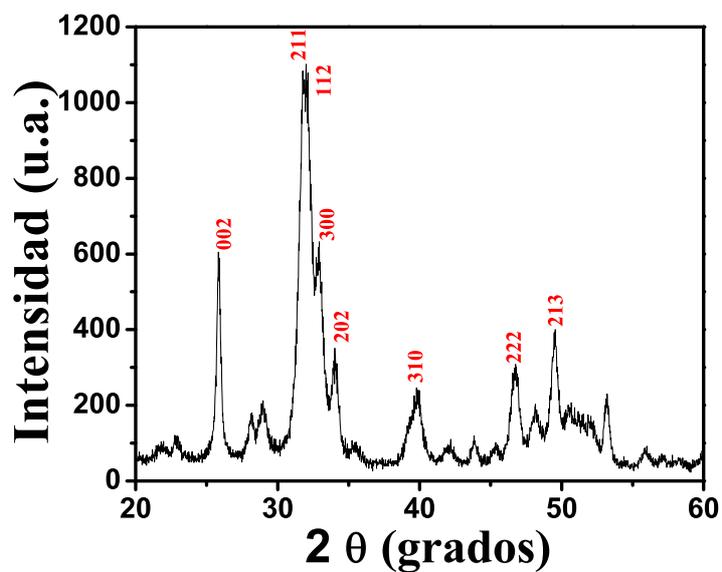


Figura 5.45: Se observa el difractograma (negro) para la muestra nano-HAp y sus respectivos planos cristalográficos en rojo.

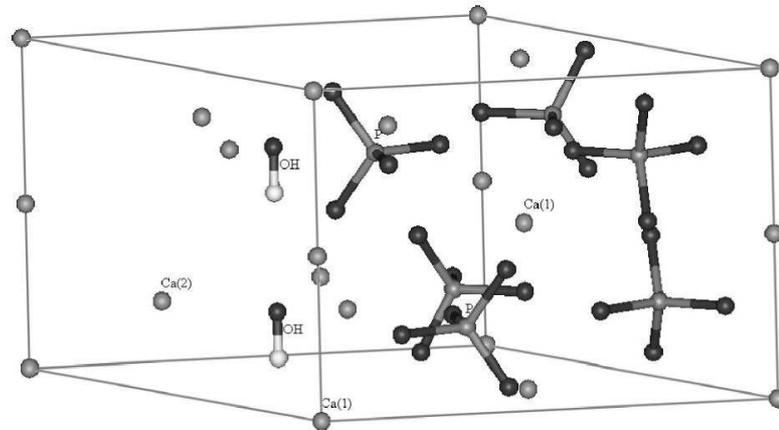


Figura 5.46: Celda unitaria de la HAp ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ).  $\text{Ca}(1)$  y  $\text{Ca}(2)$  indican los diferentes sitios que puede ocupar el Calcio en la estructura HAp.

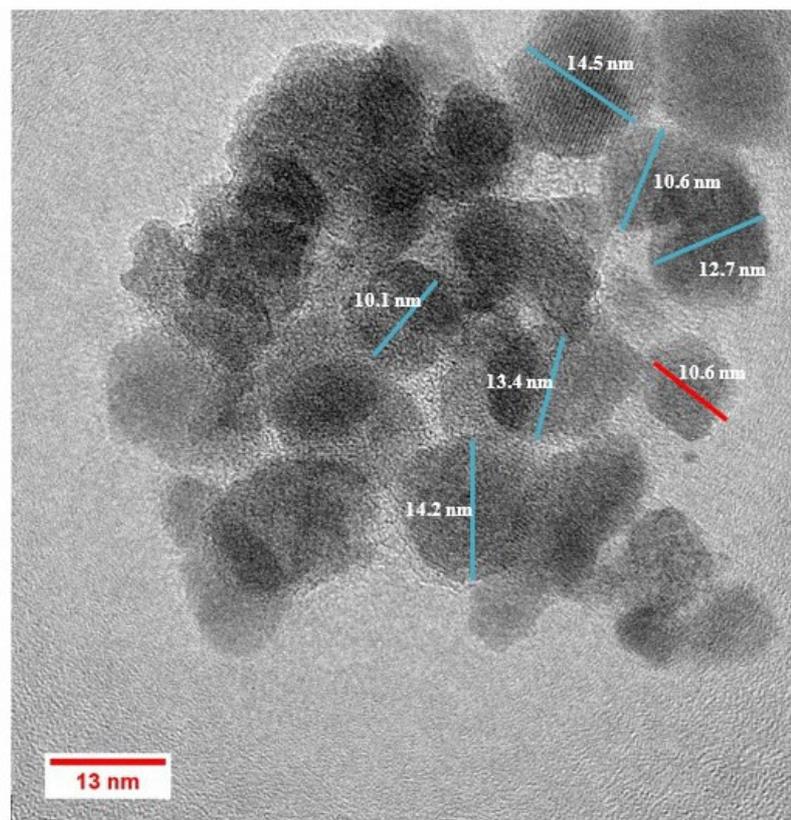


Figura 5.47: Imagen MET de las NPM de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  estabilizadas con ácido cítrico. Longitud de la barra = 13 nm.

(0.5 M), no fue suficiente concentración para dispersar las nanopartículas o tal vez debió haberse agregado la solución de ácido cítrico en la pre-síntesis. Por tal, el tamaño con diámetro promedio de  $12.3 \pm 1.9$  nm, es explicado satisfactoriamente.

Sin embargo, la asunción de tener una sola fase de maghemita basada en un espectro infrarrojo, no es del todo correcto. Mas aún sabemos que un espectro de rayos-X, al tratar con maghemita y magnetita es usualmente confuso depende mucho del proceso de síntesis llevado a cabo.

La Fig.5.48 revela la morfología de la muestra de HAp para las muestras en estado bulk y nano, se observa que la muestra en bulk revela una morfología con cristales tipo agujas, mientras que en el caso nano observamos una morfología de nanorods o nanobarras.

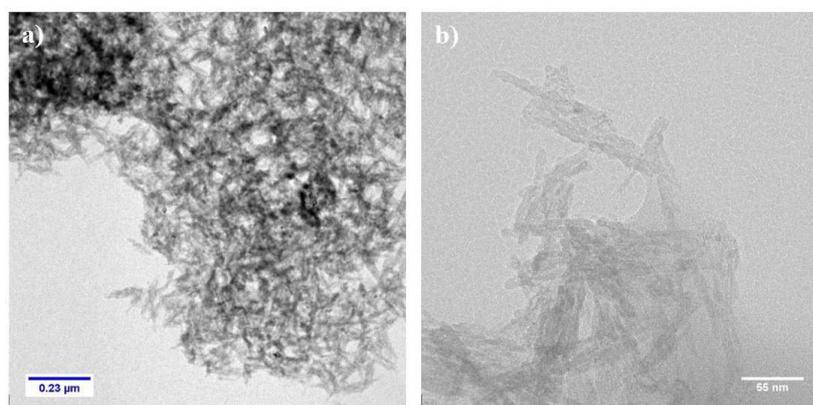


Figura 5.48: (a) Imagen MET de bulk y (b) nano-HAp.

NPM como  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  pueden ser encapsuladas en una matriz de HAp (Fig.5.49) como un tipo de funcionalización tipo core-shell (ver Capítulo de Conceptos Fundamentales). Trabajos previos como en la Ref. [160], muestra una morfología idéntica a la mostrada en la Fig.5.49 confirmando lo obtenido por rayos-X y FTIR, se observa que la cantidad de cristales de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  no representa una población estadísticamente amplia, lo cual corrobora su rol como agente o fase secundaria en este nanocomposito. Sin embargo es posible observar las nanopartículas con diámetros inferiores a 4 nm en promedio, sugiriendo que durante el mecanismo de reacción algunos clusters de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  se separaron produciendo nanopartículas de menor tamaño dispersadas en la matriz de HAp (modelo core-shell tipo mosaico).

#### 5.2.4. Espectroscopía Mössbauer

Las medidas Mössbauer fueron llevadas a cabo a diferentes temperaturas con el objetivo de estudiar el efecto de relajación superparamagnética, común para NPM (Fig.5.50b), sin embargo se observa en la Fig.5.50c que el espectro de adsorción para la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  es compuesto de picos

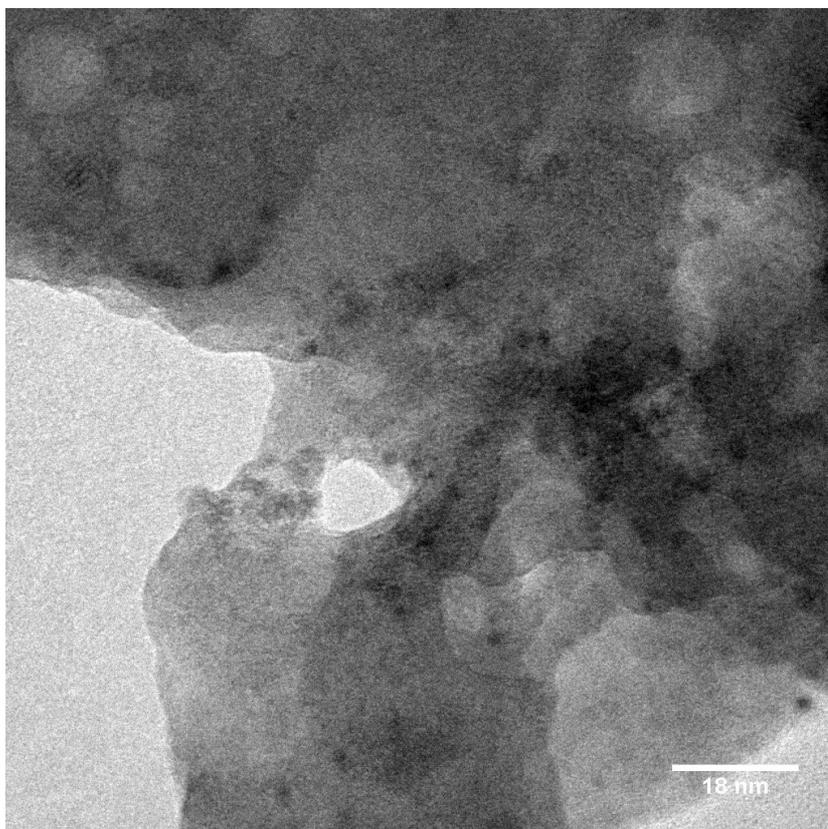


Figura 5.49: Imagen MET de las NPM inmersas en la matriz de HAp.

anchos donde al parecer solo un doblete intermedio conserva la relajación superparamagnética pues el espectro de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  no cambia su dinámica a diversas temperaturas.

Como se menciona al parecer la muestra aún conserva un poco de dinámica magnética, lo cual significa que la temperatura de bloqueo ( $T_B$ ) en la escala hiperfina ( $\tau = 10^{-10}$  s) debe estar más arriba de la temperatura ambiente (probablemente en la escala de tiempo de los segundos para las medidas de magnetización). Por tal motivo, no tiene sentido un ajuste por relajación, debido a los pocos cambios de los espectros con la temperatura (Fig.5.51). Por tanto se realiza un ajuste por distribución de campos hiperfinos asumiendo los dos sitios cristalográficos tetraedrales y octaedrales de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , los cuales trabajan satisfactoriamente. La tabla 5.6 resume los parámetros hiperfinos utilizados para los ajustes de los espectros a diferentes temperaturas.

Para ambas muestras, hay dos sitios que pueden ser interpretados como octaédricos y tetraédricos correspondientes a iones  $\text{Fe}^{3+}$  como es esperado para la estructura espinel. La razón es bastante cercano al esperado para  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Para ambas muestras existe una fuerte tendencia del ensanchamiento de los picos hacia los sitios tetraédricos. Los ensanchamientos aumentan

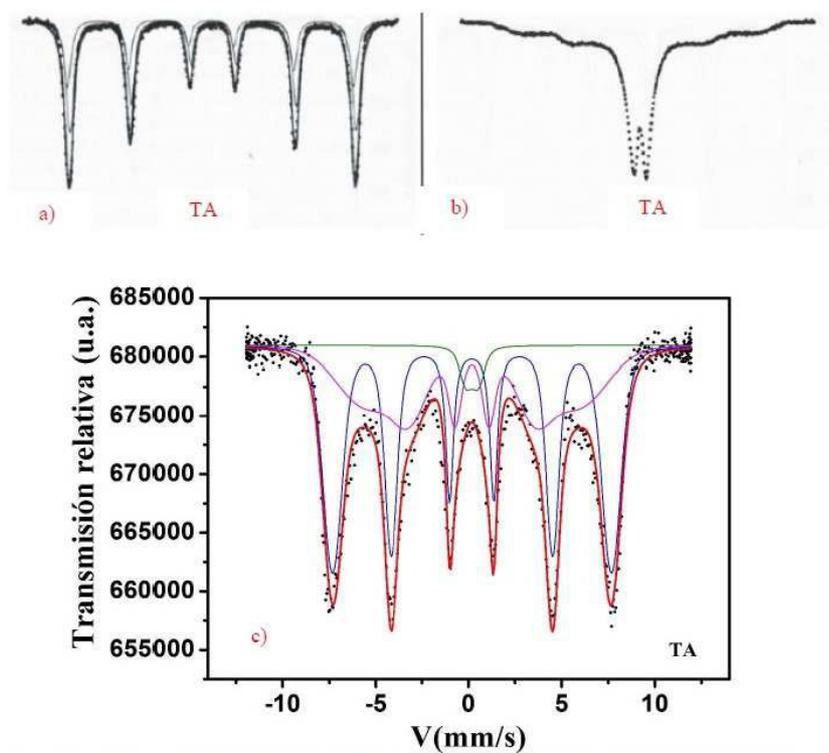


Figura 5.50: Espectros Mössbauer de una  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  bulk (a) a temperatura ambiente (TA) y de una nano  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  mostrando relajación superparamagnética (b) y excitaciones colectivas a TA (c).

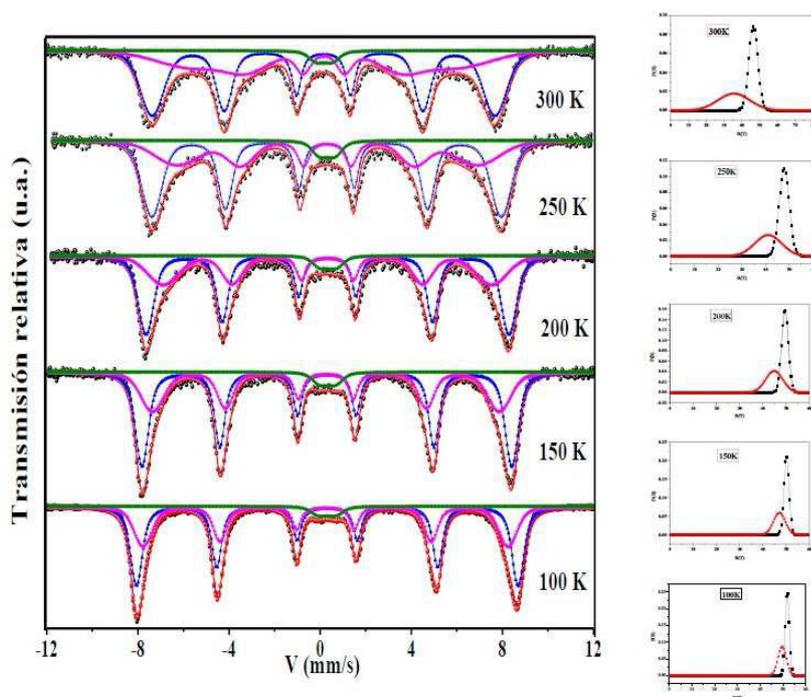


Figura 5.51: Espectros Mössbauer de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  estabilizada con citrato a diferentes temperaturas.

Tabla 5.6: Parámetros hiperfinos con respecto a la matriz de Rh obtenidos para la muestra de nano  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  estabilizada con citrato a diferentes temperaturas. T: temperatura, IS: corrimiento isomérico, H: campo magnético hiperfino.

T (K)	$\delta_1$ (mm/s)	$B_{hf1}$ (T)	Area 1 (%)	$\delta_2$ (mm/s)	$B_{hf2}$ (T)	Area 2 (%)
100	0.421	51.94	57	0.347	49.7	40
150	0.381	50.2	58	0.336	47	38
200	0.35	49.54	58	0.351	44.9	38
250	0.312	48	58	0.345	41.2	37
300	0.281	46.5	57	0.295	35.6	40

ligeramente con la temperatura indicando un incremento en las excitaciones colectivas. Por lo cual no se observa definitivamente iones de  $\text{Fe}^{2+}$ .

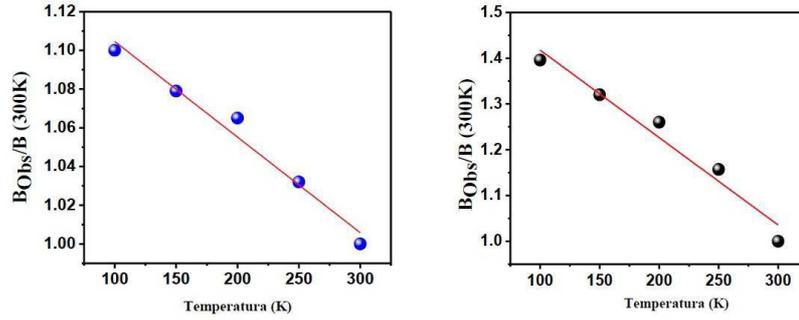


Figura 5.52: Dependencia del campo magnético hiperfino reducido vs T (K) para la muestra de nano  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  con excitaciones magnéticas colectivas. La gráfica de la izquierda representa el campo hiperfino para la primera columna de la Tabla 5.6 y la gráfica a la derecha los valores de la segunda columna.

A temperaturas inferiores a  $T_B$ , circunstancia en la que el superparamagnetismo es insignificante ( $\tau_{sp} \gg \tau_L$ ), se pueden producir pequeñas fluctuaciones del vector de magnetización de la partícula alrededor de una dirección de fácil magnetización (ver Figura 12, Capítulo 2). Los efectos principales de las excitaciones colectivas sobre el espectro Mössbauer son la disminución del campo hiperfino y el ensachamiento de la línea.

Para partículas con EAM dada por:  $E_{AM}(\theta) = KV\text{sen}^2\theta$ , el campo hiperfino observado  $B_{Obs}$  es calculado por la Eq.5.11 según [117]:

$$B_{Obs} = B_{hf} \int_0^{\pi/2} p(\theta) \cos\theta d\theta = B_{hf} \langle \cos\theta \rangle \quad (5.11)$$

Donde:  $B_{hf}$  es el campo hiperfino de saturación y  $\langle \cos\theta \rangle$  el valor medio del  $\cos\theta$ ,  $p(\theta)d\theta$ ,

representa la probabilidad de que el vector de magnetización de la partícula este entre  $\theta$  y  $\theta + d\theta$ .

Cuando la energía térmica de la partícula es mucho menor que su energía de anisotropía magnética,  $\frac{k_B T}{KV} \ll 1$ , la expansión de Taylor del  $\langle \cos\theta \rangle$  es según la Eq.5.12:

$$\langle \cos\theta \rangle = 1 - \frac{1}{2}\left(\frac{k_B T}{KV}\right) - \frac{1}{2}\left(\frac{k_B T}{KV}\right)^2 - \frac{5}{4}\left(\frac{k_B T}{KV}\right)^3 - \dots \quad (5.12)$$

Si se considera la aproximación en el primer orden se obtiene,

$$B_{Obs} = B_{hf}\left(1 - \frac{k_B T}{KV}\right) \quad (5.13)$$

donde:  $k_B$  representa la constante Boltzmann ( $1.28 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ ), T la temperatura, K la constante de anisotropía para la estructura en bulk ( $4.7 \times 10^3 \text{ J/m}^3$ ) y V el volumen aproximado de las partículas en estudio.

Si evaluamos la Eq.5.13 para nuestro estudio, tomando los valores de los campos hiperfinos dados en la Tabla 5.6 para cada temperatura y realizando un ajuste lineal expresando la Eq.5.13 como:

$$B_{Obs} = B_{hf}(1 - \alpha T) \quad (5.14)$$

donde  $\alpha$  representa la pendiente de la recta del gráfico  $\frac{B_{Obs}}{B_{T=300K}}$  vs. T con valor  $\alpha = \frac{k_B}{KV}$  en la Eq.5.14, se obtiene un volumen  $V_1 = 6.0 \times 10^{-24} \text{ m}^3$  para la primera columna de los campos hiperfinos, mientras que para la segunda columna el  $V_2 = 1.24 \times 10^{-24} \text{ m}^3$ .

Por tanto si asumimos que las partículas tienen forma esférica el volumen en función del diámetro D será según la Eq.5.15:

$$V = \frac{\pi D^3}{6} \quad (5.15)$$

Por tanto obtendremos un diámetro  $D_1 = 20.5 \text{ nm}$  y  $D_2 = 13.9 \text{ nm}$ . Estos valores estimados para el diámetro son cercanos al diámetro obtenido por MET, recordando que se ha utilizado un valor de K para una estructura bulk y que se ha asumido que las partículas poseen morfología esférica.

Por lo que la Eq.5.13, representa un modelo que describe en principio muy bien el comportamiento del campo hiperfino Mössbauer, donde las líneas del espectro no son atenuadas ni presentan formas complejas como en el efecto de relajación superparamagnética al cambiar la temperatura, pero donde un efecto relevante en el valor del campo hiperfino es observado con la temperatura y descrito por un comportamiento lineal dado en la Fig.5.52. Esta dependencia

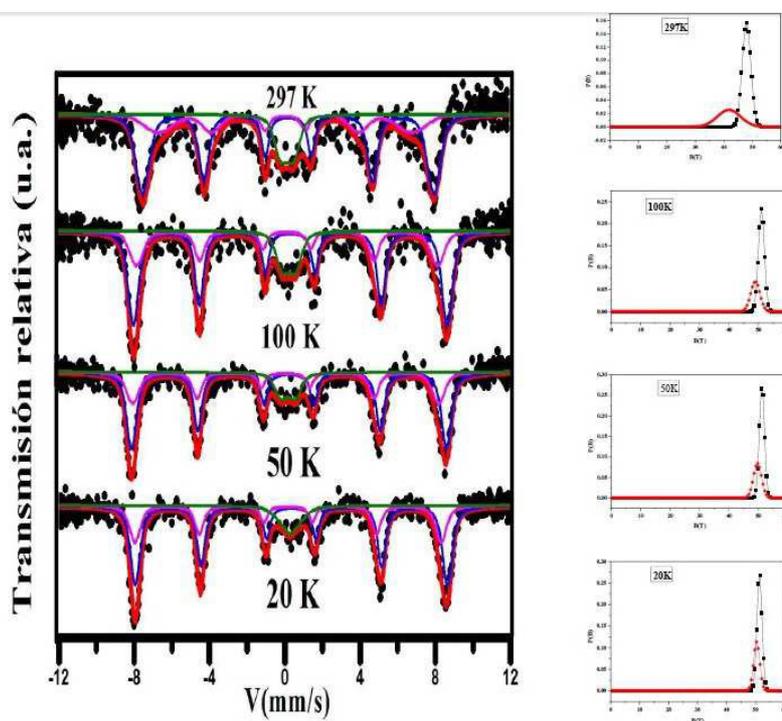


Figura 5.53: Espectros de la nano  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  estabilizada con citrato y funcionalizada con  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  a diferentes temperaturas.

es corroborada con los trabajos realizados por Morup [160, 163] para nanopartículas sujetas a excitaciones colectivas.

Tabla 5.7: Parámetros hiperfinos Mössbauer obtenidos con respecto a la matriz de Rh para la muestra de nano  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  estabilizada con citrato y funcionalizada con  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  a diferentes temperaturas. T: temperatura, IS: corrimiento isomérico, H: campo magnético hiperfino.

T (K)	$\delta_1$ (mm/s)	$B_{hf1}$ (T)	Area 1 (%)	$\delta_2$ (mm/s)	$B_{hf2}$ (T)	Area 2 (%)
20	0.459	51.4	60	0.283	50.4	30
50	0.435	51.2	60	0.259	49.8	29
100	0.427	51.2	60	0.248	49	27
297	0.374	47.94	60	0.211	41.8	27

Este modelo de excitaciones colectivas también es aplicado para el campo magnético hiperfino en la Tabla 5.8 para las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  encapsuladas en una matriz de  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  obtenido de los ajustes para los espectros Mössbauer a diferentes temperaturas (Fig.5.53), como se observa en la Fig.5.54 la dependencia lineal del campo con la temperatura es aún observada después del recubrimiento, sin embargo el diámetro de las nanopartículas

decrece a un valor de  $\approx 2.69$  nm (Tabla 5.7), lo cual confirma lo observado por MET donde el diámetro de las nanopartículas disminuyó después del proceso de reacción por condensación química.

Tabla 5.8: Diámetros de las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  con AC y  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  calculados de los ajustes Mössbauer y por TEM.

Muestra	$\alpha$ ( $10^{-3} \text{ K}^{-1}$ )	Volumen ( $10^{-24} \text{ m}^3$ )	Diámetro Mössbauer (nm)	Diámetro MET (nm)
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	1.9	1.4	13.9	12.3
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	0.266	10.23	2.69	3.2

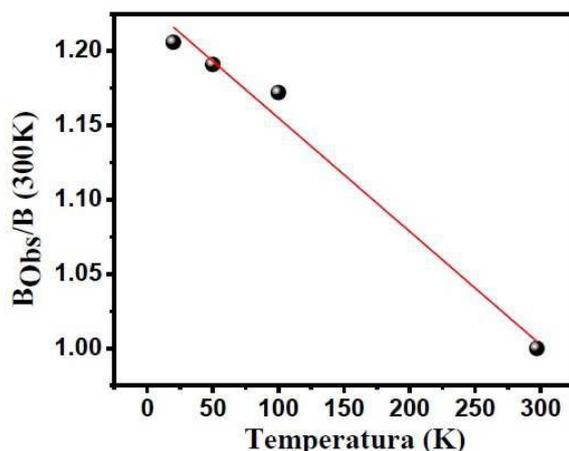


Figura 5.54: Dependencia del campo magnético hiperfino reducido vs temperatura para la muestra  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ .

### 5.2.5. Análisis de viabilidad de las nanopartículas

### 5.2.6. Efecto sobre la morfología celular

El primer y más apreciable efecto de la exposición a materiales tóxicos es el estudio de la alteración de la forma celular, o la morfología, de los cultivos en monocapa. Las Figs.5.55, 5.56, 5.57, 5.58, 5.59 y la 5.60 muestran las microfografías ópticas de las células SAOS-2 tratadas con A-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ; B-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \text{HAp}$ ; C-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ; D- nanoHAp y E- macroHAp a concentraciones de 25 y 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para 6 y 24 horas. Las imágenes revelaron que las células tratadas (SAOS-2) con las nanopartículas no han sido sometidas a ningún tipo de

cambio morfológico durante el tiempo (6 y 24 horas) de exposición a los nanomateriales en comparación con las células de control, lo que indica que las células continúan tan saludables como los controles.

Aunque las células SAOS-2 tratadas con B-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HAp}$  en ambas concentraciones mostraron algunos cambios en la morfología de las células después de 24 horas. Donde las morfologías de las células SAOS-2 muestran una forma más alargada y menos globular en comparación con las del control. En general, la morfología de las células SAOS-2 no es modificada con el tiempo de exposición, o incluso cuando las células estaban en contacto con los nanomateriales.

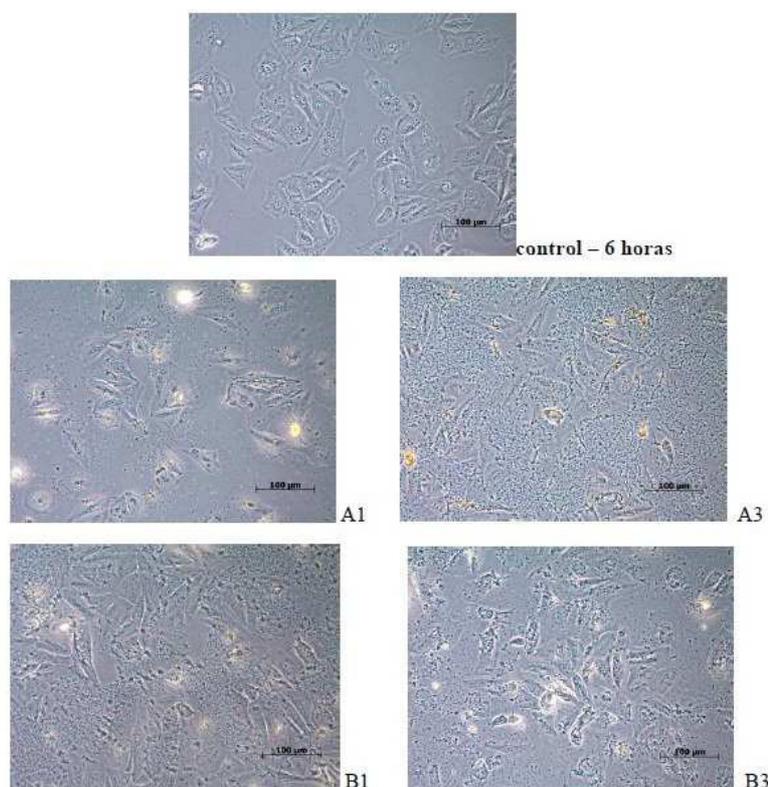


Figura 5.55: Micrográficas ópticas de las células SAOS-2 sin tratamiento (control) y tratadas con 25 y 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cada nanomaterial: A-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ; B-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HAp}$ . Tiempo de incubación: 6 h. El número de células distribuido por placas fue de  $1 \times 10^4$  células/pocillo.

### 5.2.7. Los ensayos de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad son cruciales para entender las respuestas celulares a un agente tóxico. Las respuestas de citotoxicidad a 25, 50 y 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para 6 y 24 horas se muestran en las Figs.5.61 y 5.62. Se puede observar una disminución dependiente del tiempo en la intensidad relativa de la absorbancia para las células expuestas a los nanomateriales en comparación con

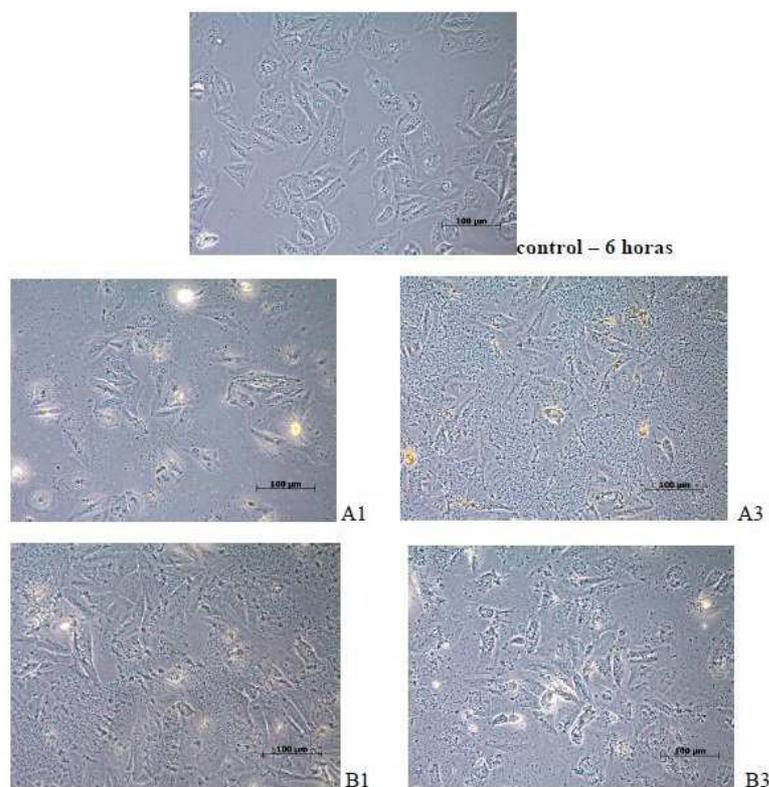


Figura 5.56: Micrografías ópticas de las células SAOS-2 tratadas con 25 y 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cada nanomaterial: C-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \beta\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ; D- nanoHAp y E- macroHAp. Tiempo de incubación: 6 h. El número de células distribuido por placas fue de  $1 \times 10^4$  células/pocillo.

las células de control SAOS-2.

Como se observa en las Figs.5.61 y 5.62, las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  ayudaron más en la proliferación de las células SAOS-2 en comparación con los otros nanomateriales y con las células de control. Mientras A-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , B-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \text{HAp}$  y C-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , aparentemente inducen la proliferación de las células SAOS-2 con el tiempo, el porcentaje de células expuestas SAOS-2 con D- nanoHAp y E- macroHAp se mantuvo constante a lo largo del tiempo y a la concentración estudiada. Después de no observar un comportamiento distinto de las células SAOS-2 con el tiempo y dosis de exposición variable, los experimentos sugieren que no existen ningún efecto tóxico sobre estas células para los nanomateriales en la concentración y el tiempo de prueba estudiados.

### 5.2.8. Generación intracelular de ROS

La generación de ROS es importante para comprender las respuestas celulares a un agente tóxico. Las respuestas a la generación de ROS para concentraciones de 25, 50 y 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$



### Control

Figura 5.57: Micrografías ópticas de las células SAOS-2 sin tratamiento (control). Tiempo de incubación: 24 h. El número de células distribuido por placas fue de  $1 \times 10^4$  células/pocillo.

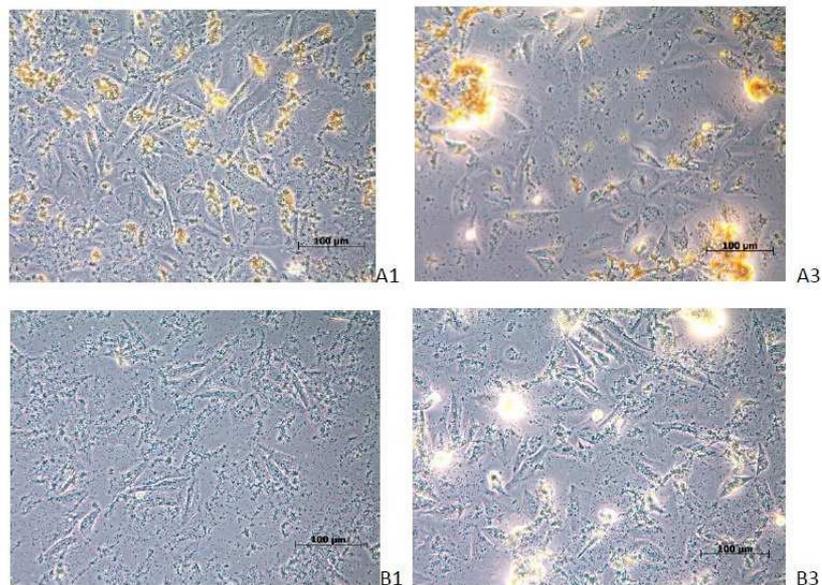


Figura 5.58: Micrografías ópticas de las células SAOS-2 tratadas con 25 y 125 µg/mL de cada nanomaterial: A-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ; B-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HAp}$ . Tiempo de incubación: 24 h. El número de células distribuido por placas fue de  $1 \times 10^4$  células/pocillo.

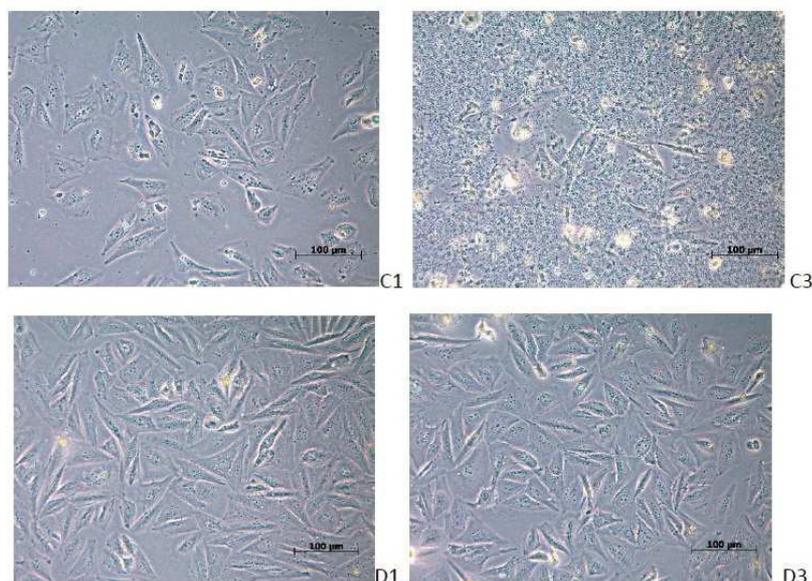


Figura 5.59: Micrografías ópticas de las células SAOS-2 tratadas con 25 y 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cada nanomaterial: C-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ; D- nanoHAp. Tiempo de incubación: 24 h. El número de células distribuido por placas fue de  $1 \times 10^4$  células/pocillo.

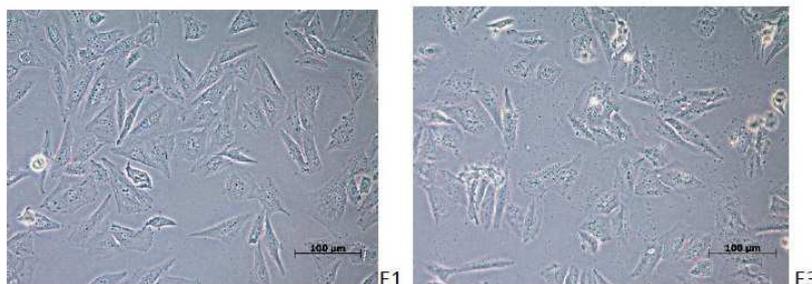


Figura 5.60: Micrografías ópticas de las células SAOS-2 tratadas con 25 y 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de: E- macroHAp. Tiempo de incubación: 24 h. El número de células distribuido por placas fue de  $1 \times 10^4$  células/pocillo.

durante 2 horas se muestran en la 5.63. Se puede observar la dependencia de la generación de ROS en la gráfica de intensidad de fluorescencia relativa de las células expuestas a los nanomateriales en comparación con las células control de SAOS-2 tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (control positivo). Como se observa en la 5.63, para los nanomateriales A-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , B-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \text{HAp}$  y C-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  para todas las concentraciones no reveló la producción de especies oxidativas. Por otra parte, D- nanoHAp y E- macroHAp a alta concentración aparentemente indujo la producción de ROS de células SAOS-2, sin embargo no se ha probado estadísticamente.

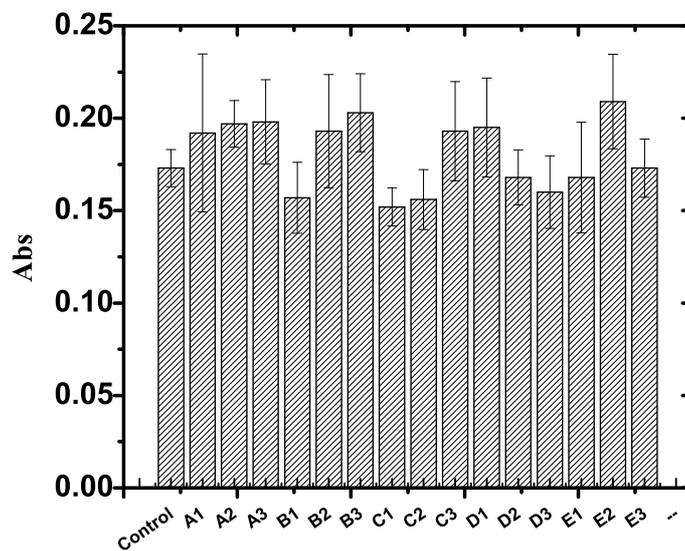


Figura 5.61: Ensayos de citotoxicidad de células SAOS-2 después de la incubación con 25, 50 y 125  $\mu\text{g/mL}$  de cada nanomaterial: A-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ; B-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HAp}$ ; C-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@}\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ; D- nano-HAp y E- macroHAp para 6 h.

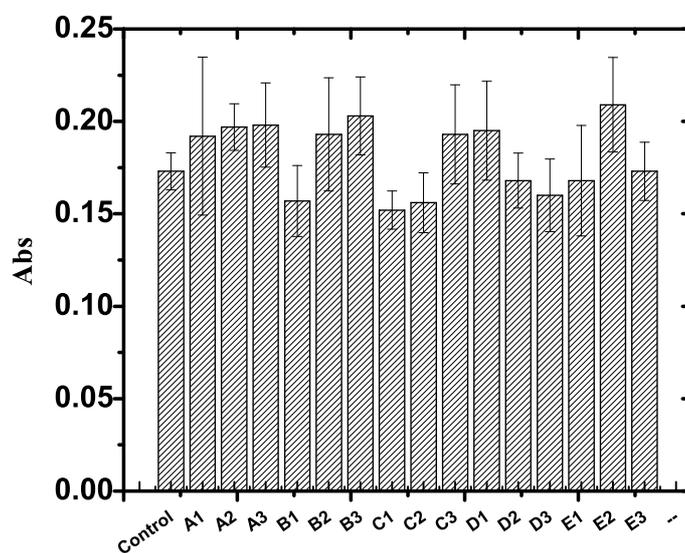


Figura 5.62: Ensayos de citotoxicidad de células SAOS-2 después de la incubación con 25, 50 y 125  $\mu\text{g/mL}$  de cada nanomaterial: A-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ; B-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@HAp}$ ; C-  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@}\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ; D- nano-HAp y E- macro-HAp para 24 h.

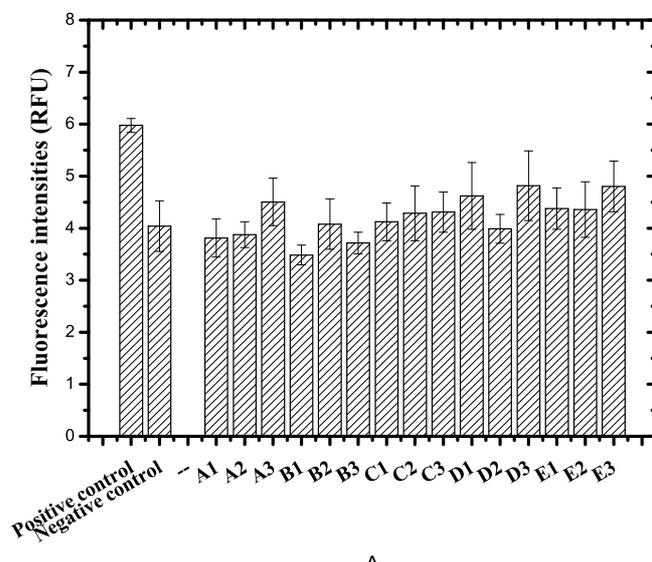


Figura 5.63: Generación ROS para las células SAOS-2 después de la incubación con 25, 50 y 125  $\mu$ /mL de cada nanomaterial, A-  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; B-  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@HAp; C-  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@ $\beta$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; D- nanoHAp y E- macroHAp para 2 h.

### 5.2.9. Inhibición del ensayo de adhesión celular

La capacidad adhesiva de SAOS-2 con A-  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; B-  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@HAp; C-  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@ $\beta$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; D- nanoHAp y E- macroHAp se evaluó como la proporción de las células adherentes tratadas con respecto a las células de control.

La adhesión relativa fue probada con las células SAOS-2 tratadas y no tratadas las cuales crecieron en una capa de colágeno tipo I. Los pocillos recubiertos con BSA fueron utilizados para el control negativo de la adhesión. La adhesión al colágeno tipo I sin capa de nanomateriales se consideró como 100 % (control positivo). Los resultados se muestran en la Fig.5.64, para las células SAOS-2 tratadas con 50 y 125  $\mu$ /ml de A-  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; B-  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@HAp; C-  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@ $\beta$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> se produjo el aumento de la adherencia al colágeno tipo I. Lo mismo se observó para D- nanoHAp y E- macroHAP a la misma concentración, pero con menor intensidad. Estos resultados indican que las muestras: A-  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; B-  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@HAp; C-  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@ $\beta$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> pueden promover una mejor adhesión a las células SAOS-2, que puede facilitar la aplicabilidad de estos compuestos en el tratamiento de células con osteosarcoma por hipertermia.

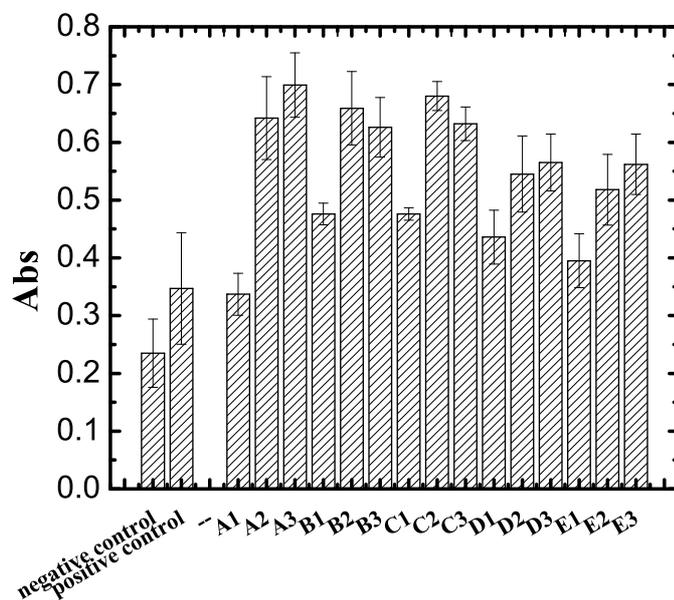


Figura 5.64: Porcentaje de adhesión de las células SAOS-2 al colágeno tipo I después de la incubación con A-  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ; B-  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ @HAp; C-  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ @ $\beta$ - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ; D- nanoHAp y E- macroHAp a 25, 50 and 125  $\mu$ /mL de cada material. Los resultados fueron expresados como el promedio de tres experimentos independientes conducidos en cuadruplicata.



## Capítulo 6

# Conclusiones

El difractograma en polvo de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  exhibe picos anchos en  $2\theta = 30.6$ ; 35.5; 43.4; 53.8; 57.3; 62.7; 71.2 y  $74.8^\circ$ , característico de la estructura cristalina de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y del tamaño nanométrico de la misma, la pureza de la muestra es confirmada en un análisis de deconvolución del pico de difracción 511 donde no se observa una remanencia porcentual de maghemita. Estos resultados son sustentados por la técnica de FTIR, la cual revela que las nanopartículas son más estables en solución coloidal ya que sus bandas asociados a sus grupos funcionales Fe–O por estiramiento ( $620$ ,  $588$  y  $442 \text{ cm}^{-1}$ ) no muestran dislocamientos.

El histograma obtenido por TEM muestra la distribución de tamaños con un diámetro promedio de  $\langle D \rangle = 4.8 \pm 0.6 \text{ nm}$  y factor de polidispersión de 13% para la muestra de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA/OAM$ . Similarmente para la muestra de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@CTAB$  con diámetro promedio de  $\langle D \rangle = 4.7 \pm 0.8 \text{ nm}$  y factor de polidispersión de aproximadamente 17%. Los valores observados por TEM difieren de los obtenidos por dispersión dinámica de la luz ( $2.5 \pm 0.1 \text{ nm}$ ,  $122.4 \text{ nm}$ ) recordando que el diámetro es hidrodinámico.

La espectroscopía UV-VIS de las nanopartículas magnéticas cubiertas con oleilamina y ácido oleico ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA/OAM$ ) suspendidas en ciclohexano es típica de las nanopartículas magnéticas, con una cola de absorción ancha. Con respecto a las nanopartículas funcionalizadas con CTAB se observa una banda absorción a  $257 \text{ nm}$  como un fenómeno característico de las transiciones electrónicas (orbitales-d) del complejo agua e iones de  $\text{Fe}^{+3}/\text{Br}^-$  presentes en la solución acuosa.

Los espectros EPR obtenidos para algunas temperaturas seleccionadas. A la temperatura más alta el espectro es compuesto de una línea ancha casi simétrica alrededor de  $3386 \text{ G}$  ( $g \approx 2.005$ ) característica de nanopartículas superparamagnéticas [130] y una banda pequeña alrededor de  $1700 \text{ G}$  ( $g \approx 3.98$ ). Para una mejor visualización, la banda a bajo campo fue graficada en una escala magnificada. Esta banda de absorción es atribuida los iones paramagnéticos

trivalentes ( $\text{Fe}^{+3}$ ,  $3d^5$ ) con bajo grado de simetría o relacionado a cristalinidad rómbica.

El auto-ensamblaje de los filmes LbL puede ser monitoreado utilizando la técnica de Potencial Zeta (ZP) de las especies químicas inmersas en las soluciones (tres medidas): ZP para PSS en solución con pH 7 fue  $-(64.6 \pm 4.5)$  mV; ZP para PSS en solución de NaOH (pH 12) fue  $-(44 \pm 4)$  mV;  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB en solución de pH 7 fue  $+(90.4 \pm 4.5)$  mV; y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB en solución con pH 12 fue  $+(76 \pm 4)$  mV.

Las propiedades de detección del sistema de 2 bicapas obtenidas por LbL de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB/PSS fueron evaluados utilizando una solución de PB/ phosphate buffer o tampón fosfato a 0.1 M, pH 7.2) y después de la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $500 \mu\text{M}$ ) a  $50 \text{ mVs}^{-1}$ , en una solución purgada y sin purgar con  $\text{N}_2$ . Al observar los voltagramas es evidente que los filmes LbL muestran respuesta al  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La curva analítica del filme conteniendo 2-bicapas LbL después de la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El sensor tiene una buena relación lineal con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el rango de  $100 \mu\text{M}$  a  $1.8 \text{ mM}$  ( $R^2 = 0.994$ ).

La respuesta de los VC del sistema de filmes de 2 bicapas LbL a diferentes tasas de barrido muestran que el pico a ca.  $0.320 \text{ V}$  y  $0.210 \text{ V}$  ( $50 \text{ mVs}^{-1}$ ) están asociados a lo oxidación y reducción de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ , respectivamente. Además, se observa un corrimiento en el pico anódico a potenciales positivos y un corrimiento del pico catódico a valores negativos, con el incremento de la tasa de barrido. La relación de respuesta del pico anódico al catódico es  $\frac{I_{pa}}{I_{pc}} = 0.85 \pm 0.06$ .

El límite de detección (LOD) para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue calculado de acuerdo al criterio  $3\frac{\sigma}{b}$ , donde  $\sigma$  es la desviación estándar ( $n = 7$ ) del blanco (PB,  $0.1\text{M}$  a pH 7.2) y  $b$  es la pendiente de la curva analítica. El valor de LOD estimado fue de  $103 \mu\text{M}$  (este valor resulta en  $4.5 \mu\text{M}$  en el análisis de VC).

La sensibilidad del sistema  $[\text{Fe}_3\text{O}_4$ @CTAB/PSS] $_2$  para  $\text{H}_2\text{O}_2$  es  $16 \text{ nA}\mu\text{M}^{-1}$  (coeficiente angular del gráfico  $I_p$  vs.  $[\text{H}_2\text{O}_2]$ ). Mientras, la sensibilidad obtenida por VC fue de  $94 \text{ nA}\mu\text{M}^{-1}$ .

La constante  $K_m^{app}$  obtenida posee un valor de  $5.3 \text{ mM}$ . Es valor es cercano a  $4.6 \text{ mM}$  y  $4.51 \text{ mM}$  para biosensores basados en la enzima HRP en un filme de sol-gel/hydrogel y HRP inmovilizado dentro de una matriz de ormosil modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple y nilo blue como agente mediador, respectivamente.

Se concluye que las propiedades catalíticas de las nanopartículas en la primera parte de esta tesis presentan ventajas como el límite de detección (LOD), selectividad y sensibilidad a comparación de otros trabajos discutidos en esta Tesis.

Debido a las características mencionadas este sensor no-enzimático puede encontrar aplicaciones en los sectores e industrias ambientales y agro-industriales debido a su bajo costo de producción.

La identificación cristalográfica de las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , HAp y  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  encapsulada en una matriz de HAp y  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  se realizó utilizando el software Cristalográfica con las siguientes cartas cristalográficas (PDF-WIN): 39-1346 para  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , 74-566 para HAp y 9-346 para  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  (difosfato dicalcio). La fase cristalina  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  posee un grupo espacial tetragonal R3c. Los difractogramas de las muestras confirman la presencia de maghemita pura indicados por los picos de difracción a  $2\theta = 18^\circ, 30.2^\circ, 35.5^\circ, 43.2^\circ, 53.54^\circ, 57.27^\circ$ , and  $62.9^\circ$  con índices de Miller (220), (311), (400), (422), (511) y (440). Es importante mencionar que los picos correspondientes a los (hkl) = (400) y (511) son cruciales en la identificación de residuos secundarios de magnetita, como se estudio en los resultados de la primera parte de esta Tesis.

El rol de estabilizante, el cual es dado por el ácido cítrico con potencial zeta negativo en la superficie de  $-38.7$  mV en promedio de tres medidas es dar un tamaño con diámetro promedio de  $12.3 \pm 1.9$  nm. Sin embargo es posible observar las nanopartículas con diámetros inferiores a 4 nm en promedio, sugiriendo que durante el mecanismo de reacción algunos clusters de maghemita se separaron produciendo nanopartículas de menor tamaño dispersadas en la matriz de HAp (modelo core-shell tipo mosaico).

Los mecanismos de interacción de las nanopartículas tipo Wan der Walls, pueden ser regulados en estado coloidal y medio acuoso mediante la funcionalización de las NPM, mediante intercambio, modificación o adhesión de ligandos multifuncionales como el CTAB.

El campo magnético hiperfino observado para el sistema de nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  correspondientes a la segunda parte esta Tesis muestra un comportamiento de dependencia lineal con la temperatura, característico de excitaciones colectivas, utilizando la ecuación para el campo magnético hiperfino reducido propuesta por Morup, el diámetro de las nanopartículas es cercano al obtenido por MET ( $12.3 \pm 1.9$  nm recubiertas con ácido cítrico y 2.9 nm para las NPM embebidas en la matriz de HAp).

Similarmente se aplico el modelo de excitaciones colectivas para el sistema de nanopartículas  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , donde el tamaño calculado disminuye en comparación al obtenido para las nanopartículas no embebidas en la matriz de  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ . Esta disminución es debida a la reacción química de condensación llevada a cabo en la superficie de las NPM.

El análisis de morfología celular revela que la línea de nanomateriales no afecta la morfología de las células SAOS-2 para un tiempo de exposición de 6 y 24 hrs a concentraciones de 25, 50 y 125  $\mu\text{g/ml}$ .

La inhibición del ensayo de adhesión celular revela que las muestras de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \text{HAp}/\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  poseen gran afinidad a las células de osteosarcoma y que son útiles para su tratamiento usando hipertermia.



## Capítulo 7

# Apéndice

En esta sección proponemos otra aplicación del sistema de filmes LbL de  $[\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}]_2$  en dispositivos tipo sensores. Para esto, el filme  $[\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}]_2$  fue utilizado para la detección del ácido cítrico (AC). Debido a sus atributos, existe una demanda mundial de ácido cítrico en muchas ramas de la industria como las bebidas, alimentación e industrias farmacéuticas [164].

Los Voltagramas cíclicos fueron registrados en tampón fosfato (PB, 0.1 M, pH 7.0) con el objetivo de evaluar la respuesta electroquímica de los filmes LbL de  $[\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}]_2$ . Las propiedades sensoriales de los filmes LbL fueron evaluados conforme la adición de ácido cítrico. La Fig.7.1 muestra los voltagramas cíclicos para la detección del ácido cítrico. Se observa una reducción cerca de + 0.1 V y una fuerte reducción en el potencial catódico alrededor de - 0.4 V, después de la adición de ácido cítrico (1.5 mM) en la solución de tampón fosfato. La Fig.7.1 muestra una reducción del potencial catódico para bajo potencial después de la adición de ácido cítrico (Fig.7.1). Los voltagramas claramente muestran la respuesta electroquímica de los filmes LbL de conforme la adición del ácido cítrico. Para confirmar esta asunción, ensayos de cronoamperometría fueron realizados.

La Fig.7.2 indica las respuestas cronoamperometricas de los filmes de  $[\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}]_2$  bajo la adición sucesiva de AC a un potencial aplicado de -0.2 V vs. Ag/AgCl. La correspondiente curva analítica es presentada en el recuadro en la figura. La curva analítica muestra una buena linealidad ( $R^2$ : 0.997) para el AC en el rango entre 50  $\mu\text{M}$  and 2.5 mM con una sensibilidad (pendiente) de 3.0  $\text{nA}\mu\text{M}^{-1}$ . El límite de detección ( $s/n = 3$ ) es 40  $\mu\text{M}$ . La respuesta dinámica del sensor LbL bajo cronoamperometría también fue estudiada.

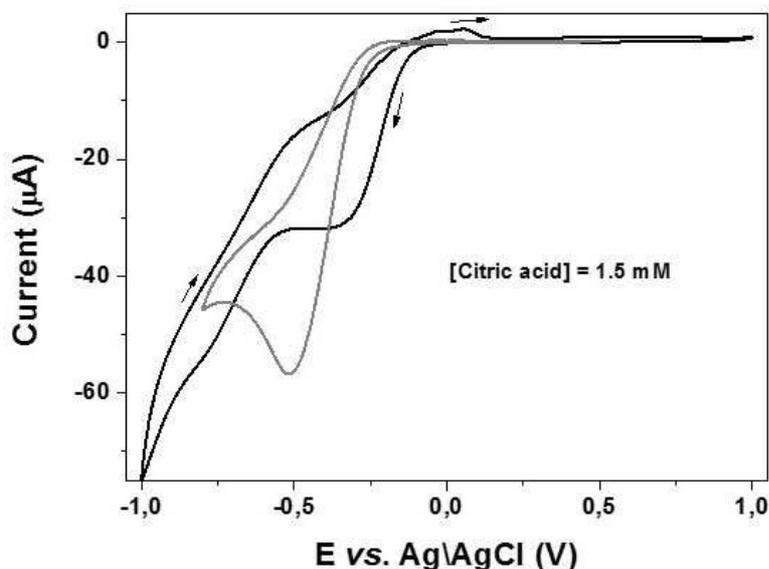


Figura 7.1: Voltagramas cíclicos usando un filme de 2-bicapas de  $[\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}]_2$  como electrodo de trabajo en tampón fosfato (BS, 0.1 M, pH 7.1) en ausencia (negro) y en presencia (gris) de ácido cítrico (1.5 mM) con una tasa de barrido de  $0.05 \text{ V s}^{-1}$  (vs. Ag/AgCl). Las flechas indican la dirección del barrido.

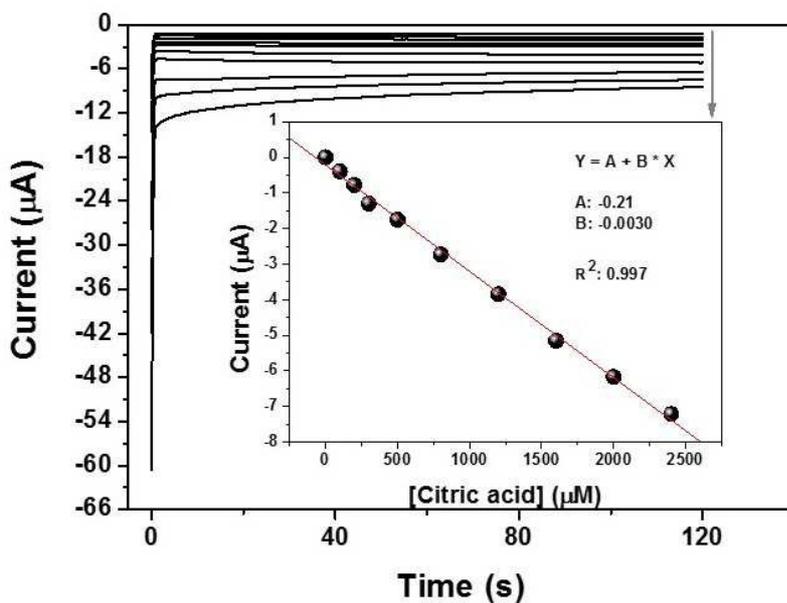


Figura 7.2: Corriente de respuesta del estado estacionario por crono-amperometría del sensor:  $[\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}]_2$  bajo un incremento en la concentración del ácido cítrico. Recuadro: Curva analítica para el sensor LbL  $[\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CTAB}/\text{PSS}]_2$  conforme la adición de ácido cítrico ( $R^2 = 0.997$ ). Electrodo de soporte: Tampón fosfato a 0.1 M y pH 7.0. Potencial aplicado: -0.2 V vs. Ag/AgCl. Tiempo de respuesta: 90 s.

# Bibliografía

- [1] P. Schulz, *Nanotecnologia-Uma historia um pouco diferente*, Ciência Hoje **308**, 26-29 (2013).
- [2] A. Nouailhat, *An introduction to Nanoscience and Nanotechnology*, ISTE Ltd, Londres (2008).
- [3] <http://www.engineering.dartmouth.edu/dccne/projects.html>.
- [4] <http://www.multifun-project.eu/>
- [5] D. Wirtz, K. Konstantopoulos y P. Searson, *The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis*, Nature Rev. **11**, 512-522 (2011).
- [6] T. Linsinger, Q. Chaudhry, V. Dehalu, P. Delahaut, A. Dudkiewicz, R. Grombe R, F. von der Kammer, E. Larsen, S. Legros, K. Loeschner, R. Peters, R. Ramsch, G. Roebben, K. Tiede y S. Weigel; *Validation of methods for the detection and quantification of engineered nanoparticles in food*, Food Chem. **138**, 1959–1966 (2013).
- [7] A. Abbasi, Z. Emam-Djomeh, M. Ebrahimzadeh y D. Davoodi, *Stability of vitamin D<sub>3</sub> encapsulated in nanoparticles of whey protein Isolate*, Food Chem. **143**, 379–383 (2014).
- [8] Y. Liu, Z. Wang, D. Lei y C. Wang; *A new solar spectral selective absorbing coating of SS-(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)/Mo/TiZrN/TiZrON/SiON for high temperature application*, Sol. Ener. Mat. & Solar Cells **127**, 143–146 (2014).
- [9] W. Zhang, Y. Xu, H. Wang, C. Xu y S. Yang; *Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles induced magnetic field effect on efficiency enhancement of P3HT:PCBM bulk heterojunction polymer solar cells*, Sol. Ener. Mat. & Solar Cells **95**, 2880–2885 (2011).
- [10] M. McCall, Environmental, health & safety issues: *Nanoparticles in the real world*, Nat. Nanotechnol. **6**, 613-614(2011).

- [11] V. Stone y K. Donaldson, *Nanotoxicology: Signs of stress*, Nat. Nanotechnol. **1**, 23-24 (2006).
- [12] C. Buzea, I. Pacheco y K. Robbie, *Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity*, Biointerphases **2**, MR17 - MR172 (2007).
- [13] J. Xie, S. Lee y X. Chen, *Nanoparticle-based theranostic agents*, Adv. Drug Deliver. Rev. **62**, 1064–1079, (2010).
- [14] M. Calero, L. Gutiérrez, G. Salas, Y. Luengo, A. Lázaro, P. Acedo, M. P. Morales, R. Miranda y A. Villanueva, *Efficient and safe internalization of magnetic iron oxide nanoparticles: Two fundamental requirements for biomedical applications*, Nanomedicine: Nanotechnol. **10**, 733–743 (2014).
- [15] A. K. Gupta y M. Gupta, *Review: Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*, Biomaterials **26**, 3995-4021 (2005).
- [16] J. Tuček, R. Zboril y D. Petridis, *Maghemite Nanoparticles by View of Mössbauer Spectroscopy*, J. Nanosci. Nanotechnol. **6**, 926-947 (2006).
- [17] H. L. Karlsson, J. Gustafsson, P. Cronholm y L. Möller, *Size-dependent toxicity of metal oxide particles-A comparison between nano- and micrometer size*, Toxicol. Lett. **188**, 112–118 (2009).
- [18] H. Yan, C. Teh, S. Sreejith, L. Zhu, A. Kwok, W. Fang, X. Ma, K. T. Nguyen, V. Korzh y Y. Zhao, *Functional Mesoporous Silica Nanoparticles for Photothermal-Controlled Drug Delivery In Vivo*, Angew. Chem. Int. Ed., **51**, 8373 –8377 (2012).
- [19] K. Bae, K. Lee, C. Kim y T. Park, *Surface functionalized hollow manganese oxide nanoparticles for cancer targeted siRNA delivery and magnetic resonance imaging*, Biomaterials, **32**, 176-184 (2011).
- [20] M. Arruebo, R. Fernández-Pacheco, M. R. Ibarra y J. Santamaría, *Magnetic nanoparticles for drug delivery*, Nanotoday **2**, 22-32 (2007).
- [21] Q. Fan, K. Neoh, E. Kang, B. Shuter y S. Wang, *Solvent-free atom transfer radical polymerization for the preparation of poly(poly(ethyleneglycol) monomethacrylate)-grafted Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: Synthesis, characterization and cellular uptake*, Biomaterials, **28** 5426–5436 (2007).

- [22] M. Calatayud, B. Sanz, V. Raffa, C. Riggio, M. Ibarra y G. Goya, *The effect of surface charge of functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles on protein adsorption and cell uptake*, *Biomaterials*, **35** 6389-6399 (2014).
- [23] N. Prasad, L. Hardel, E. Duguet y D. Bahadur, *Magnetic hyperthermia with biphasic gel of La<sub>1-x</sub>Sr<sub>x</sub>MnO<sub>3</sub> and maghemite*, *J. Magn. Magn. Mater.*, **321**, 1490-1492(2009).
- [24] H. Gupta, P. Paul, N. Kumar, S. Baxi y D. P. Das, *One pot synthesis of water-dispersible dehydroascorbic acid coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles under atmospheric air: Blood cell compatibility and enhanced magnetic resonance imaging*, *J. Colloid Interf. Sci.* **430**, 221-228(2014).
- [25] Z. Zhou, Y. Sun, J. Shen, J. Wei, C. Yu, B. Kong, W. Liu, H. Yang, S. Yang y W. Wang, *Iron/iron oxide core/shell nanoparticles for magnetic targeting MRI and near-infrared photothermal therapy*, *Biomaterials* **35**, 7470-7478 (2014).
- [26] S. Yang, F. Guo, B. Kiraly, X. Mao, M. Lu, K. Leong y T. Huang, *Microfluidic synthesis of multifunctional Janus particles for biomedical applications*, *Lab. Chip.* **12**, 2097-2102 (2012).
- [27] N. Ali, B. Zhang, H. Zhang, W. Zaman, W. Li y Q. Zhang, *Key synthesis of magnetic Janus nanoparticles using a modified facile method*, *Particuology* **17**, 59-65 (2012).
- [28] Y. C. Chao, W. H. Huang, K. M. Cheng y C. Kuo, *Assembly and Manipulation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Coumarin Bifunctionalized Submicrometer Janus Particles*, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 4338-4345 (2014).
- [29] D. Gittins y F. Caruso, *Biological and Physical Applications of Water-Based Metal Nanoparticles Synthesized in Organic solution*, *Chem. Phys. Chem.* **3** 110-113.
- [30] S. Clarke, C. Hollmann, Z. Zhang, D. Suffern, S. Bradforth, N. Dimitrijevic, W. Minarik y J. Nadeau, *Photophysics of dopamine-modified quantum dots and effects on biological systems*, *Nat. Mater.* **5**, 409-417(2006).
- [31] H. Mattoussi, J. Mauro, E. Goldman, G. Anderson, V. Sundar, F. Mikulec y M. Bawendi, *Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein*, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 12142-12150 (2000).
- [32] W. Algar y U. Krull, *Luminescence and stability of aqueous thioalkyl acid capped CdSe-ZnS quantum dots correlated to ligand ionization*, *Chem. Phys. Chem.* **8**, 561-568 (2007).

- [33] F. Dubois, B. Mahler, B. Dubertret, E. Doris y C. Mioskowski, *A versatile strategy for quantum dot ligand exchange*, J. Am. Chem. Soc. **129**, 482–483 (2007).
- [34] Sperling y W. Parak, *Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles*, Phil. Trans. R. Soc. A **368**, 1333–1383 (2010).
- [35] Y. Wang, J. Wong, X. Teng, X. Lin y H. Yang, *Pulling nanoparticles into water: phase transfer of oleic acid stabilized monodisperse nanoparticles into aqueous solutions of  $\alpha$ -cyclodextrin*, Nano Lett. **3**, 1555–1559 (2003).
- [36] A. Wooding, M. Kilner y D. Lambrick, *Studies of the double surfactant layer stabilization of water-based magnetic fluids*, J. Colloid Interf. Sci. **144**, 236–242 (1991).
- [37] W. Wu, Q. He y C. Jiang, *Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies*, Nanoscale Res. Lett. **3**, 397–415 (2008).
- [38] J. D. Wright y N. Sommerdijk, *Sol-Gel Materials Chemistry and Applications*, Taylor & Francis Books Ltd 11 New fetter Lane London EC4P 4EE (2001).
- [39] G. Cao y Y. Wang, *Nanostructures and Nanomaterials-Synthesis, Properties, and Applications* (2nd Edition)©Word Scientific Publishing Co.Pte.Ltd. **ISBN-10: 9814324558**.
- [40] S. Erikson, U. Nylén, S. Rojas y M. Boutonnet, *Preparation of catalysts from microemulsions and their applications in heterogeneous catalysis*, Appl. Catal., A **265**, 207-219 (2004).
- [41] O. Gómez, M. Muñoz, P. Sasia, N. Gómez, F. Río, E. D. de Apodaca, B. Valle, F. Escudero y F. Sánchez, *Revista Iberoamericana de Polímeros* **4**, 14-29 (2003).
- [42] M. Mahmoudi, I. Lynch, M. Ejtehadi, M. Monoli, F. Bombelli y S. Laurent, *Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges*, Chem. Rev. **111**, 5610–5637 (2011).
- [43] X. Yang, W. Jiang, L. Liu, B. Chen, S. Wu, D. Sun y F. Li, *One-step hydrothermal synthesis of highly water-soluble secondary structural Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles*, J. Magn. Magn. Mater. **324**, 2249-2257 (2012).
- [44] A. Gupta y S. Wells, *Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies*, IEEE T. Nanobiosci. **3**, 66-73 (2004).

- [45] T. Ninjbadgar, S. Yamamoto y T. Fukuda, *Synthesis and magnetic properties of the  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/poly-(methyl methacrylate)-core/shell nanoparticles*, Solid State Sci. **6**, 879-885 (2004).
- [46] Y. Sun, X. Ding, Z. Zheng, X. Cheng, X. Hu y Y. Peng, *Surface initiated ATRP in the synthesis of iron oxide/polystyrene core/shell nanoparticles*, E. Polym. J. **43**, 762-772 (2007).
- [47] Y. Zhou, S. Wang, B. Ding y Z. Yang, *Modification of magnetite nanoparticles via surface-initiated atom transfer radical polymerization (ATRP)*, Chem. Eng. J **138**, 578-585 (2008).
- [48] E. Marutani, S. Yamamoto, T. Ninjbadgar, Y. Tsujii, T. Fukuda y M. Takano, *Surface-initiated atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate on magnetite nanoparticles*, Polymer **45**, 2231-2235 (2004).
- [49] M. Lattuada y Hatton, *Functionalization of Monodisperse Magnetic Nanoparticles*, Langmuir **23**, 2158-2168 (2007).
- [50] T. Nguyen y A. Luke, *Review: Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications*, Nano Today **5**, 213-230 (2010).
- [51] C. Graf, S. Dembski, A. Hofmann y E. Ruhl, *A general method for the controlled Embedding of nanoparticles in Silica colloids*, Langmuir **22**, 5604-5610 (2006).
- [52] J. Yuan, S. Armes, Y. Takabayashi, K. Prassides, C. Leite, F. Galembeck y A. Lewis, *Synthesis of Biocompatible Poly[2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine]-Coated Magnetite Nanoparticles*, Langmuir **22**, 10989-10993 (2006).
- [53] M. White, J. Johnson, J. Koberstein y N. Turro, *Toward the Syntheses of Universal Ligands for Metal Oxide Surfaces: Controlling Surface Functionality through Click Chemistry*, J. Am.Chem. Soc. **128**, 11356-11357 (2006).
- [54] Y. Deng, W. Yang, C. Wang y S. Fu, *A Novel Approach for Preparation of Thermo-responsive Polymer Magnetic Microspheres with Core-Shell Structure* Adv. Mater. **15**, 1729-1732 (2003).
- [55] Y. Lien y T. Wu, *Preparation and characterization of thermosensitive polymers grafted onto silica-coated iron oxide nanoparticles*, J. Colloid Interface Sci. **326**, 517-521 (2008).

- [56] M. Mikhaylova, Y. Jo, D. Kim, N. Bobrysheva, Y. Andersson, T. Eriksson et al., *27th International Conference on the Applications of the Mossbauer Effect*, Muscat, Oman, 257-263 (2003).
- [57] T. Gelbrich, M. Feyen y A. Schmidt, *Magnetic Thermoresponsive Core-Shell Nanoparticles*, *Macromolecules* **39**, 3469-3472 (2006).
- [58] A. Chastellain, A. Petri y H. Hofmann, *Particle size investigations of a multistep synthesis of PVA coated superparamagnetic nanoparticles*, *J. Colloid Interface Sci.* **278**, 353-360 (2004).
- [59] B. Schopf, T. Neuberger, K. Schulze, A. Petri, M. Chastellain, M. Hofmann et al, *5th International Conference on Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, Lyon, France, 411-418 (2004).
- [60] C. Lin, C. Lee y W. Chiu, *Preparation and properties of poly(acrylic acid) oligomer stabilized superparamagnetic ferrofluid*, *J. Colloid Interface Sci.* **291**, 411-420 (2005).
- [61] I. Robinson, C. Alexander, L. Lu, L. Tung, D. Fernig y N. Thanh, *One-step synthesis of monodisperse water-soluble "dual responsive" magnetic nanoparticles*, *Chem. Commun.* 4602-4604 (2007).
- [62] I. Robinson, C. Alexander, L. Tung, D. Fernig y N. Thanh, *7th International Conference on Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, Vancouver, Canada, 1421-1423 (2008).
- [63] H. He, H. Liu, K. Zhou, W. Wang y P. Rong, *Characteristics of magnetic  $Fe_3O_4$  nanoparticles encapsulated with human serum albumin*, *J. Cent. South Univ. Technol.* **13**, 6 (2006).
- [64] M. Mikhaylova, D. Kim, C. Berry, A. Zagorodni, M. Toprak, A. Curtis y M. Muhammed, *BSA Immobilization on Amine-Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*, *Chem. Mater.* **16**, 2344 (2004).
- [65] M. Lewin, N. Carlesso, C. Tung, X. Tang, D. Cory, D. Scadden y R. Weissleder, *Tap peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells*, *Nat. Biotechnol.* **18**, 410 (2000).
- [66] L. Tiefenauer, G. Kuhne y R. Andres, *Antibody-magnetite nanoparticles: In vitro characterization of a potential tumor-specific contrast agent for magnetic resonance imaging*, *Bioconjug. Chem.* **4**, 347 (1993).

- [67] J. Nam, S. Stoeva y C. Mirkin, *Bio-Bar-Code-Based DNA Detection with PCR-like Sensitivity*, *J. Am. Chem. Soc.* **126** 5932 (2004).
- [68] Z. Chunfu, C. Jinquan, Y. Duanzhi, W. Yongxian, F. Yanlin y T. Jiajü, *Preparation and radiolabeling of human serum albumin (HSA)-coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy*, *J. Tan, Appl. Radiat. Isot.* **61**, 1255 (2004).
- [69] S. Kang, Y. Jun, J. Phil, K. Kim y Y. Kim, *Evaluation for Protein Binding Affinity of Maghemite and Magnetite Nanoparticles*, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **7**, 3706-3708 (2007).
- [70] D. K. Gosser, *Cyclic Voltammetry, Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms* ©1993 VCH Publishers, Inc., ISBN 1-56081-026-2.
- [71] Temenoff J y A. Mikos, *Biomaterials: The intersection of Biology and Materials Science* ©2008 Pearson Education, Inc. Pearson Prentice Hall, ISBN 0-13-009710-1.
- [72] J. Wang, *Analytical Electrochemistry* ©1994 VCH Publishers, Inc. ISBN 1-56081-575-2.
- [73] M. Pérez García, J. Álvarez, J. Campo et al, *Instrumentación Electrónica* ©2004 International Thomson Editores Spain Paraninfo, S.A. Magallanes, 25; 28015 Madrid España, ISBN: 84-9732-166-9.
- [74] V. Marangoni, M. Martins, J. Souza, Jr. Oliveira, V. Zucolotto y F. Crespilho, *The processing of polyelectrolyte-covered magnetite nanoparticles in the form of nanostructured thin films*, *J. Nanopart. Res.* **14**, 769 (2012).
- [75] D. Gero, *Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites*, *Science* **277**, 1232–1237 (1997).
- [76] Z. Yang, C. Zhang, J. Zhang y W. Bai, *Potentiometric glucose biosensor based on core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-enzyme-polypyrrole nanoparticles*, *Biosens. Bioelectron.* **51**, 268–273 (2014).
- [77] W. Li, Y. Wang y A. Irini, *Effect of pH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dosage on catechol oxidation in nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> catalyzing UV-Fenton and identification of reactive oxygen species*, *Chem. Eng. J.* **244**, 1-8 (2014).
- [78] C. Yu, Y. Wang, L. Wang, Z. Zhu, N. Bao y H. Gu, *Nanostructured biosensors built with layer-by-layer electrostatic assembly hemoglobin and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pt nanoparticles*, *Colloids Surf., B: Biointerfaces*, **103** 231– 237 (2013).

- [79] M. Martins, C. Bonfim, W. C. da Silva y F. Crespilho, *Iron (III) nanocomposites for enzyme-less biomimetic cathode: A promising material for use in biofuel cells*, *Electrochem. Commun.* **12**, 1509–1512 (2010).
- [80] L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, J. Feng, D. Yang, S. Perrett y X. Yan, *Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles*, *Nat. Nanotechnol.* **2**, 577–583 (2007).
- [81] B. Šljukić, C. Banks y R. Compton, *Iron oxide particles are the active sites for hydrogen peroxide sensing at multiwalled carbon nanotube modified electrodes*, *Nano Lett.* **6**, 1556–1558 (2006).
- [82] Z. Liu, B. Zhao, Y. Shi, C. Guo, H. Yang y Z. Li, *Novel nonenzymatic hydrogen peroxide sensor based on iron oxide–silver hybrid submicrospheres*, *Talanta* **81**, 1650–1654 (2010).
- [83] M. Tarvin, B. McCord, K. Mount, K. Sherlachd y M. Miller, *Optimization of two methods for the analysis of hydrogen peroxide: High performance liquid chromatography with fluorescence detection and high performance liquid chromatography with electrochemical detection in direct current mode*, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 7564–7572 (2010).
- [84] W. Chen, S. Cai, Q. Ren, W. Wen y Y. Zhao, *Recent advances in electrochemical sensing for hydrogen peroxide: a review*, *Analyst*, **137** 49–58 (2012).
- [85] F. Hernandez y V. Ozalp, *Graphene and Other Nanomaterial-Based Electrochemical Aptasensors*, *Biosensors* **2**, 1-14 (2012).
- [86] S. Guo, S. Dong y E. Wang, *Polyaniline/Pt Hybrid Nanofibers: High-Efficiency Nanoelectrocatalysts for Electrochemical Devices*, *Small* **5**, 1869–1876 (2009).
- [87] M. Gouda, M. Kumar, M. Thakur y N. Karanth, *Enhancement of operational stability of an enzyme biosensor for glucose and sucrose using protein based stabilizing agents*, *Biosens. Bioelectron.* **17**, 503-507 (2002).
- [88] E. Fernandes, L. Brazaca, M. Rodríguez-Mendez, J. A. de Saja y V. Zucolotto, *Immobilization of lutetium bisphthalocyanine in nanostructured biomimetic sensors using the LbL technique for phenol detection*, *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4715–4719 (2011).
- [89] K. Kirimura, Y. Honda y T. Hattori, *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Academic Press, **3**, 135-142 (2011).

- [90] H. Cen, Y. Bao, Y. He y D. Sun, *Visible and near infrared spectroscopy for rapid detection of citric and tartaric acids in orange juice*, J. Food Eng. **82**, 253–260 (2007).
- [91] D. Gyawali, P. Nair, Y. Zhang, R. Tran, C. Zhan, M. Samchukov, M. Makarov, H. Kim y J. Yang, *Citric acid-derived in situ crosslinkable biodegradable polymers for cell delivery*, Biomaterials **31**, 9092–9105 (2010).
- [92] H. Cen, B. De Borba, J. Rohrer y L. Bhattacharyya, *Development and validation of an assay for citric acid/citrate and phosphate in pharmaceutical dosage forms using ion chromatography with suppressed conductivity detection*, J. Pharma. Biomed. Anal. **36**, 517–524 (2004).
- [93] A. Cid, M. Yebra y X. Santos, *Flow injection determinations of citric acid: a review*, Talanta **63**, 509–514 (2004).
- [94] L. Saavedra, A. Garcia y C. Barbas, *Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acid as adulteration markers in orange juice*, J. Chromatogr. A, **881** 395–401 (2000).
- [95] H. Zhike, G. Hua, Y. Liangjie, L. Shaofang, M. Hui, L. Xiaoyan y Z. Yun'e, *Pulse injection analysis with chemiluminescence detection: determination of citric acid using tris-(2,2'-bipyridine) ruthenium(II)*, Talanta **47**, 301–304 (1998).
- [96] S. Awasthi, A. Srivastava y M. Singla, *Voltammetric determination of citric acid and quinine hydrochloride using polypyrrole-pentacyanonitrosylferrate/platinum electrode*, Synthetic Metals **161**, 1707–1712 (2011).
- [97] A. Bee, R. Massart, S. Neveu, *Synthesis of very fine maghemite particles*, J. Magn. Magn. Mater. **149**, 6–9 (1995).
- [98] D. Wyrzykowski y L. Chmurzynski, *Thermodynamics of citrate complexation with  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  ions*, J. Therm. Anal. Calorim. **102** 61–64 (2010).
- [99] B. Lobel, O. Eyal, N. Kariv y A. Katzir, *Temperature controlled  $CO_2$  laser welding of soft tissues: Urinary bladder welding in different animal models (rats, rabbits, and cats)*, Lasers Surg. Med. **26**, 4–12 (2000).
- [100] N. Fried, B. Choi, A. Welch y J. Walsh Jr., *Radiometric surface temperature measurements during dye-assisted laser skin closure: in vitro and in vivo results*, Lasers Surg. Med. **25**, 291–303 (1999).

- [101] Y. Ying, *Nanostructured Materials* © 2001 by Academic Press.
- [102] A. Chaudhry, S. Haque, S. Kellici, P. Boldrin, I. Rehman, F. Khalid y J. Darr, *Instant nano-hydroxyapatite: a continuous and rapid hydrothermal synthesis*, Chem. Commun. 2286–2288 (2006).
- [103] A. Balamurugan, J. Michel, J. Fauré, H. Benhayoune, L. Wortham, G. Sockalingum, V. Banchet, S. Bouthors, D. Laurent-Maquin y G. Balossier, *Synthesis and structural analysis of sol gel derived stoichiometric monophasic hydroxyapatite*, Ceram. Silikáty **50**, 27-31 (2006).
- [104] <http://www.wseas.us/e-library/conferences/2011/Cambridge/NEHIPISIC/NEHIPISIC-50.pdf>
- [105] C. Qiu, X. Xiao y R. Liu, *Biomimetic synthesis of spherical nano-hydroxyapatite in the presence of polyethylene glycol*, Ceram. Int. **34**, 1747–1751 (2008).
- [106] C. Hou, S. Hou, Y. Hsueh, J. Lin, H. Wu y F. Lin, *The in vivo performance of biomagnetic hydroxyapatite nanoparticles in cancer hyperthermia therapy*, Biomaterials **30**, 3956–3960 (2009).
- [107] A. Tampieri, T. D'Alessandro, M. Sandri, S. Sprio, E. Landi, L. Bertinetti, S. Panseri, G. Pepponi, J. Goettlicher, M. Bañobre-López y J. Rivas, *Intrinsic magnetism and hyperthermia in bioactive Fe-doped hydroxyapatite*, Acta Biomater. **8**, 843-851 (2012).
- [108] S. Panseri, C. Cunha, T. D'Alessandro, M. Sandri, G. Giavaresi, M. Marcacci, C. Hung y A. Tampieri, *Intrinsically superparamagnetic Fe-hydroxyapatite nanoparticles positively influence osteoblast-like cell behavior*, J. Nanobiotechnol. **10**, 32 (2012).
- [109] X. Zeng, H. Hu, L. Xie, F. Lan, W. Jiang, Y. Wu y Z. Wei Gu, *Magnetic responsive hydroxyapatite composite scaffolds construction for bone defect reparation*, Int. J. Nanomed. **7**, 3365-3378 (2012).
- [110] M. Sadat-Shojai, M. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi y A. Jamshidi, *Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures*, Acta Biomater. **9**, 7591–7621 (2013).
- [111] J. Carvajal, *FullProf program: Rietveld, profile matching and integrated intensities refinement of x-ray and/or neutron data (powder and/or single-crystal)*. Laboratoire Leon Brillouin (CEA-CNRS) (2007).

- [112] G. Pawley, *Unit-cell refinement from powder diffraction scans*, J. Appl. Crystallogr. **14**, 357-361 (1981).
- [113] P. Thompson, D. Cox y J. Hastings, *Rietveld refinement of Debye-Scherrer synchrotron X-ray data from Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*, J. Appl. Crystallogr. **20**, 79-83 (1987).
- [114] S. Sasaki, *Radial Distribution of Electron Density in Magnetite, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>*, Acta Cryst. B **53**, 762-766 (1997).
- [115] N. Popa, *The (hkl) Dependence of Diffraction-Line Broadening Caused by Strain and Size for all Laue Groups in Rietveld Refinement*, J. Appl. Crystallogr. **31**, 176-180 (1998).
- [116] C. Oatley, *Scanning Electron Microscopy I. The instrument*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, (1988).
- [117] Philipp Gütlich et al, *Mössbauer spectroscopy and Transitions Metal Chemistry: Fundamentals and Applications*, Edit. Springer (2011).
- [118] J. Xie, C. Xu, N. Kohler, Y. Hou y S. Sun, *Controlled PEGylation of Monodisperse Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles for Reduced Non-specific Uptake by Macrophage Cells*, Adv. Mater., **19**, 3163-3166 (2007).
- [119] S. Sun, H. Zeng, D. Robinson, S. Raoux, P. Rice, S. Wang y G. Li, *Monodisperse MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles*, J. Am. Chem. Soc. **126**, 273-279 (2004).
- [120] J. Park, K. An, Y. Hwang, J. Park, H. Noh, J. Kim, J. Park, N. Hwang y T. Hyeon, *Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals*, Nat. Mater. **3**, 891-895 (2004).
- [121] L. Li, K. Mak, C. Leung, K. Chan, W. Chan, W. Zhong y P. Pong, *Effect of synthesis conditions on the properties of citric-acid coated iron oxide nanoparticles*, Microelectron. Eng. **110**, 329-334 (2013).
- [122] E. Cheraghipour, S. Javadpour y A. Mehdizadeh, *Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy*, J. Biomed. Sci. Eng. **5**, 715-719 (2012).
- [123] W. Feng, E. Sun, A. Fujii, A. Wu, K. Nihara y K. Yoshino, *Synthesis and characterization of Photoconducting Polyaniline-TiO<sub>2</sub> Nanocomposite*, Bull. Chem. Soc. Jpn. **73**, 2627 (2000).
- [124] W. Kim, C. Suh, S. Cho, K. Roh, H. Kwon, K. Song e I. Shon, *A new method for the identification and quantification of magnetite-maghemite mixture using conventional X-ray diffraction technique*, Talanta, **94**, 348-352 (2014).

- [125] G. Platas y J. Carvajal, *GFourier: a Windows/Linux program to calculate and display Fourier maps*, Program available within the FullProf Suite (2005).
- [126] M. Correa-Duarte, M. Giersig, N. Kotov y L. Liz-Marzán, *Control of packing order of self-assembled monolayers of magnetite nanoparticles with and without SiO<sub>2</sub> coating by microwave irradiation*, *Langmuir* **14**, 6430–6435 (1998).
- [127] B. Carr y M. Wright, *Nanoparticle Tracking Analysis: A review of Applications and Usage* Copyright NanoSight Ltd. (2013).
- [128] J. Zhang y R. Misra, *Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer: Core-shell nanoparticle carrier and drug release response*, *Acta Biomater.* **3**, 838–850 (2007).
- [129] T. Gavrilko, G. Puchkovska, V. Styopkin, T. Bezrodna, J. Baran y M. Drozd, *Molecular dynamics and phase transitions behavior of binary mixtures of fatty acids and cetyltrimethylammonium bromide as studied via Davydov splitting of molecular vibrational modes*, *Ukr. J. Phys.* **58**, 636–645 (2013).
- [130] Y. Köseoğlu, *Effect of surfactant coating on magnetic properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: ESR study*, *J. Magn. Magn. Mater.* **300**, 327–330 (2006).
- [131] R. Berger, J. Bissey, J. Kliava, H. Daubric y C. Estournes, *Temperature dependence of superparamagnetic resonance of iron oxide nanoparticles*, *J. Magn. Magn. Mater.* **234**, 535–544 (2001).
- [132] A. Bencini y D. Gatteschi, *EPR of exchange coupled systems*, Springer-Verlag, p. 160 (1990).
- [133] A. Wang, Y. Li, Z. Li, J. Feng, Y. Sun y J. Chen, *Amperometric glucose sensor based on enhanced catalytic reduction of oxygen using glucose oxidase adsorbed onto core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@silica@Au magnetic nanoparticles*, *Mater. Sci. Eng. C* **32**, 1640–1647 (2012).
- [134] M. Baghayeri, E. Zare y M. Lakouraj, *A simple hydrogen peroxide biosensor based on a novel electro-magnetic poly(p-phenylenediamine)@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite*, *Biosens. Bioelectron.* **55**, 259–265 (2014).
- [135] L. Xu y J. Wang, *Fenton-like degradation of 2,4-dichlorophenol using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles*, *Appl. Catal.B: Environ.* **123**, 117–126 (2012).

- [136] S. Goldstein, D. Meyerstein y G. Czapski, *The Fenton reagents*, Free Radic. Biol. Med. **15**, 435–445 (1993).
- [137] K. Rusevova, F. Kopinke y A. Georgi, *Nano-sized magnetic iron oxides as catalysts for heterogeneous Fenton-like reactions—Influence of Fe(II)/Fe(III) ratio on catalytic performance*, J. Hazard. Mater. 433–440 (2012).
- [138] C. Hui, C. Shen, T. Yang, L. Bao, J. Tian, H. Ding, C. Li y H. Gao, *Large-Scale Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Soluble in Water Synthesized by a Facile Method*, J. Phys. Chem. C **112**, 11336–11339 (2008).
- [139] F. Marken, D. Patel, C. Madden, R. Millward y S. Fletcher, *The direct electrochemistry of ferritin compared with the direct electrochemistry of nanoparticulate hydrous ferric oxide*, New J. Chem. **26**, 259–263 (2002).
- [140] Website: [depa.fquim.unam.mx/vmus/ECC/voltamperometria1.ppt](http://depa.fquim.unam.mx/vmus/ECC/voltamperometria1.ppt)
- [141] J. Randles, *A cathode ray polarograph. Part II. The current-voltage curves*, Trans. Faraday Soc. **44**, 327–338 (1948).
- [142] A. Ševčík, *Oscillographic polarography with periodical triangular voltage*, Collect. Czech. Chem. Commun. **13**, 349–377 (1948).
- [143] C. Apetrei, P. Alessio, C. Constantino, J. A. de Saja, M. Rodriguez-Mendez, F. Pavinatto, E. Fernandes, V. Zucolotto y O. Oliveira Jr., *Biomimetic biosensor based on lipidic layers containing tyrosinase and lutetium bisphthalocyanine for the detection of antioxidants*, Biosens. Bioelectron. **26**, 2513–2519 (2011).
- [144] R. Adams, *Electrochemistry at Solid Electrodes*, Marcel Dekker, New York (1969).
- [145] M. Guascito, E. Filippo, C. Malitesta, D. Manno, A. Serra y A. Turco, *A new amperometric nanostructured sensor for the analytical determination of hydrogen peroxide*, Biosens. Bioelectron. **24**, 1057–1063 (2008).
- [146] F. Fogolari, A. Corazza, S. Toppo, S. Tosatto, P. Viglino, F. Ursini y G. Esposito, *Studying interactions by molecular dynamics simulations at high concentration*, J. Biomed. Biotechnol. 1–9 (2012).
- [147] S. He, W. Shia, X. Zhang, J. Li y Y. Huang,  *$\beta$ -cyclodextrins-based inclusion complexes of CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles as catalyst for the luminal chemiluminescence system and their applications in hydrogen peroxide detection*, Talanta **82**, 377–383 (2010).

- [148] H. Bisswanger, in *Enzyme Kinetics. Principles and Methods*, Cap. 2, pp. 66-77, 2da edición, Wiley-VCH, Weinheim (2008).
- [149] J. Mu, L. Zhang, M. Zhao y Y. Wang, *Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as an efficient catalase mimic: Properties, mechanism and its electrocatalytic sensing application for hydrogen peroxide*, *J. Mol. Catal. A: Chemical*, **378**, 30 – 37 (2013).
- [150] Y. Xin, X. Fu-bing, L. Hong-wei, W. Feng, C. Di-zhao y W. Zhao, *A novel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au magnetic nanoparticles coated horseradish peroxidase and graphene sheets-Nafion film modified screen-printed carbon electrode*, *Electrochim. Acta* **109**, 750–755 (2013).
- [151] M. Delvaux, A. Walcarius y S. Champagne, *Electrocatalytic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amperometric detection using gold nanotube electrode ensembles*, *Anal. Chim. Acta* **525**, 221–230 (2004).
- [152] X. Tan, J. Zhang, S. Tan, D. Zhao, Z. Huang, Y. Mi y Z. Huang, *Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Immobilization of Hemoglobin on a Glassy Carbon Electrode Modified with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Chitosan Core-Shell Microspheres*, *Sensors*, **9**, 6185-6199 (2009).
- [153] D. Baratella, M. Magro, G. Sinigaglia, R. Zboril, G. Salviulo y F. Vianello, *A glucose biosensor based on surface active maghemite nanoparticles*, *Biosens. Bioelectron.* **45**, 13–18 (2013).
- [154] W. White y B. DeAngelis, *Interpretation of the vibrational spectra of spinels*, *Spectrochim. Acta, Part. A: Molecular Spectroscopy*, **23**, 985–995 (1967).
- [155] T. Belin, N. Guigue-Millot, T. Caillot, D. Aymes y J. Niepce, *Influence of Grain Size, oxygen Stoichiometry, and Synthesis Conditions on the  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Vacancies Ordering and Lattice Parameters*, *J. Solid State Chem.* **163**, 459-465 (2002).
- [156] R. Waldron, *Infrared Spectra of Ferrites*, *Phys. Rev.* **99**, 1727-1735 (1955).
- [157] W. White y B. De Angelis, *Interpretation of the vibrational spectra of spinels*, *Spectrochim. Acta Part A* **23**, 985-995 (1967).
- [158] S. Koutsopoulos, *Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods*, *Biomed. Mater. Res.* **62**, 600–612 (2002).
- [159] Y. Wang, S. Zhang, K. Wei, N. Zhao, J. Chen y X. Wang, *Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template*, *Mater. Lett.* **60**, 1484–1487 (2006).

- [160] K. Mori, S. Kanai, T. Hara, T. Mizugaki, K. Ebitani, K. Jitsukawa y K. Kaneda, *Development of Ruthenium-Hydroxyapatite-Encapsulated Superparamagnetic  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanocrystallites as an Efficient Oxidation Catalyst by Molecular Oxygen*, Chem. Mater. **19**, 1249-1256 (2007).
- [161] S. Morup y H. Topsoe, *Mössbauer studies of thermal excitations in magnetically ordered microcrystals*, Appl. Phys. **11**, 63-66 (1976).
- [162] S. Morup, *Magnetic hyperfine splitting in Mössbauer spectra of microcrystals*, J. Magn. Magn. Mater. **37**, 39-50 (1983).
- [163] S. Morup y B. Hansen, *Uniform magnetic excitations in nanoparticles*, Phys. Rev. B **72** 024418(2005).
- [164] G. Dhillon, S. Brar, M. Verma y R. Tyagi, *Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by Aspergillusniger*, Biochem. Eng. J. **54**, 83-92 (2011).
-