



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE ZACATECAS

"FRANCISCO GARCÍA SALINAS"

UNIDAD ACADÉMICA DE ESTUDIOS
NUCLEARES



SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y RECUBRIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS

TESIS

Presentada por:

Hugo Enrique Flores Orozco

en cumplimiento parcial de los requisitos para la obtención del grado de

Maestro en Ciencias Nucleares

con opción terminal en Técnicas Analíticas Nucleares

Asesores:

Dra. Sonia Azucena Saucedo Anaya

Dr. Said Eduardo Aranda Espinoza

Dr. José Juan Francisco Castillo Rivera

Septiembre 2018



UAZ



Asunto: Asignación de tema de tesis

Q.F.B. Hugo Enrique Flores Orozco
Alumno MCN
Presente

En relación a su comunicado, por medio del cual solicita el tema que deberá desarrollar como su tesis de maestría para obtener el grado de Maestro en Ciencias Nucleares, manifiesto lo siguiente.

Con esta fecha, se reunieron los señores Dra. Sonia Azucena Saucedo Anaya Y Dr. J. Ignacio Dávila Rangel, Director de la UAEN y estuvieron acordes en fijar a usted el siguiente

TEMA

“Síntesis, caracterización y recubrimiento de nanopartículas superparamagnéticas”

Lo que comunico a usted para su conocimiento, manifestándole que para la presentación de la TESIS, esta no deberá ser impresa hasta en tanto no envíe siete copias de la misma, para ser revisada por la comisión que se nombra en su oportunidad para su aprobación o en su caso indicarle las correcciones que fueren pertinentes.

ATENTAMENTE
Zacatecas, Zac., a 18 de septiembre del 2018



Dr. J. Ignacio Dávila Rangel
Director UAEN
Unidad Académica de Estudios Nucleares



Of. No. 254/18

Zacatecas, Zac., 25 de septiembre del 2018

**Q.F.B. Hugo Enrique Flores Orozco,
Presente**

La Unidad Académica de Estudios Nucleares de la Universidad Autónoma de Zacatecas a través del Programa de Maestría en Ciencias Nucleares, comunica a Usted que la Comisión revisora integrada por:

Dr. José Francisco Castillo Rivera
Dra. Sonia Azucena Saucedo Anaya
Dr. Said Eduardo Aranda Espinoza
Dr. Carlos Ríos Martínez
Dr. José Luis Pinedo Vega
Dr. Fernando Mireles García

Revisó y aprobó el trabajo de tesis **"Síntesis, caracterización y recubrimiento de nanopartículas superparamagnéticas"**.

Por lo que está usted facultado por esta Unidad Académica para imprimirlo y realizar los trámites necesarios ante la Rectoría de la Universidad Autónoma de Zacatecas, para la realización de su Examen de Grado.

Atentamente


Dra. Sonia Azucena Saucedo Anaya
Responsable de Posgrado UAEN



SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y RECUBRIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS

TESIS

Presentada por:

Hugo Enrique Flores Orozco

en cumplimiento parcial de los requerimientos para la obtención del grado de

Maestro en Ciencias Nucleares

con opción terminal en Técnicas Analíticas Nucleares

Aprobada y comentada por:

Dra. Sonia Azucena Saucedo Anaya
UAZ UAEN. Asesora

Dr. Said Eduardo Aranda Espinoza
UASLP. Instituto de Física. Co-asesor

Dr. José Juan Francisco Castillo
Rivera. UASLP. Co-asesor.

Dr. Carlos Ríos Martínez
UAZ UAEN.

Dr. Fernando Mireles García
UAZ UAEN.

Dr. José Luis Pinedo Vega
UAZ UAEN.

Septiembre 2018

AGRADECIMIENTOS

Para comenzar me gustaría agradecer a la Dra. Sonia Azucena Saucedo Anaya, mi directora de tesis, por otórgame siempre todo el apoyo moral, económico y técnico incondicionalmente, así como por su paciencia, comprensión y guía durante todo este proyecto a pesar de todos los obstáculos encontrados durante el proceso.

Al Dr. Said Eduardo Aranda Espinoza por permitirme realizar la parte experimental de mi tesis en el laboratorio de Materia Blanda y Biofísica del Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, así como por la co-asesoría y todo el apoyo técnico.

Al Dr. Juan José Francisco Castillo Rivera por el apoyo en cuanto a las técnicas de difracción de rayos X y microscopía electrónica, así como por su asesoría, apoyo y compromiso durante todo el proyecto.

A la M. en C. María de Lourdes Gonzáles González por toda la asesoría profesional y por fungir como mi mentora en el laboratorio de Materia Blanda y Biofísica del Instituto de Física de la UASLP.

A mis maestros durante el desarrollo de la maestría por todo el conocimiento compartido, así como las enseñanzas y consejos durante las clases, especialmente al Dr. Fernando Mireles García por la claridad, paciencia, alegría y pedagogía al impartir sus clases, al Dr. Carlos Ríos Martínez por hacer de sus cátedras momentos tan agradables que facilitaban en gran medida la comprensión y adquisición de conocimientos complicados, al M. en C. Hugo López del Rio por su excelente manera de transmitir las habilidades relacionadas con el laboratorio de radioquímica, demostrando así su gran capacidad y conocimientos, así como su exactitud al momento de la enseñanza, al Dr. José Luis Pinedo Vega por impartir sus enseñanzas con una sabiduría y sofisticación tan vastos que llegan al punto de la genialidad.

A la M. en C. María Eugenia Charo Alvarado por el apoyo en el área de espectrometría infrarroja.

Al Dr. Gustavo Ríos Moreno por el apoyo en el área de espectrometría infrarroja.

A mi mamá María Dominga Orozco Escobedo por ser la razón y la motivación principal en todos los proyectos que me propongo, así como por otórgame apoyo infinito e incondicional.

A la Q.F.B. Laura Karina Trujillo Espinoza por la asesoría profesional en el área de química y tecnologías de la información y comunicación, así como por personificar la esperanza, pureza y el amor en mi vida.

A mi familia por representar mis raíces y brindarme la mano siempre que es necesario en especial a la Lic. Norma Angélica Flores Vargas y a la C. Nubia Elizabeth Flores Vargas, sin las cuales este proyecto no sería posible.

Me gustaría agradecer también al CONACYT por haber contado con la beca para el desarrollo de la maestría.

Finalmente Agradezco el apoyo de proyecto CONACYT de Ciencia Básica 169504.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
1 INTRODUCCIÓN	5
Justificación	8
Objetivos	8
2 REVISIÓN DE LITERATURA	9
2.1 NANO PARTÍCULAS MAGNÉTICAS (NPM).....	9
2.2 SÍNTESIS DE NPM.....	12
2.3 RECUBRIMIENTO CON SÍLICE	14
2.4 CARACTERIZACIÓN DE NPM.....	17
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	20
3.1 MATERIALES.....	20
3.1.1 REACTIVOS.....	20
3.1.2 EQUIPO	20
3.2 METODOLOGÍA.....	21
3.2.1 SÍNTESIS DE NPM.....	21
3.2.2 LAVADO	22
3.2.3 RECUBRIMIENTO UTILIZANDO TEOS, APTES Y TEOS/APTES (1:1)	22
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X.....	23
4.2 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS).....	24
4.3 MAGNETOMETRÍA.....	25
4.4 POTENCIAL ζ	26
4.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	27
4.6 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS) DE PARTÍCULAS CUBIERTAS CON SÍLICE UTILIZANDO TEOS	28
4.7 MAGNETOMETRÍA DE NPM CUBIERTAS CON SÍLICE UTILIZANDO TEOS.....	29

4.8 POTENCIAL ζ DE PARTÍCULAS CUBIERTAS CON SÍLICE UTILIZANDO TEOS	31
4.9 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRASMISIÓN DE NPM CUBIERTAS CON SILANOS	31
4.10 ESPECTROSCOPIA FT-IR PARA LAS MUESTRAS DE MAGNETITA 3 CON Y SIN RECUBRIMIENTO.....	34
5 CONCLUSIÓN	36
PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	36
REFERENCIAS	37

RESUMEN

Las nanopartículas magnéticas tienen una amplia gama de aplicaciones en diversa áreas de la medicina y la biotecnología. Al ser recubiertas con óxido de silicio son protegidas de la degradación. La capa puede ser funcionalizada fácilmente con diversos agentes químicos o biológicos los cuales le confieren diferentes tipos de capacidades. En este trabajo se sintetizaron nanopartículas magnéticas (NPM) de tipo magnetita (Fe_3O_4) mediante el método de co-precipitación, modificando parámetros como temperatura, pH, agente precipitante y tiempo de sonicación, con el fin de reducir la polidispersidad. La caracterización de las NPM se realizó mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), difracción de rayos x (XRD), espectroscopía infrarroja (FT-IR), dispersión dinámica de luz (DLS), Potencial ζ y magnetometría. Se obtuvieron NPM polidispersas las cuales presentan también superparamagnetismo. En cuanto a sus características en solución, poseen una carga superficial promedio de $+45.2 \pm 4.0$ mV y un diámetro hidrodinámico variable, con dos grupos de tamaños de partícula, para dos métodos probados de síntesis. El tiempo de sonicación resultó ser crucial para la disminución de la polidispersidad. De esa manera, mediante una tercera variación del método de síntesis, se obtuvieron NPM con un diámetro hidrodinámico que promediaba los 200 nm y un diámetro de partícula, obtenido mediante TEM, de 10 nm en promedio. Se realizó el recubrimiento de las NPM con óxido de silicio utilizando 2 precursores: tetraetil ortosilicato (TEOS) y aminopropil trietoxisilano (APTES), tanto en forma separada como en mezcla. El precursor TEOS ofreció mejores resultados generando una capa homogénea esférica de aproximadamente 18 nm.

ABSTRACT

Recently the nanoparticles have had a wide range of applications in the sciences like biotechnology and medicine. Coated nanoparticles using silica are protected from decomposition; this silicon oxide layer can be functionalized then with different compounds and biomolecules that confer to the nanoparticle a variety of abilities. In this work, magnetic nanoparticles (MNP), of magnetite (Fe_3O_4) composition, were synthesized by the co-precipitation method, varying parameters as temperature, pH, precipitation agent and sonication time, in order to reduce polydispersity. Characterization of MNP was carried on using TEM, XRD, FT-IR, DLS, ζ potential and magnetometry. Polydispersed and superparamagnetic nanoparticles were obtained. In solution, they presented a superficial charge of $+45.2 \pm 4.0$ mV and, for two of the three proved methods of synthesis, a variable dynamic diameter with two main size particle groups were observed. Sonication time resulted in a crucial factor to drop polydispersity. In that way, a third synthesis variation produced MNP with a hydrodynamic diameter closed to 200 nm and particle diameter, obtained by TEM, of 10 nm in average. MNP were coated with silica using two different precursors: tetraethyl orthosilicate (TEOS) and aminopropyl trietoxisilane (APTES), separately and as a mixture. TEOS resulted as the best precursor forming a homogeneous and spherical layer of approximately 18 nm of thickness.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquematación ligandos en nanopartículas multifuncionales.	7
Figura 2. Microscopía de un imán de neodimio.	9
Figura 3. Morfología de nanopartículas magnéticas.	10
Figura 4. Curva de magnetización de materiales magnéticos y superparamagnéticos	11
Figura 5. Formación de red tridimensional de sílice a partir de TEOS.	16
Figura 6. Formación de red tridimensional de sílice a partir de APTES.	16
Figura 7. Difractograma de muestras de magnetita.	24
Figura 8. Radio hidrodinámico de muestras de magnetita.	25
Figura 9. Magnetograma de 3 muestras de magnetita.	26
Figura 10. Micrografía de NPM obtenidas mediante el método 3.	28
Figura 11. Radio hidrodinámico NPM recubiertas con sílice.	29
Figura 12. Magnetograma de NPM cubiertas con sílice.	30
Figura 13. Micrografía de NPM método 3 cubiertas con sílice usando TEOS.	32
Figura 14. Micrografía de NPM método 3 cubiertas con sílice usando APTES.	33
Figura 15. Micrografía de NPM método 3 cubiertas con sílice usando TEOS/APTES.	34
Figura 16. Espectro infrarrojo de NPM recubiertas con sílice.	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Potencial ζ de nanopartículas de magnetita.	27
Tabla 2 Potencial ζ de nanopartículas de magnetita recubiertas con sílice.	31

1 INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas magnéticas (NPM) tienen diversas aplicaciones en biotecnología, el medio ambiente, física de materiales y ciencias biomédicas (1). En lo que a esta última se refiere, las NPM tienen un uso potencial como biomarcadores de células(2), hipertermia magnética(3), entrega específica de fármacos(4), imagenología por resonancia magnética nuclear(5), separación magnética (6) y extracción y aislamiento de ADN (7,8). Las nanopartículas magnéticas como la magnetita (Fe_3O_4), la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), ferromagnetos de tipo espinelas y aleaciones metálicas, han sido consideradas para el desarrollo de las aplicaciones antes mencionadas(9), debido a su tamaño y propiedades magnéticas. Una de las principales características de las NPM es su tamaño en la escala de las unidades a decenas de nanómetros, permitiéndoles interactuar con biomoléculas en su escala natural, además de presentar propiedades superparamagnéticas. Las nanopartículas superparamagnéticas (NPS) se alinean en dirección de los campos magnéticos y en su ausencia no se atraen entre sí, es decir, la remanencia de su magnetización es mínima, lo cual las hace potenciales candidatos para la hipertermia magnética (3) e imagenología por resonancia magnética nuclear. Los avances en la síntesis de nanopartículas magnéticas permiten el control del tamaño, forma y especificidad. Estas partículas son biocompatibles y tienen una buena eficiencia de calentamiento (9). Aunque tienen una alta biocompatibilidad, la toxicidad debe ser considerada antes de su uso en sistemas biológicos, por ejemplo, estudios *in vitro* en diferentes tipos celulares han demostrado que las NPS (y otras nanopartículas de plata, y oro a altas concentraciones) pueden causar citotoxicidad, toxicidad, y genotoxicidad llevando a la célula al proceso de apoptosis (9). Debido a esto, se han buscado diferentes estrategias para disminuir y/o anular esta citotoxicidad (10). Una de dichas estrategias es el recubrir a las nanopartículas con moléculas y/o compuestos que funcionen como barrera aislante tal como lo propone Massart (11). Este proceso permite la funcionalización de (Fe_3O_4) con un amplio rango de especies monoméricas

como aminoácidos, alfa hidroxiaácidos (como el cítrico y el tartárico), hidroxamato, DMSA o incluso fosforilcolina (12).

Por ejemplo, NPM recubiertas con un polímero de pirrol y ácido carboxílico se utilizan para la entrega específica de fármacos, ya que poseen la capacidad de liberación activada por control remoto mediante el uso de campos magnéticos alternos (4). Otra aplicación importante es la funcionalización de nanopartículas magnéticas con anticuerpos que pueden actuar tanto como ligandos, para dirigir con alta especificidad a las NPM, o como biomoléculas efectoras. Por ejemplo el anticuerpo monoclonal herceptina unido a NPM sirve para bloquear el receptor HER-2 en cáncer de mamá, disminuyendo la proliferación de las células cancerígenas, además como está unido a NPM, se evalúa su uso como diagnóstico mediante imagenología (4).

Sin embargo, dada la naturaleza de las moléculas, el recubrimiento no se da al 100% debido a la interacción de las moléculas. Esto favorece la presencia de regiones de la partícula sin funcionalizar y por tanto puede interactuar con los sistemas biológicos generando la citotoxicidad. Otra alternativa de recubrimiento, y que es la que se adopta en el presente trabajo, es la formación de una coraza de sílice sobre la nanopartícula magnética. Esta metodología ha sido probada en nanopartículas de oro y plata mostrando que es biocompatible y no citotóxica (13). El uso de silanos permite realizar variaciones a la superficie (14), es decir, los grupos hidroxilo formados pueden ser modificados químicamente para permitir la incorporación de grupos funcionales los cuales son compatibles para la unión de biomoléculas.

En la actualidad existe una tendencia a desarrollar nanopartículas multifuncionales (unidades capaces de llevar a cabo diferentes objetivos), gracias al avance en nanotecnología y a las necesidades de la biomedicina. Mediante la química y la modificación de superficies ya establecidas (15), se pueden conjugar a las NPM pequeñas moléculas (dyes, agentes terapéuticos, ligandos específicos, metales, etc. (16,17), que les confieren más de una funcionalidad. Importante es, como ya se ha mencionado, partir de una estrategia de recubrimiento ya sea con sílice/sílice mesoporoso, micelas, liposomas o ensamblajes de biopolímeros; que permiten luego la

absorción química o física de moléculas pequeñas y la encapsulación de múltiples cristales de NPM (16), figura 1. Las NPS de óxido de hierro han sido probadas en resonancia magnética nuclear (MRI), mejorando la sensibilidad de detección de tumores. Aquí juegan un rol importante las nanopartículas con múltiples núcleos de magnetita. (16) Una de las aplicaciones de mayor revuelo es la imagen multimodal que integra imagen óptica (e.g. dyes, Qds y nanopartículas de Au) o imagen por Tomografía por Emisión de Positrones (PET) o la Tomografía Computarizada de Emisión de Fotón Simple (SPECT) (e.g. isótopos) con MRI.(17) En el caso del acoplamiento a radionúclidos, se han sintetizado compositos de NPM con ^{124}I y ^{64}Cu para pruebas MRI/PET (17). Existen a la fecha también algunos ejemplos que unen la MRI con SPECT. (18,19) La generación de NPM multifuncionales unidas a materiales radioactivos como $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{18}F ofrece posibilidades como la teledirección y por lo tanto la disminución en la dosis administrada al paciente (17,20).

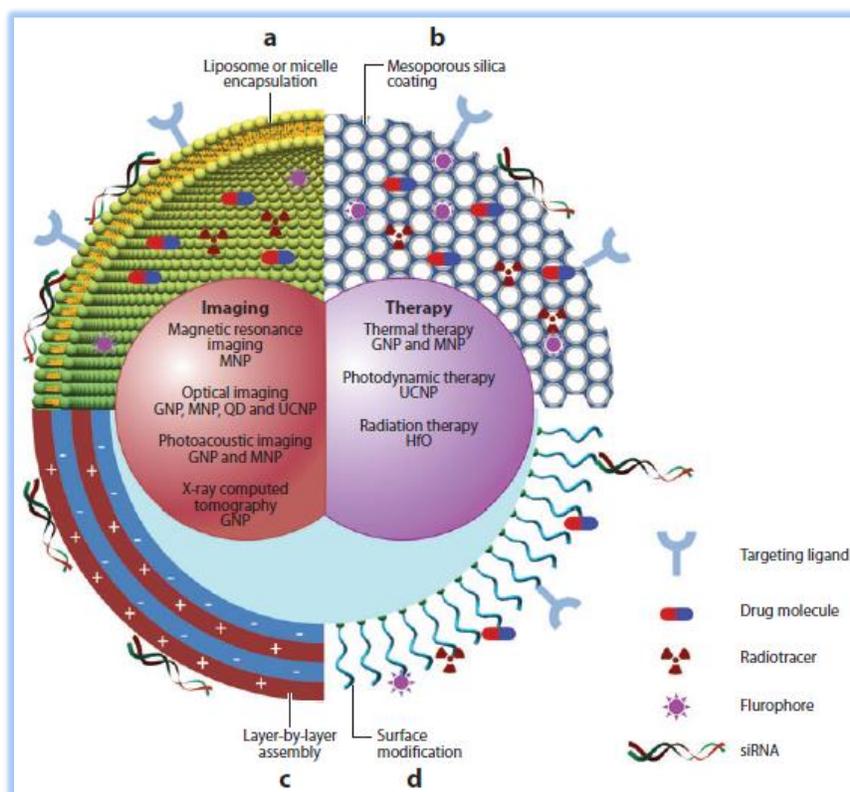


Figura 1. Esquemización de los cuatro recubrimientos típicos desarrollados para nanocristales inorgánicos. a) encapsulación con liposomas o micelas, b) recubrimiento con sílice mesoporosa, c) ensamblaje capa tras capa, d) modificación de superficie. Tomado de Bao et al., 2013 (17).

Justificación

A pesar de que existen reportados procedimientos de síntesis de NPM utilizando el método de co-precipitación, por su sencillez, bajo costo y accesibilidad, es necesario continuar la implementación y mejora de las condiciones de síntesis mediante este método.

La síntesis de nanopartículas magnéticas con recubrimiento de sílice es necesaria como punto de partida para la adición de diferentes grupos funcionales. Dicha funcionalización permitirá su posterior acoplamiento a biomoléculas con fines terapéuticos y/o su unión a metales de transición como renio y tecnecio que le puedan dar una multifuncionalidad para su uso en medicina nuclear.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo fue sintetizar y caracterizar nanopartículas magnéticas de tipo magnetita (Fe_3O_4), mediante modificaciones al método de co-precipitación, variando temperatura, pH, agente precipitante y tiempo de sonicación, con el propósito de controlar la polidispersidad y el diámetro de las partículas. Además, de recubrirlas según el mecanismo de Stöber (21) utilizando TEOS, APTES y una mezcla TEOS/APTES, en solución acuosa. Las nanopartículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ tipo núcleo-coraza obtenidas fueron caracterizadas mediante difracción de rayos x, magnetometría, DLS, FT-IR, TEM y se les determinó el potencial ζ .

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 NANO PARTÍCULAS MAGNÉTICAS (NPM)

Los materiales ferromagnéticos poseen diversas características a escala microscópica que definen su comportamiento magnético interno o ante campos externos, una de ellas son los dominios magnéticos que son divisiones dentro de la estructura de las partículas en las cuales existe una alineación de los momentos magnéticos adyacentes en una misma dirección, un material de este tipo posee muchos dominios magnéticos en su estructura microscópica (figura 2). La existencia de los dominios magnéticos es necesaria para disminuir la energía interna de la partícula.

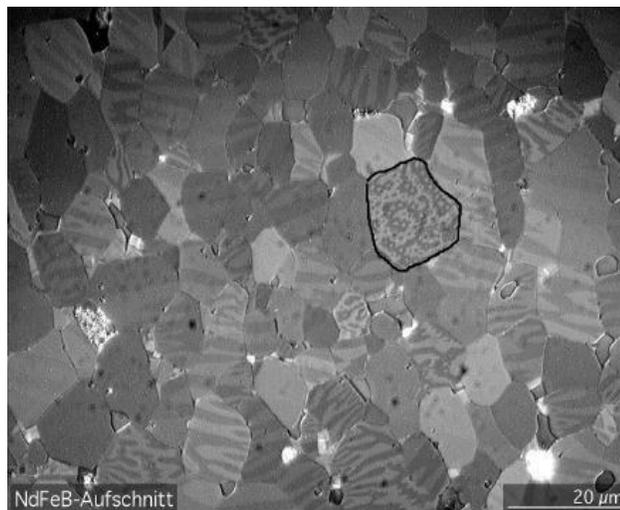


Figura 2. Dominios magnéticos en un imán de neodimio. Creative Commons, File:NdFeB-Domains.jpg. 2004 (22).

La magnetita (Fe_3O_4) y la maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), que es el estado oxidado de la anterior, son compuestos ferromagnéticos (23) que se encuentran de forma natural en la corteza terrestre. Estos poseen una propiedad relacionada a su tamaño. Cuando el tamaño de partícula se encuentra por debajo del tamaño mínimo del dominio magnético, que es de 100 nm aproximadamente, dependiendo del tipo de nanomaterial (24), dicha partícula solo tendrá un dominio lo que resultará en un momento magnético neto con valor de cero. A esta propiedad se le denomina superparamagnetismo. A manera de ilustración

significa que las partículas se comportan como pequeños imanes que se alinean en la dirección de un campo magnético al estar en la presencia de éste y en su ausencia su comportamiento es como el de cualquier otra partícula sin propiedades magnéticas.

Una característica importante del superparamagnetismo relacionada con este tipo de nanopartículas es que se manifiesta en el intervalo de temperatura ambiente, en comparación con propiedades como el diamagnetismo perfecto que necesitan temperaturas inferiores al punto de congelación del agua para que se manifiesten.

La forma de las nanopartículas magnéticas depende directamente del tipo de síntesis mediante la cual sean obtenidas, generalmente son amorfas pero es posible obtener esféricas, cúbicas o incluso con forma de aguja (figura 3).

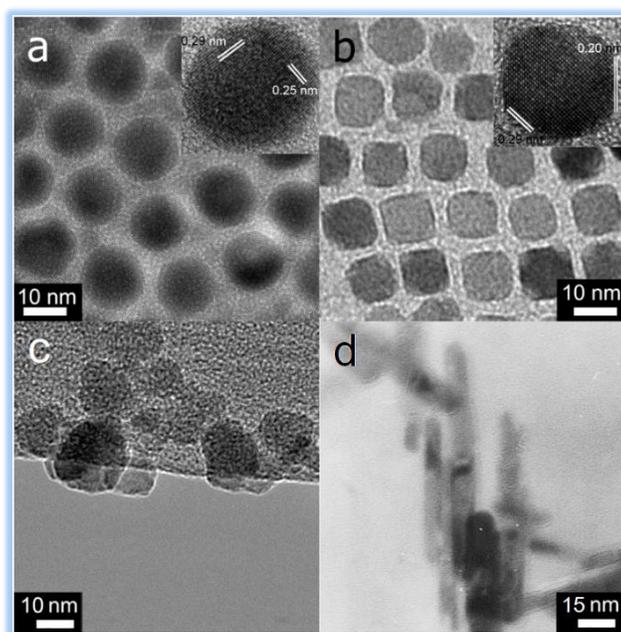


Figura 3. Morfología de las nanopartículas magnéticas; esférica (a) (25), cúbica (b) (26) ambas sintetizadas mediante el método de descomposición térmica, amorfa (c) y aguja (d) obtenidas con el método de co-precipitación. (47).

Una forma de determinar la presencia del súper paramagnetismo en las nanopartículas es la ausencia de una curva de histéresis y la forma de 's' característica al ser analizados mediante una magnetometría (24), como se observa en la figura 4.

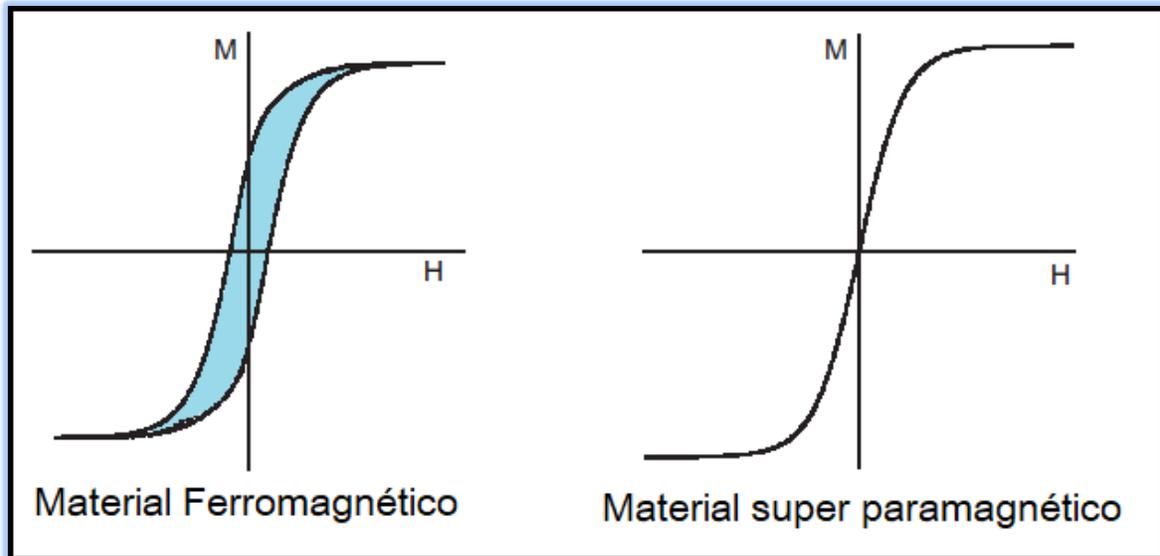


Figura 4. Magnetograma de dos materiales magnéticos diferentes. En este tipo de gráfico se compara el campo magnético aplicado, representado por el eje x, contra la magnetización de una muestra en el eje y. Los materiales superparamagnéticos no presentan curva de histéresis. (27).

El óxido de hierro (Fe_3O_4) posee una dosis letal 50 en ratas de 5g/kg, (es decir que una ingestión de dicha dosis mataría al 50% de una población de roedores) extrapolando los datos a la masa de un ser humano sería necesario ingerir una cantidad de 250 g de magnetita para que la mitad de una población tuviera consecuencias fatales (28) por lo tanto las NPM fabricadas con este compuesto resultan inocuas desde el punto de vista químico. Otro aspecto que es necesario considerar en el tema de riesgos a la salud es su estabilidad en soluciones acuosas o estabilidad coloidal, es decir que las partículas se mantengan en la solución sin aglomerarse ni formar un precipitado, tal fenómeno depende de diversos factores, uno muy relevante es el de la carga superficial de las partículas en solución llamado potencial ζ , cuya magnitud en caso de ser menor a 25 mV indica que existe una alta probabilidad de formación de aglomerados (29) de partículas coloidales que fácilmente precipitan. La magnetita y la maghemita en solución acuosa y pH neutro poseen un potencial ζ inferior a los 10 mV (30,31) indicando que de manera natural estas sufren un proceso de aglomeración en solución acuosa neutra.

2.2 SÍNTESIS DE NPM

Uno de los parámetros que es muy importante controlar durante la síntesis de nanopartículas magnéticas es la polidispersidad. Esta se mide al estimar la anchura de la distribución en el tamaño de las NPM, entre mayor sea la anchura se obtendrán partículas de tamaños muy diferentes entre sí y a menor ancho de la distribución existirá una gran cantidad de partículas con una diferencia mínima en su tamaño.

De acuerdo a Hao et al. (15), la estrategia general para preparar NPM monodispersas es mediante la formación de núcleos separados que crecen como nanocristales a una misma velocidad. Estos cristales deberán posteriormente ser recubiertos con agentes surfactantes para evitar su aglomeración. De esa manera se han desarrollado numerosos métodos de síntesis, entre los que se encuentran la co-precipitación, la microemulsión, la reacción sonoquímica, la reacción hidrotérmica, la descomposición térmica, el electrospray y la pirólisis con láser.

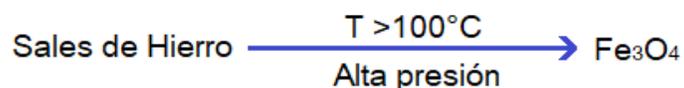
Para el caso de la síntesis de NPM de óxidos de hierro, el método que actualmente genera NPM de tamaño y forma específicos con mucha precisión, es la descomposición térmica de compuestos orgánicos. De manera general esta consiste en sintetizar precursores organometálicos que deben ser llevados a temperaturas elevadas (mayores a 200°C) durante un periodo determinado de tiempo. La reacción se lleva a cabo en solventes orgánicos y se utilizan agentes surfactantes orgánicos en el medio de reacción.



Existe una gran variedad de compuestos organometálicos que se pueden usar como precursores tales como la n-hidroxilamina, acetilacetatos, compuestos multicarbonílicos entre otros. Los solventes más utilizados son diferentes tipos de éteres, etilendiamina e incluso tolueno (32). Finalmente, como agentes surfactantes se pueden utilizar ácidos grasos, aminas, polivinilos y pirrolidonas (25). La temperatura y el tiempo de calentamiento son cruciales en esta metodología ya que con modificando las

estas variables se pueden obtener nanopartículas monodispersas de formas esféricas, cúbicas, hexagonales e incluso prismáticas.

El método hidrotérmico implica también condiciones de elevada temperatura (superior a los 100°C), además de presión superior a la atmosférica (23), para ello es necesario el uso de una autoclave. Los compuestos precursores son generalmente sales inorgánicas de hierro y se utiliza agua como disolvente.



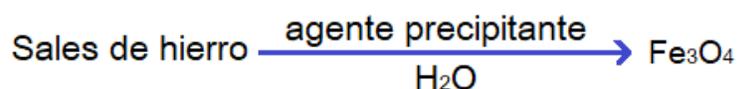
Mediante este proceso se logra un mejor control de la nucleación y crecimiento de las nanopartículas debido al control de las variables de temperatura y presión, además este método es más amigable con el medio ambiente, ya que no produce desechos tóxicos orgánicos (33).

La síntesis de sol-gel utiliza también sales inorgánicas de hierro, además es común el uso de solventes orgánicos, agua e incluso agentes surfactantes, con la particularidad de que en algunos casos puede ser necesario el uso de una cámara de vacío para su desarrollo. El proceso consiste en la formación de una red tridimensional compuesta por los precursores de hierro y los solventes llamada gel (34), la solidificación de este requiere condiciones de temperatura controlada.



El siguiente paso es el secado del gel, que se lleva a cabo a una temperatura más elevada (35) (mayor a las 200°C) y depende en gran medida del solvente utilizado.

Aunque existen diversos métodos de síntesis de NPM uno de los más utilizados es el de co-precipitación que consiste en mezclar sales de hierro en solución acuosa para posteriormente precipitar con alguna base fuerte concentrada (21). La reacción general es la siguiente:



Un factor importante a considerar durante la síntesis es la presencia de oxígeno en el medio de reacción ya que este provoca la oxidación de las nanopartículas de magnetita convirtiéndolas en maghemita, por lo que en caso de no controlar la oxidación se puede llegar a tener una mezcla de ambos tipos de nanopartículas. Para evitar este problema es recomendable trabajar en atmósfera inerte para la magnetita o trabajar en medio oxidante para obtener solo maghemita.

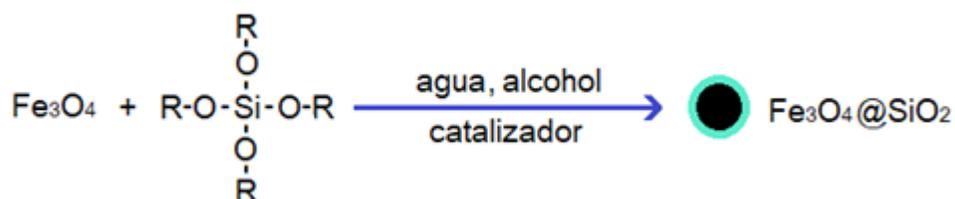
Este método ofrece la ventaja de que puede llevarse a cabo a presión y temperatura estándar, el único inconveniente es que es muy difícil controlar el tamaño de partícula, así como la polidispersidad por lo que se obtienen NPM amorfas, con una distribución de tamaño que va de los 5 nm a los 30 nm (36,37). La dificultad de obtener un tamaño uniforme de partícula, recae en el hecho de que no es posible separar la formación de núcleos de crecimiento del crecimiento propiamente dicho del cristal, dado que ambos procesos suceden simultáneamente dentro de la solución y dependen solo de la cinética de la reacción. Sin embargo, por ser uno de los métodos más sencillos y accesibles, en este trabajo se optó como método de síntesis de NPM, como primera aproximación.

2.3 RECUBRIMIENTO CON SÍLICE

Para poder utilizar las nanopartículas magnéticas dentro de organismos vivos es crucial evitar su oxidación, degradación y aglomeración ya que de esta manera pueden perder su función (38), así como sus propiedades superparamagnéticas y aún más importante pueden representar un peligro fatal de obstrucción de vasos sanguíneos tanto en animales de uso en investigación como en seres humanos. Debido a lo anterior

es importante recubrirlas con materiales que les confieran inocuidad y estabilidad. El óxido de silicio es uno de los compuestos más utilizados para recubrir diferentes tipos de nanopartículas, ya que no se descompone en solución acuosa en el intervalo de pH de los fluidos fisiológicos (31) (entre pH 6 y 8). Por otro lado, tiene una gran estabilidad coloidal en agua debido a que en solución se acumulan cargas negativas en su superficie que le dan una excelente solubilidad y provocan repulsión entre ellas.

Una de las principales estrategias para recubrir las partículas es la reacción de polimerización de alcoxisilanos (39), ésta se realiza en un medio alcohólico, comúnmente metanol o etanol, con esta se logra crear una red tridimensional alrededor de las nanopartículas magnéticas.



La reacción de formación inicia con el ataque de los componentes electrodonadores hacia el silicio de los alcoxisilanos, lo que forma grupos hidroxilos propensos a polimerización con otros silanos hidroxilados generando una reacción en cadena que termina en la formación de una red de sílice. Esta reacción depende de otras variables como la temperatura, la cantidad de agua en el medio de reacción, el tipo de alcohol utilizado como solvente, así como, el tipo y concentración de alcoxisilano, este último parámetro actúa directamente sobre el grosor del recubrimiento en las nanopartículas. El mecanismo de reacción fue descrito de acuerdo al proceso de Stöber (21) y se muestra en las figuras 5 y 6 para TEOS y APTES, respectivamente.

Los catalizadores más utilizados son ácidos (e.g. HCl) y bases fuertes (e.g. NaOH). El uso de catalizadores ácidos o básicos es un factor importante a considerar, ya que los primeros permiten una polimerización de silanos con cadenas largas que forman un gran entramado, mientras que los catalizadores básicos crean una red altamente ramificada de cadenas cortas de polímero, es decir, una red muy fina (39).

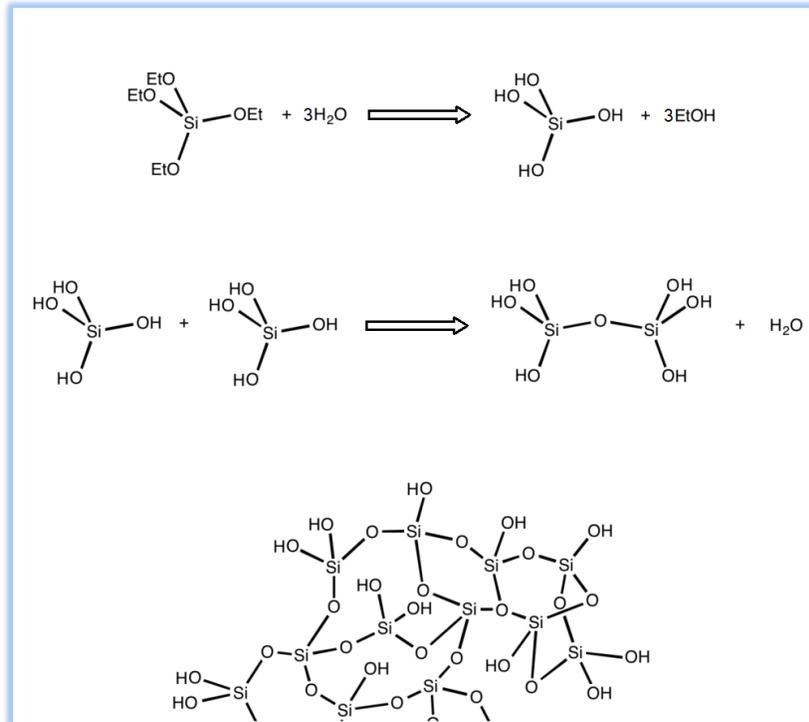


Figura 5. Formación de red tridimensional de sílice a partir de TEOS (21).

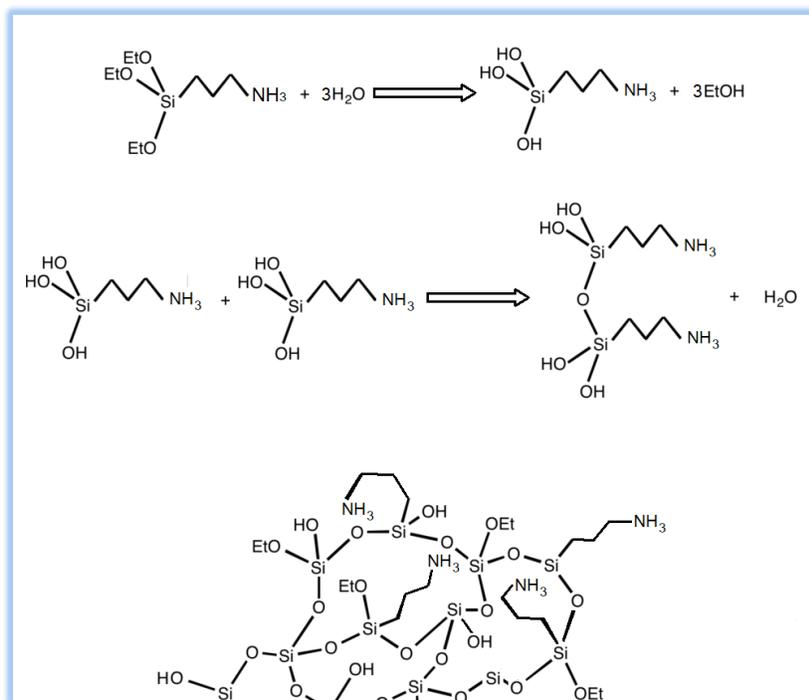


Figura 6. Formación de red tridimensional de sílice a partir de APTES (propuesta basada en Stöber, Cuoq et al) (21) (40).

2.4 CARACTERIZACIÓN DE NPM

Debido a su tamaño, la caracterización de las nanopartículas magnéticas tanto desnudas como recubiertas, se vale de diferentes técnicas analíticas que ayudan para definir todos los parámetros necesarios para su uso en la investigación, así como en diversas aplicaciones. Los más relevantes son la carga eléctrica en solución, forma, tamaño, magnetización y composición química.

Para evaluar la estructura cristalina de las nanopartículas uno de los métodos más versátiles es la difracción de rayos X. En este proceso se incide un haz de rayos X sobre la muestra, lo que generará una dispersión del haz debido a interferencias constructivas y destructivas dependiendo del arreglo interno de los átomos de la muestra analizada. Los difractogramas generados se comparan con otros de referencia para obtener información acerca de la fase cristalina de las muestras y así discernir por ejemplo entre los diferentes tipos de óxidos de hierro que pudieran existir en la muestra (41).

El equipo que se utiliza para definir la forma y el tamaño en estado sólido es el microscopio electrónico de transmisión (TEM), a grandes rasgos consiste en un haz de electrones que es dirigido hacia la muestra, estos atraviesan la muestra dispersándose y disminuyendo en su energía cinética, finalmente llegan a un detector donde son recolectados mostrando una imagen de la muestra aumentada con una resolución de hasta 0.2 nm (42). Para realizar el análisis, la muestra se prepara depositando una alícuota diluida de la muestra de alrededor de 50 μL sobre una rejilla-portamuestras. La cual se lleva a sequedad completa mediante una cámara de vacío antes de introducirla al microscopio. La resolución del equipo permite perfectamente determinar la forma y tamaño de las nanopartículas, debido a la resolución del microscopio; es posible incluso discernir la organización de los átomos dentro de las nanopartículas.

El comportamiento de las nanopartículas en solución es un factor muy relevante ya que repercute directamente en la solubilidad de estas. Uno de los parámetros que ayudan a definir dicho comportamiento es el radio hidrodinámico que es el tamaño de las partículas en solución acuosa (43), este resulta ser mayor que el observado mediante

microscopía electrónica de transmisión, esto se atribuye a que el equipo con el que se determina el radio hidrodinámico (dispersión dinámica de luz o DLS) no logra discernir entre partículas si existe interacción entre una o varias de ellas, lo que se interpreta como un tamaño mucho mayor al verdadero. Es importante también conocer el valor de la carga de dicha capa de iones ya que si esta posee un valor inferior a 25 mV comenzará un proceso de aglomeración (29) entre las partículas que concluirá en precipitación; en el caso de que el valor sea superior, existirá repulsión electrostática entre ellas lo que les dará estabilidad. El valor de promedio de la carga superficial de las nanopartículas es conocido como potencial ζ . Para determinar tanto el radio hidrodinámico como el potencial ζ se utilizan equipos con un arreglo muy parecido, que consisten a grandes rasgos en un láser que incide sobre la muestra en solución dentro de un vial transparente, un detector (calibrado para la longitud de onda de la fuentes) determina el cambio en los patrones de la luz dispersada por la muestra. La diferencia principal radica en que el medidor de potencial ζ incluye un generador de voltaje acoplado al porta muestra.

Una técnica crucial para obtener información acerca de los grupos funcionales y tipos de enlaces tanto orgánicos como inorgánicos es la espectrometría infrarroja con transformada de Fourier. Su fundamento reside en la división de un haz de radiación infrarroja mediante un interferómetro de Michelson que genera un patrón de interferencia, este dispositivo va cambiando las diferentes combinaciones de longitudes de onda mediante la generación de ondas constructivas y destructivas que se realiza variando la distancia entre los espejos internos (44). La radiación que incide en los átomos provoca estiramientos, vibraciones y flexiones en sus enlaces. Después un detector establece cuales longitudes son absorbidas formando una patrón de interferencia que mediante la aplicación de un proceso matemático llamado transformada de Fourier genera un espectro en un intervalo que va de 4000-660 cm^{-1} . El espectro de absorción se relaciona directamente con el tipo de enlace, por ejemplo las bandas características en espectros de IR de NPM recubiertas con sílice pertenecientes a enlaces con hierro se posicionan en los 567 cm^{-1} y 578 cm^{-1} , relacionadas con la flexión

de enlaces Fe-O y el estiramiento de enlaces Fe-O-Si, respectivamente. Por otra parte, son también distinguibles las señales debidas al estiramiento asimétrico ($\nu = \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$) y simétrico ($\nu = \sim 800 \text{ cm}^{-1}$) de Si-O-Si. La señal para el estiramiento simétrico del Si-O aparece aproximadamente en 900 cm^{-1} (45).

El magnetismo es un fenómeno natural que hasta hace apenas un par de siglos no se conocía prácticamente nada acerca de sus fundamentos. En la actualidad el comportamiento magnético de un material se puede clasificar de forma sencilla como ferromagnético, paramagnético y diamagnético (46). El primero se refiere a materiales que tienen una intensa magnetización y se alinean fuertemente en dirección de los campos magnéticos (manifiestan atracción), los ejemplos más claros son el hierro, cobalto y níquel. Los materiales paramagnéticos poseen una débil magnetización en dirección al campo aplicado (son atraídos). Mientras los compuestos diamagnéticos se magnetizan débilmente en sentido contrario al campo aplicado por lo que el efecto neto es una repulsión. Estos dos fenómenos magnéticos son tan débiles que no es posible identificarlos sin el uso de instrumentos específicos de medición. El equipo utilizado para la caracterización de los diferentes tipos de fenómenos magnéticos es el magnetómetro, el cual consiste en dos electroimanes de alto voltaje que flanquean y aplican campos magnéticos variables a la muestra para evaluar su magnetización (27), la muestra se encuentra enganchada de un péndulo que posee un detector de material piezoeléctrico (sensible al movimiento), por lo tanto entre mayor sea la magnetización de la muestra mayor será el efecto de atracción o repulsión (movimiento) sobre el péndulo lo cual será registrado por el detector formando así un magnetograma que relaciona el campo aplicado contra la magnetización (calculada en base al movimiento del péndulo). Este tipo de gráfico ofrece información acerca del tipo de magnetismo que posee la muestra, así como datos más específicos como lo es la magnetización de saturación entre otros, los cuales son relevantes para la caracterización de nanopartículas magnéticas.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES

3.1.1 REACTIVOS

Todas las sustancias utilizadas fueron de grado reactivo. Cloruro férrico (FeCl_3) (98%, CAS: 10027-77-1), Cloruro ferroso (FeCl_2) (98%, CAS: 15478-10-9), Hidróxido de sodio (NaOH) (97%, CAS: 1710-73-2), Tetraetil ortosilicato (TEOS) (98%, CAS: 78-10-4) y Aminopropil trietoxisilano (APTES) (99% CAS: 919-30-2) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Hidróxido de amonio (NH_3OH) (30%, CAS: 1336-21-6) fue obtenido de J.T. Baker, Ácido clorhídrico (HCl), (37.5%, CAS: 7647-01-0) se obtuvo de Fermont, Nitrógeno (N_2) (alta pureza, CAS: 7727-37-9) fue obtenido de INFRA.

3.1.2 EQUIPO

Durante la síntesis de las NPM se utilizó un baño ultrasónico Branson 2800. Los lavados se realizaron mediante una centrífuga Hermle Z 216 MK.

La caracterización de las NPM con y sin recubrimiento se realizó utilizando diferentes métodos espectroscópicos, microscópicos, electro-cinéticos y magnéticos. Los difractogramas fueron obtenidos mediante un difractómetro de rayos x, XRD Bruker D8 Advance. Se utilizó un magnetómetro AGM MicroMag 2900/3900, para determinar las propiedades magnéticas. La dispersión dinámica de la luz (DLS) se midió con un equipo LS Instruments. La medición de potencial ζ se obtuvo mediante un analizador ZetaPlus de Brookhaven Instruments Corporation. La absorción óptica en el infrarrojo se obtuvo mediante un espectrómetro Vertex 70 de Bruker. Las micrografías de transmisión electrónica fueron obtenidas con un equipo JEOL JEM-2100, usando un voltaje de aceleración de 200kV.

3.2 METODOLOGÍA

La síntesis de las NPM se realizó mediante modificaciones al método por co-precipitación reportado por Tokarev et al. (46), el cual consiste en mezclar sales de cloruro férrico (FeCl_3) y cloruro ferroso (FeCl_2) en una proporción molar de 2:1 en solución acuosa, para posteriormente precipitar con alguna base fuerte concentrada.

3.2.1 SÍNTESIS DE NPM

Magnetita 1. Se preparó una solución con 850 μL de HCl concentrado (37%) y 25 mL de agua desionizada previamente burbujeada con nitrógeno durante 15 minutos. Después se agregaron a la solución anterior 5.2 g de FeCl_3 y 2.0 g de FeCl_2 usando agitación vigorosa. Se vertió esta solución en 250 mL de NaOH 1.5 M utilizando agitación. Las nanopartículas se generaron inmediatamente formando un precipitado color negro. La solución se dejó reposar por 24 horas para retirar el sobrenadante, para su posterior lavado.

Magnetita 2. Se calentaron 12 mL de agua desionizada en un matraz bola y se llevaron al punto de ebullición, enseguida se agregaron 1.8 g de FeCl_3 y 0.3936 g de FeCl_2 , dicho matraz se transfirió a un baño ultrasónico, transcurridos 5 minutos se retiró del baño y se agregaron 0.5 mL de NH_4OH . Finalmente se introdujo la solución en el baño ultrasónico por 10 minutos. Se formó un precipitado negro-rojizo inmediatamente. La solución se dejó reposar por 24 horas para retirar el sobrenadante, para su posterior lavado.

Magnetita3. 12 mL de agua desionizada en un matraz bola se llevaron a ebullición, enseguida se agregaron 1.08 g de FeCl_3 y 0.3936 g de FeCl_2 , dicho matraz se transfirió a un baño ultrasónico donde se mantuvo durante todo el proceso, después se agregaron 0.5 mL de NH_4OH . Se formó un precipitado negro-rojizo inmediatamente y se mantuvo en baño de sonicación durante 15 minutos más. Finalmente se dejó reposar por 24 horas después de esto se retiró el sobrenadante, para su posterior lavado.

3.2.2 LAVADO

La solución con nanopartículas fue separada a 15,000 rpm durante 1 hora. La eliminación del sobrenadante se realizó con una micropipeta de 1000 µL evitando succionar a las partículas magnéticas y reemplazando el volumen sustraído por agua desionizada. Este procedimiento se repitió 3 veces para obtener nanopartículas magnéticas libres de sales y a pH neutro.

3.2.3 RECUBRIMIENTO UTILIZANDO TEOS, APTES Y TEOS/APTES (1:1)

Los recubrimientos se realizaron con las nanopartículas obtenidas mediante el método de síntesis 3 (magnetita 3). Se tomaron 3 ml de una solución acuosa de NPM y se aforaron en un matraz de 10 mL con agua desionizada, esta solución se transfirió a un matraz bola y se introdujo en baño ultrasónico donde se mantuvo durante todo el procedimiento. Posteriormente se agregaron 80 mL de alcohol etílico al 70 %, así como 5 ml de hidróxido de amonio al 30%. Finalmente se agregaron 0.2 ml del correspondiente agente de recubrimiento (TEOS, APTES y TEOS/APTES 1:1) utilizando una bomba infusora a un flujo de 10 µl/min. La solución se mantuvo 2 horas en baño ultrasónico a una temperatura menor a 20 °C. Finalmente, la mezcla se llevó a pH neutro mediante lavados con agua desionizada, utilizando centrifugación.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó la síntesis de NPM mediante 3 métodos diferentes, cuyos productos fueron analizados mediante las técnicas de difracción de rayos X, medición de radio hidrodinámico, carga superficial de las partículas (potencial ζ), así como magnetometría. Análisis que ayudaron a determinar la metodología que produjera nanopartículas de magnetita de menor tamaño en solución, carga suficientemente grande para evitar la aglomeración por electroatracción y con propiedades superparamagnéticas respectivamente.

Los mejores resultados se obtuvieron con el método 3, que generó nanopartículas superparamagnéticas, de 10 nm de diámetro aproximadamente y con una carga superficial de $+48 \text{ mV} \pm 4.6 \text{ mV}$, los recubrimientos se caracterizaron por medio de la técnica de TEM en donde observamos que se formó sobre las NPM una capa esférica de aproximadamente 20 nm de espesor con TEOS, una muy difusa con APTES sin tamaño discernible y una superior a 30 nm burdamente esférica con una mezcla de TEOS y APTES. A continuación se detallan las caracterizaciones de todas las muestras sintetizadas y de las muestras con el recubrimiento.

4.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Como se observa en los difractogramas de la figura 7, los 3 métodos de síntesis claramente generan partículas de magnetita (Fe_3O_4), aunque, por el ruido que manifiestan todos, existe la posibilidad de que la muestra contenga óxido de hierro en fases amorfas y en otro tipo de estructuras cristalinas diferentes de la magnetita; probablemente debido a la presencia de otros óxidos de hierro que se generan durante la reacción. Cabe resaltar que el método 1 fue el que produjo partículas más puras de magnetita en comparación con los otros dos. Esto se atribuye a que en este método de síntesis se evitó la oxidación de las NPM utilizando HCL y burbujeo de nitrógeno al momento de disolver las sales de hierro, este resultado se manifestó a simple vista ya que las NPM mostraban un color negro-marrón intenso.

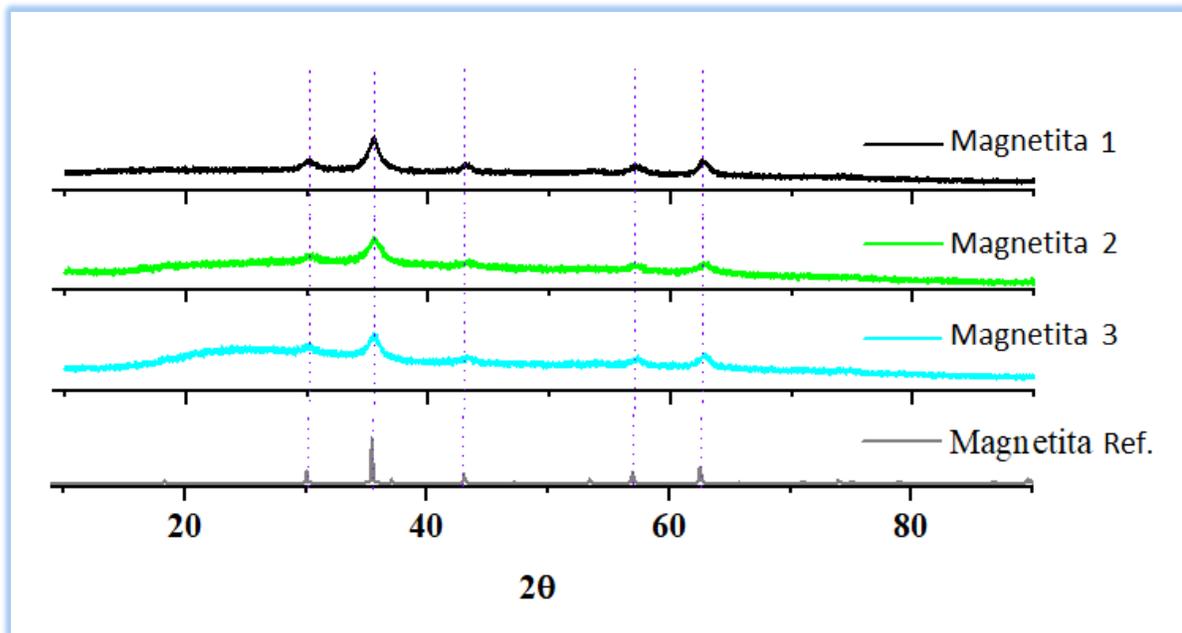


Figura 7. Difractograma de 3 muestras diferentes de nanopartículas, se demuestra a presencia de magnetita comparándola con la referencia.

4.2 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS).

Este tipo de análisis ayuda a obtener información acerca del radio hidrodinámico de las NPM, como lo demuestra el gráfico de la figura 8 existe una gran diferencia entre los tamaños promedios de las 3 muestras de magnetita. En el caso de la muestras de magnetita 1 y 2 existen dos poblaciones mayoritarias de tamaños diferentes: una muy superior a los 500 nm lo que puede indicar aglomeración y una pequeña que se sitúa entre los 50 y 100 nm, que se encuentra muy lejos del valor deseado de 5-20 nanómetros que se esperaba obtener.

Por otro lado, para la muestra de magnetita 3 (línea amarilla) la mayoría de las partículas poseen un diámetro inferior a los 200 nm que a pesar de ser un tamaño mayor a lo esperado, so menos polidispersas que las obtenidas con los otros métodos. Sin embargo, también existe una pequeña población de radio aproximado a los 20 nm que podrían ser NPM que aún no han formado aglomerados.

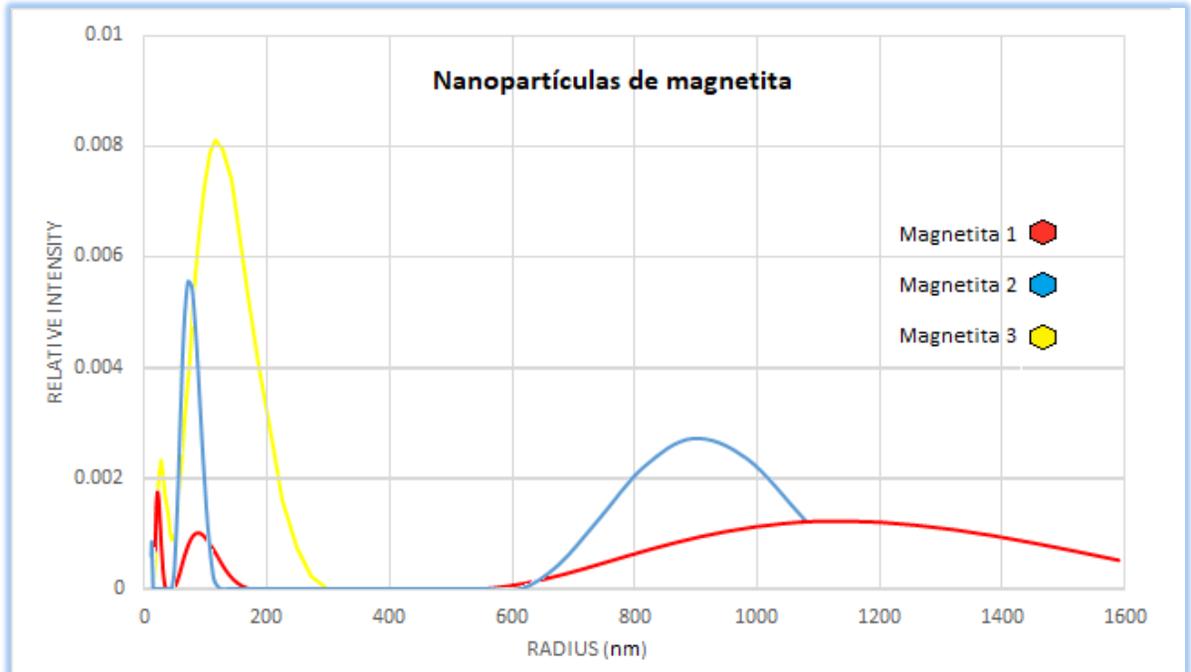


Figura 8. Gráfico obtenido mediante DLS que representa el tamaño de las partículas de 3 muestras diferentes en solución acuosa. Se manifiesta la presencia de varias poblaciones dentro de cada metodología, así como una anchura grande en las distribuciones por lo que no existe monodispersidad.

4.3 MAGNETOMETRÍA

Se evaluó el carácter magnético de las NPM obtenidas por los tres diferentes métodos de síntesis. En la figura 9, se pone de manifiesto la forma característica de la curva de magnetización de los materiales superparamagnéticos. A pesar de que la señal para cada muestra es diferente esto no significa que sus propiedades superparamagnéticas varíen demasiado, se debe a la cantidad de muestra durante la medición o a la intensidad de magnetización del material, lo cual no afecta en el resultado obtenido ya que es una prueba cualitativa.

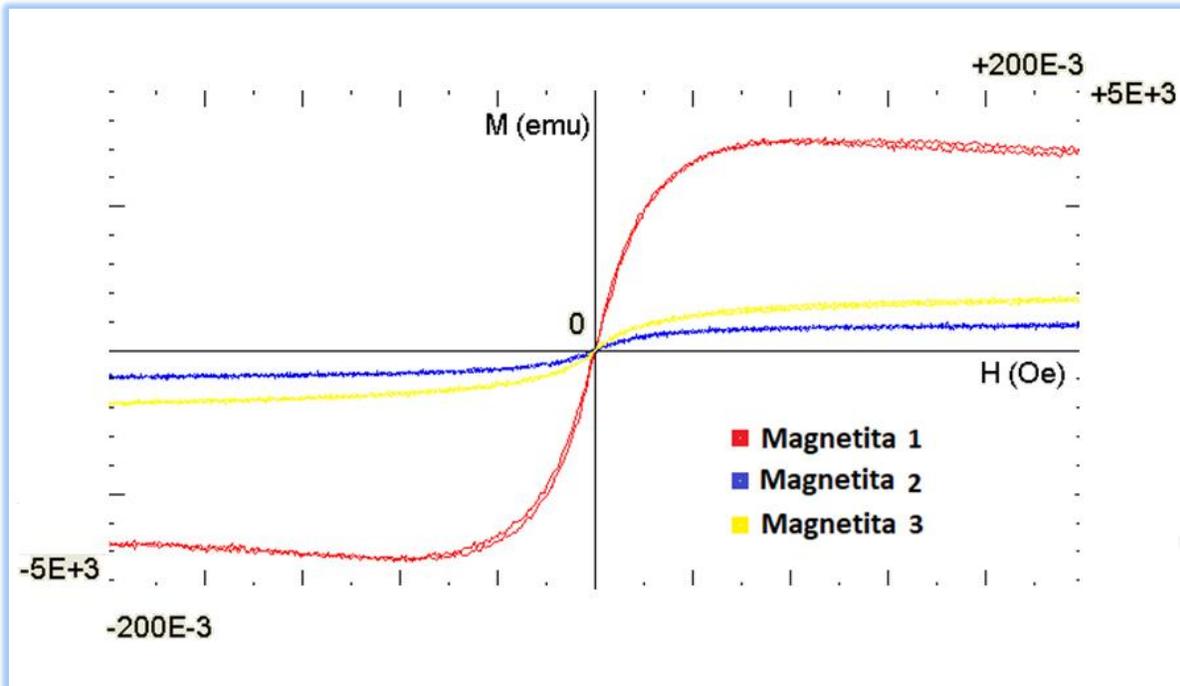


Figura 9. Magnetograma de 3 muestras diferentes de partículas magnéticas. La falta de histéresis en las curvas de magnetización muestra que las nanopartículas sintetizadas por los tres métodos son superparamagnéticas.

Cotejando la información del DLS con la de magnetometría se llega a la conclusión de que las partículas en solución se encuentran aglomeradas y es posible que su radio sea mucho menor al que establece el DLS, debido a que las partículas magnéticas solo presentan superparamagnetismo si su tamaño es inferior a 100 nm y como se puede ver en el magnetograma todas las muestras poseen dicha característica.

4.4 POTENCIAL ζ

Mediante esta técnica se obtuvo información acerca de la magnitud de la carga superficial de las nanopartículas como lo muestra la tabla 1. Se obtuvo un valor positivo para las magnetitas 2 y 3, contrarios a la magnetita 1 que obtuvo un valor negativo. La desviación estándar relativa (RSD) de las mediciones indica que el valor verdadero de la magnetita 1 se encuentra entre -26 mV y 0 mV, lo que puede ser resultado de la aglomeración de las partículas. Por lo tanto, existen en solución diversos tamaños de partículas con una amplia gama de valores de carga superficial. La literatura reporta que

un valor mayor a 25 mV es suficiente para evitar la aglomeración de partículas coloidales (48), el hecho que las muestras de magnetita 2 y 3 hayan mostrado formación de precipitado y un tamaño hidrodinámico superior a una micra, sugiere que el valor del potencial ζ corresponde al de los aglomerados y no de las nanopartículas individuales. Tomando en cuenta la información anterior se establece que el valor real del potencial ζ de las NPM es inferior al de mostrado en el análisis.

Con base en los resultados de los tres tipos de análisis anteriores se seleccionó la muestra de magnetita 3 para su análisis mediante espectrometría infrarroja, microscopía electrónica de transmisión y para evaluar el recubrimiento con sílice. Esto debido a que presentó características superparamagnéticas, menor tamaño de partícula que se correlaciona con una mayor repulsión entre las partículas, debido a su elevada carga superficial ($+ 48.6 \text{ mV} \pm 4.6 \text{ mV}$), valor que tuvo también un menor RSD que los valores de las NPM de los otros dos métodos lo que indica mayor exactitud en la medición y por lo tanto menor aglomeración.

Tabla 1. Potencial ζ de muestras de magnetita obtenida por tres diferentes métodos.

Magnetita	Potencial ζ (mV)	RSD %
1	-13.628	99.5
2	41.698	16.7
3	48.602	8.3

4.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para esclarecer el verdadero tamaño de las nanopartículas obtenidas por el método 3, se llevó a cabo una microscopía electrónica de transmisión (figura 10) eso concuerda con el DLS respecto a la idea de formación de aglomerados aunque la preparación de muestras para TEM implica la formación de estos por si sola. El diámetro de las NPM se encuentra alrededor de 10 nm confirmándose su escala nanométrica, mientras que el

de los aglomerados es de 30 a 70 nm. También se observa que la forma de las partículas es completamente amorfa.

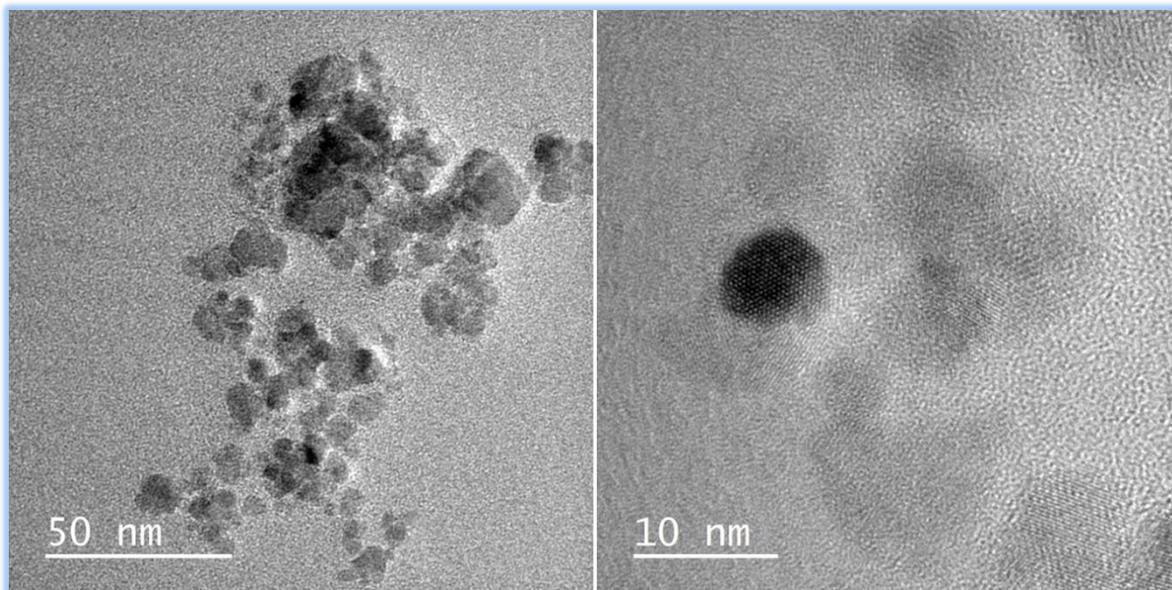


Figura 10. Micrografía de la muestra de magnetita 3.

4.6 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS) DE PARTÍCULAS CUBIERTAS CON SÍLICE UTILIZANDO TEOS

Debido a que se atribuyó una disminución en el tamaño de las NPM al tiempo que permanecieron en baño ultrasónico en cada una de las metodologías de síntesis, se optó por recubrir los tres tipos de partículas con TEOS. La figura 11 demuestra que la conjetura previamente realizada, que a mayor tiempo en baño ultrasónico menor el tamaño de partícula, es verdadera. El tamaño de las partículas recubiertas fue menor al de las mismas muestras sin recubrir, atribuible, probablemente, al tiempo que se mantuvieron (2 horas) en baño ultrasónico durante el proceso de recubrimiento. De esa manera, los aglomerados en solución logran separarse demostrando la reducción de diámetro para las partículas obtenidas mediante el recubrimiento de las muestras de magnetita 1, 2 y 3, hasta 400 nm. Cabe resaltar que la magnetita 3 posee el menor tamaño incluso ya con el recubrimiento de sílice.

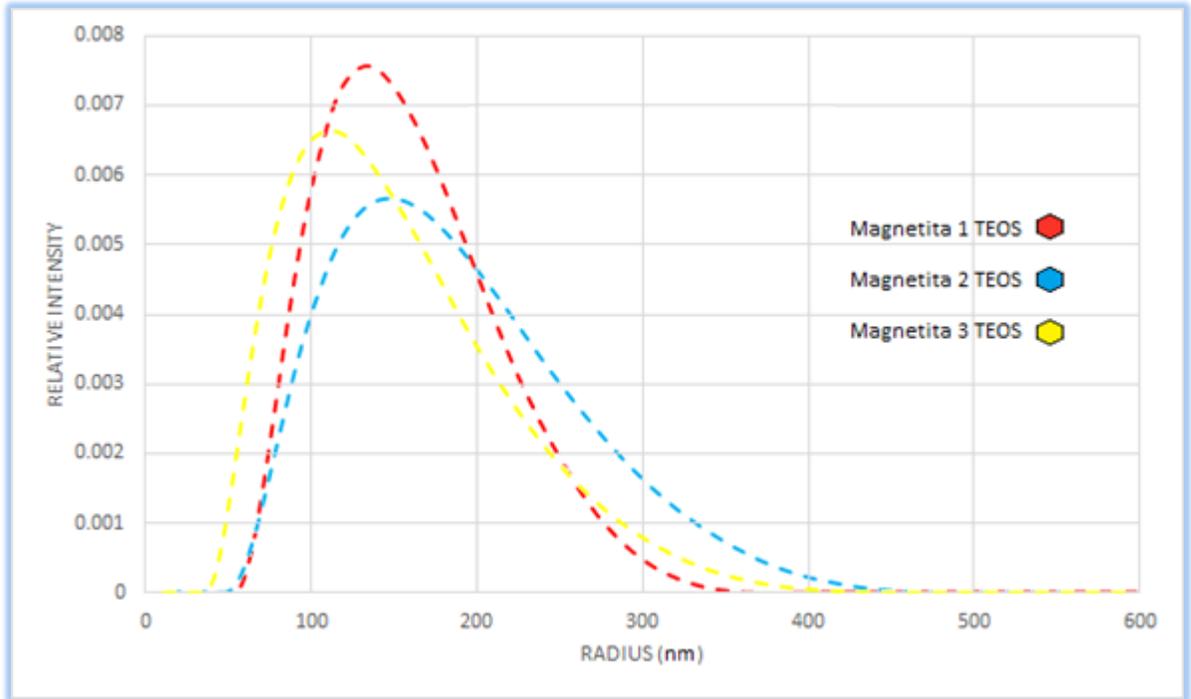


Figura 11. DLS de tres muestras diferentes de magnetita cubierta con óxido de silicio utilizando TEOS.

La razón a la cual se le atribuye que los aglomerados no disminuyan de ese tamaño, es probablemente porque la medición de DLS se realizó después de varias semanas de la aplicación del recubrimiento. Sin embargo, se observa una distribución menos polidispersa en los tres métodos de síntesis.

4.7 MAGNETOMETRÍA DE NPM CUBIERTAS CON SÍLICE UTILIZANDO TEOS

Para corroborar que las propiedades superparamagnéticas de las partículas se conservaban aun con el recubrimiento de sílice, se realizó una magnetometría. Los resultados se muestran en la figura 12, donde se observa el patrón típico del superparamagnetismo, ya que la forma de la curva de histéresis es casi inexistente. La única diferencia respecto a las NPM sin recubrimiento es que el ruido del magnetograma aumenta demasiado. Esto se atribuye a que la cantidad de magnetita en la muestra es muy poca respecto a su masa. El grosor del recubrimiento es mayor que el tamaño de las nanopartículas de magnetita. En el caso del magnetograma de la

magnetita 1 recubierta, el ruido es excesivo por lo que es difícil discernir el comportamiento magnético.

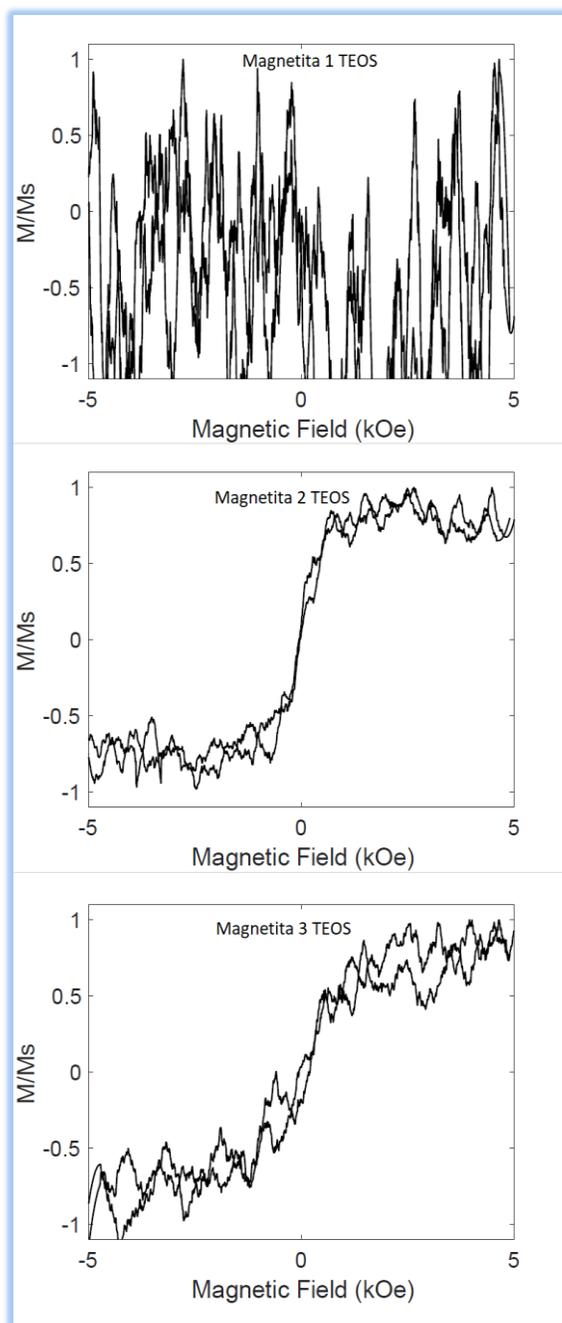


Figura 12. Magnetograma de 3 tipos de NPM cubiertas sílice utilizando con TEOS. Las muestras 2 y 3 presentan una curva que indica superparamagnetismo mientras que la número 1 posee demasiado ruido para discernir sus características magnéticas.

4.8 POTENCIAL ζ DE PARTÍCULAS CUBIERTAS CON SÍLICE UTILIZANDO TEOS

Para evaluar su estabilidad en agua, se evaluaron mediante potencial ζ muestras de magnetita 1, 2 y 3 recubiertas utilizando TEOS. Se obtuvieron los resultados contenidos en la tabla 2. Claramente las RSD disminuyeron a un nivel deseable en todas las muestras ya que es inferior al 10 %, lo que otorga mayor confianza a los valores obtenidos, además se denota un cambio en el potencial a valores negativos en todas las muestras, indicando la modificación de la superficie de las nanopartículas en los 3 casos. El cambio de signo se debe principalmente a la formación de grupos $-OH$ durante la polimerización del silano, de acuerdo al proceso Stöber (21), que considera también la formación de enlaces Si-O-Si. La magnitud del potencial en todos los métodos cubiertos con TEOS es mayor a 25 mV por lo que se consideran estables coloidalmente.

Tabla 2. Potencial ζ de NPM recubiertas con sílice a partir de TEOS.

Magnetita	Potencial ζ (mV)	RSD %
1	-44.25	6.4
2	42.17	5.2
3	44.48	4.1

4.9 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRASMISIÓN DE NPM CUBIERTAS CON SILANOS

Ya que las muestras de magnetita 3 tuvieron mejores resultados tanto en tamaño, conservación del superparamagnetismo, y estabilidad en solución acuosa, se tomó la decisión de evaluar el recubrimiento con otro silano: el APTES, con el fin de que la superficie del recubrimiento contara con los grupos amino del APTES expuestos para poder funcionalizar las nanopartículas.

La micrografía de la figura 13-A muestra que el tamaño de los aglomerados de las partículas cubiertas con sílice utilizando TEOS es menor de 200 nm ya que están

conformados por más de 3 NPM recubiertas. Este dato es congruente con los valores obtenidos en la medición con DLS. El grosor del recubrimiento es aproximadamente de 20 nm (figura 13-B) lo que representa prácticamente el doble del tamaño promedio de las nanopartículas de magnetita, además se observa que el recubrimiento posee una tendencia esférica.

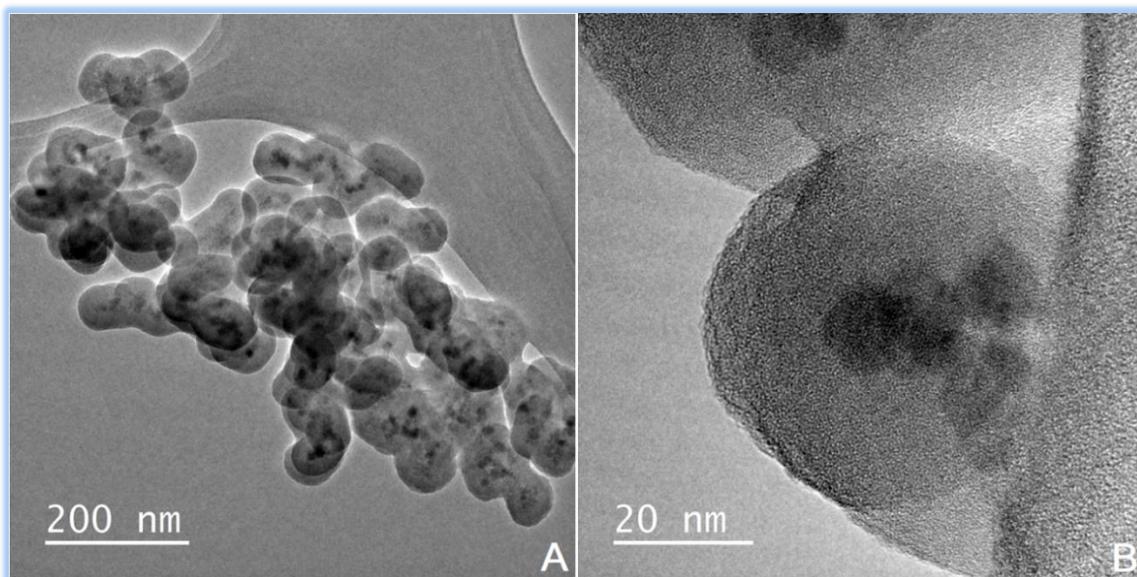


Figura 13. Micrografía de NPM del método 3 cubiertas con sílice utilizando TEOS. Se observa una sola NPM de color oscuro con el recubrimiento de sílice en un tono más claro formando una coraza esférica (10-B). Cúmulo de nanopartículas recubiertas.

Por otro lado, las partículas recubiertas usando APTES presentan una forma irregular en la cual es complicado discernir fácilmente entre la NPM y el recubrimiento (figura 14-A). Aunque se realiza un aumento significativo a la imagen solo se diferencia la nanopartícula debido a la orientación definida de sus átomos (figura 14-B).

En el caso del recubrimiento realizado a partir de la mezcla de ambos silanos se manifiesta una tendencia de combinación en las características morfológicas del recubrimiento (figura 15), ya que presenta cierta tendencia esférica con muchas deformaciones y un mayor número de nanopartículas involucradas dentro de cada envoltura individual. Asimismo, cabe resaltar que el tamaño tanto de los aglomerados

como del grosor de la capa de recubrimiento se ven exacerbados en comparación con los recubrimientos mediante TEOS y APTES por separado.

El comportamiento desordenado de los revestimientos en los que se utilizó APTES se puede deber a que el grupo amino de este se ve involucrado en la formación de la red de silanos, provocando cierta asimetría en el entramado.

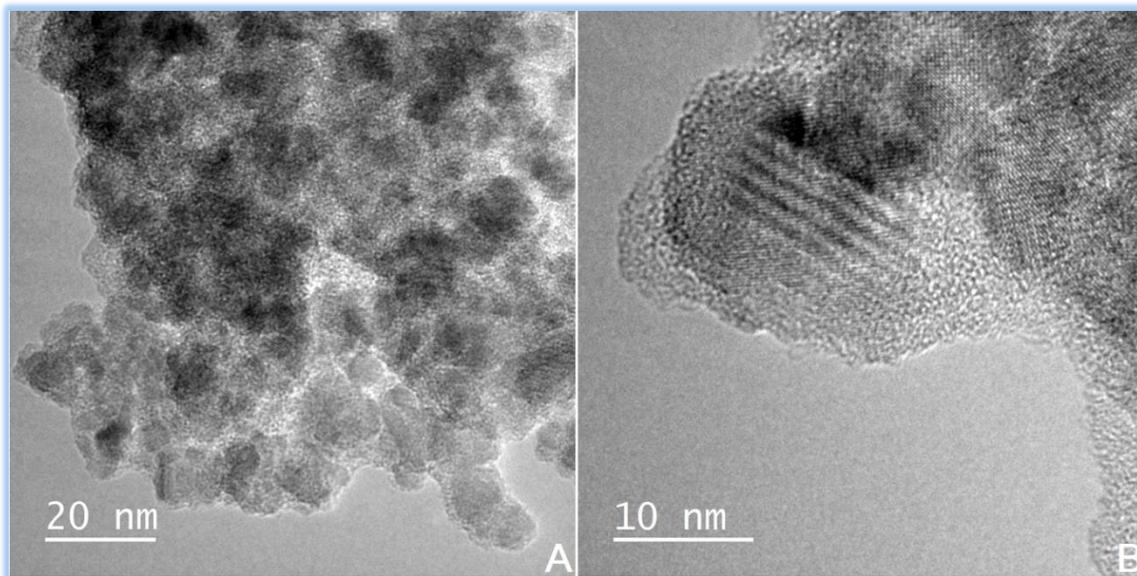


Figura 14. Micrografía de NPM de magnetita 3 cubiertas utilizando APTES. 14-A) Aglomerado de NPM recubiertas de manera amorfa, se difícil la identificación entre ellas. Es posible discernir entre la partícula de magnetita de su recubrimiento de silicio por la orientación de los átomos en el núcleo magnético (14-B).

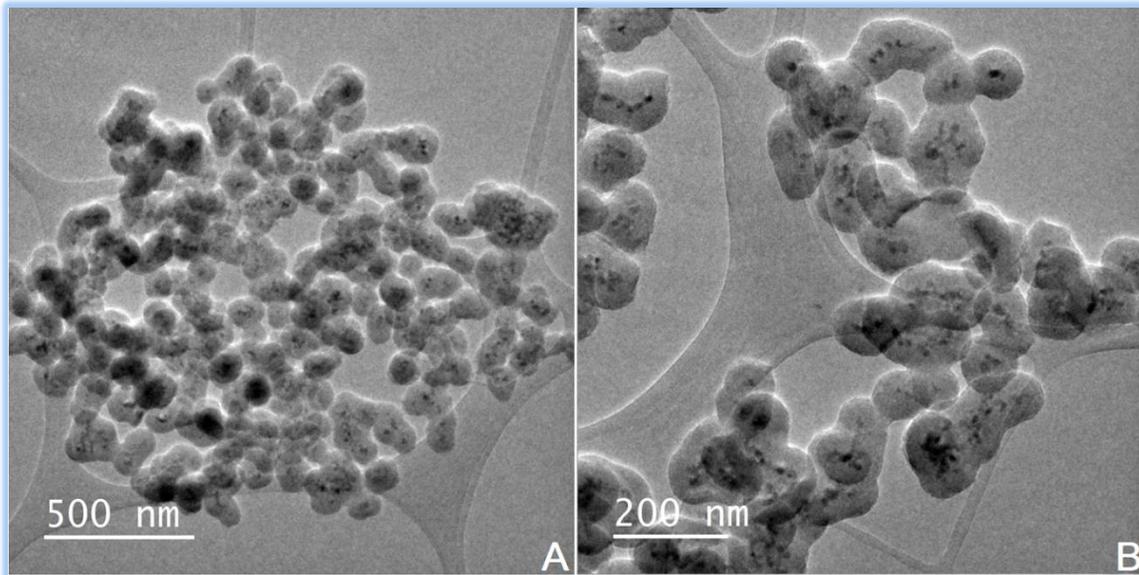


Figura 15. Micrografía de NPM de magnetita 3 cubiertas utilizando TEOS/APTES. Es posible distinguir fácilmente entre el núcleo de magnetita y el recubrimiento de silicatos (15-A). Por otro lado los aglomerados son tan grandes que son mayores a $1\ \mu\text{m}$ (15-B).

4.10 ESPECTROSCOPIA FT-IR PARA LAS MUESTRAS DE MAGNETITA 3 CON Y SIN RECUBRIMIENTO

Para poder corroborar la composición química del recubrimiento de las NPM observado con el TEM se realizó una espectrometría infrarroja. Como lo muestra la figura 15 los estiramientos y flexiones de los enlaces Si-O se presentan en los tres métodos de recubrimiento en la zona que va de los $800\ \text{cm}^{-1}$ a los $1000\ \text{cm}^{-1}$ (45) sin embargo en el método donde se utilizó APTES es poco evidente, esto se atribuye a que el rendimiento de la reacción de recubrimiento fue muy poco comparado con los métodos de TEOS y la mezcla TEOS/APTES. Además el espectro señala bandas no definidas en la zona de $3500\ \text{cm}^{-1}$ y $2900\ \text{cm}^{-1}$ las cuales se deben a la vibración de enlaces H-O-H y C-H (45) respectivamente probablemente por la presencia de residuos de agua y etanol remanentes de la reacción de silanización.

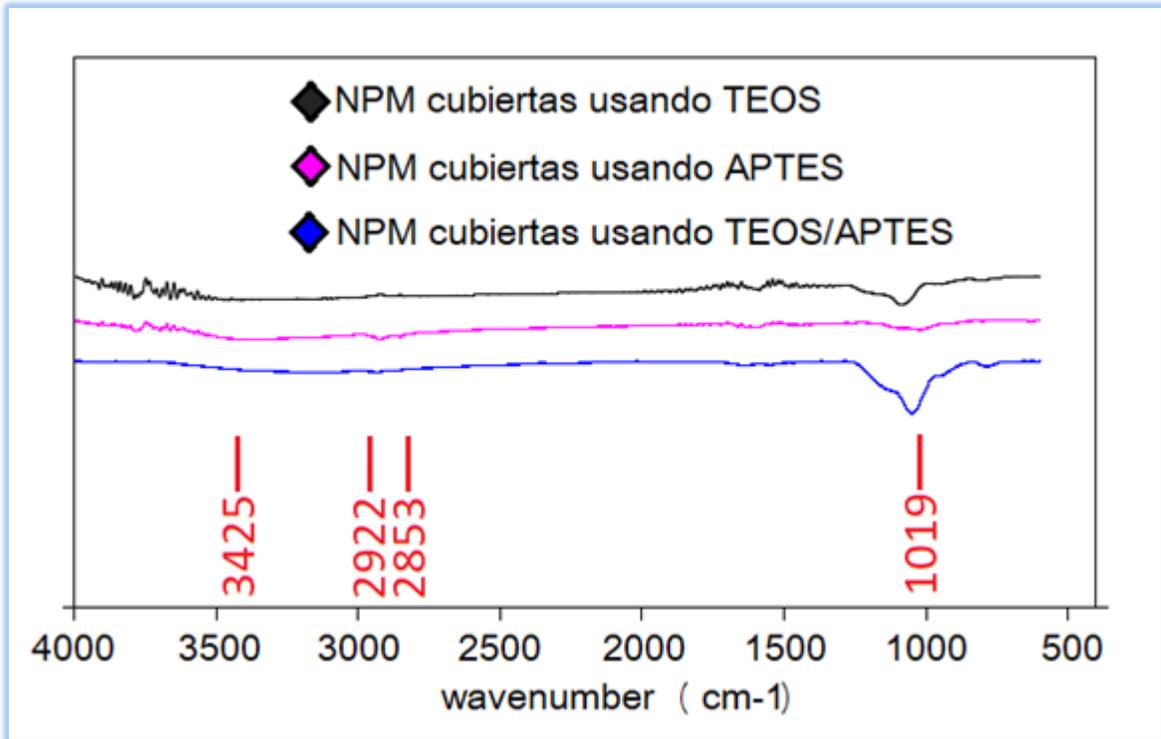


Figura 16. Espectro infrarrojo de NPM recubiertas con sílice mediante 3 métodos diferentes. Es evidente la formación de la capa de sílice debido a la presencia de las bandas en la zona cercana a los 1000 cm^{-1} que se deben a enlaces Si-O.

5 CONCLUSIÓN

Existe una relación inversa entre el tiempo de baño ultrasónico y el tamaño de las nanopartículas de magnetita producidas mediante el método de co-precipitación, es decir, entre mayor sea el tiempo, menor será el tamaño de las NPM. Por lo tanto, es un factor muy relevante en este método de síntesis.

El uso de un medio reductor al momento de la disolución de las sales de hierro en el método de co-precipitación, así como el burbujeo de nitrógeno, disminuyen la probabilidad de oxidación de la magnetita, hecho que se demuestra al disminuir también la aparición de pequeñas bandas no correspondientes a la magnetita en el difractograma de rayos X.

Recubrir las nanopartículas magnéticas con óxido de silicio utilizando TEOS como precursor produce mayor uniformidad en la estructura de sílice que conformará el revestimiento de las NPM en comparación con el uso de APTES y la mezcla de ambos. Además ofrece mayor claridad en las micrografías obtenidas mediante TEM, ya que este último es probable que genere asimetrías en la red de silanos debido al grupo amino que contiene.

PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Aún quedan por definir los parámetros para lograr una capa de recubrimiento más delgada y analizar si los grupos aminos del APTES son suficientes y se encuentran en la superficie de las NPM. Esto permitirá la posterior funcionalización de las mismas, con el objetivo de ser utilizadas en aplicaciones biomédicas.

REFERENCIAS

1. Singamaneni S, Bliznyuk VN, Binek C, Tsymbal EY. Magnetic nanoparticles: recent advances in synthesis, self-assembly and applications. *J Mater Chem.* 2011;21(42):16819-16845.
2. Akbarzadeh A, Samiei M, Davaran S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res Lett.* 2012;7:1–13.
3. Hedayatnasab Z, Abnisa F, Daud WMAW. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Mater Des.* 2017;123:174–196.
4. Huang J, Li Y, Orza A, Lu Q, Guo P, Wang L, Yang L, Mao H. Magnetic Nanoparticle Facilitated Drug Delivery for Cancer Therapy with Targeted and Image-Guided Approaches. *Adv Funct Mater.* 2016;26(22):3818–3836.
5. Chaughule RS, Purushotham S, Ramanujan RV. Magnetic Nanoparticles as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Proc Natl Acad Sci India Sect A Phys Sci.* 2012;82(3):257–268.
6. Mandel K, Hutter F. The magnetic nanoparticle separation problem. *Nano Today.* 2012;7(6):485–487.
7. Min JH, Woo M-K, Yoon HY, Jang JW, Wu JH, Lim C-S, Kim YK. Isolation of DNA using magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid. *Anal Biochem.* 2014;447:114–118.
8. Zhou Z, Kadam US, Irudayaraj J. One-stop genomic DNA extraction by salicylic acid-coated magnetic nanoparticles. *Anal Biochem.* 2013;442(2):249–252.
9. Valdiglesias V, Fernández-Bertólez N, Kiliç G, Costa C, Costa S, Fraga S, Bessa MJ, Pásaro E, Teixeira JP, Laffon B. Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. *J Trace Elem Med Biol.* 2016;38:53–63.
10. Sakuragi M, Taguchi K, Kusakabe K. Structural and biological characterization of Fe₃O₄-loaded spherical and tubular liposomes for use in drug delivery systems. *Jpn J Appl Phys.* 2017;56(5):055002-9.
11. Massart R, Cabuil V. Effect of some parameters on the formation of colloidal Magnetite in alkaline medium: yield and particle size control. *J Chim Phys Phys Chim Biol.* 1987;84(7–8):967–973.
12. Bee A, Massart R, Neveu S. Synthesis of very fine maghemite particles. *J Magn Magn Mater.* 1995; 149:6-9.

- 13.** Mahmoudi M, Simchi A, Milani AS, Stroeve P. Toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Colloid Interface Sci.* 2009;336:510–518.
- 14.** Rui H, Xing R, Xu Z, Hou Y, Goo S, Sun S. Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles. *Adv Mater.* 2010;22(25):2729–2742.
- 15.** Hao R, Xing R, Xu Z, Hou Y, Gao S, Sun S. Synthesis, Functionalization, and Biomedical Applications of Multifunctional Magnetic Nanoparticles. *Adv Mater.* 2010; 22:2729–2742.
- 16.** Bao G, Mitragotri S, Tong S. Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. *Annu Rev Biomed Eng.* 2013; 15:253–282.
- 17.** Gao J, Gu H, Xu B. Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications. 2009; 42. 1097-1107.
- 18.** Tsiapa I, Efthimiadou E K, Fragogeorgi E, Loudos G, Varvarigou AD, Bouziotis P, Kordas GC, Mihailidis D, Nikiforidis GC, Xanthopoulos S, Psimadas D, Paravatou-Petsotas M, Palamaris L, Hazle JD, Kagadis GC. ^{99m}Tc-labeled aminosilane-coated iron oxide nanoparticles for molecular imaging of $\alpha_v\beta_3$ -mediated tumor expression and feasibility for hyperthermia treatment. *J Colloid Interface Sci.* 2014; 433:163-175.
- 19.** Lee IJ, Park JY, Kim Y, Lee Y-S, Jeong JM, Kim J, Kim EE, Kang KW, Lee DS, Jeong S, Kim EJ, Kim YI, Chung JW. Image-Based Analysis of Tumor Localization After Intra-Arterial Delivery of Technetium-99m-Labeled SPIO Using SPECT/CT and MRI. *Molecular Imaging.* 2017; 16:1-9.
- 20.** Lamb J, Holland JP. Advances Methods for Radiolabeling Multimodality Nanomedicines for SPECT/MRI and PET/MRI. *Journal of Nuclear Medicine.* 2018; 59(3):382-389.
- 21.** Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *J Colloid Interface Sci.* 1968; 26:62-69.
- 22.** Creative Commons, File:NdFeB-Domains.jpg. 2004.
- 23.** Ramimoghdam D, Bagueri S, Hamid S. Progress in electrochemical synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles. *J Magn and Magn Mater.* 2014;368:207–229.
- 24.** Benz M. Superparamagnetism: Theory and applications. 2014.
- 25.** Khan K, Rehman S, Rahman H, Khan Q. Synthesis and application of magnetic nanoparticles. *Nanomagnetism.* 2014;88 135-159.

- 26.** Salazar-Álvarez G, Qin J, Sepelak V, Bergmann I, Vasilakaki M, Trohidou KN, Ardisson JD, Macedo WAA, Mikhaylova M, Muhammed M, Baró MD, Nogués J. Cubic versus Spherical Magnetic Nanoparticles: The Role of Surface Anisotropy. *J. AM. CHEM. SOC.* 2008;130, 13234–13239.
- 27.** Buschow K, Boer F. *Physics of Magnetism and Magnetic Materials*. Kluwer Academic Publishers. 2009.
- 28.** LTS Research Laboratories. Iron (III) oxide Inc. Safety Data Sheet. 2015
- 29.** Particle Sciences Inc. *An Overview of the Zeta Potential*. 2012.
- 30.** Bini R, Marques R, Santos F, Chaker J, Jaefelicci. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxysilanes. *J Magn Magn Mater.* 2012;324(4):534-539.
- 31.** Marinin A. Synthesis and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with silica. Master Thesis. Royal Institute of Technology of Stockholm 2012.
- 32.** Hyeon T, Lee S, Park J, Chung Y, Na H. Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Maghemite. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123:12798-12801.
- 33.** Ge S, Shi X, Sun k, Li C, Uher C, Baker Jr JR, Holl MMB, Orr BG. Facile Hydrothermal Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Tunable Magnetic Properties. *J Phys Chem.* 2009; 113, 13593–13599.
- 34.** Lemine O, Omri K, Zhang B, El Mir L, Sajieddine M, Alyamani A, Bououdina M. Sol–gel synthesis of 8 nm magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles and their magnetic properties. *Superlattices Microstruct.* 2012; 52:793–799.
- 35.** Atiq S, Zaka M, Riaz S, Naseem S. Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles for cancer therapy. *ANBRE13.* 2013.
- 36.** Khang Y, Risbud S, Rabolt J, Stroeve P. Synthesis and characterization of nanometer-size Fe_3O_4 and $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles. *Chem Mater.* 1996; 8:2209-2211.
- 37.** Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robi C, Muller R. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem Rev.* 2008; 108:2064-2110.
- 38.** Lu A, Salabas E, Schuth F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew Chem Int Ed.* 2007; 46:1222-1244.

- 39.** Hierro I, Pérez Y. Alcoxisilanos en la consolidación de materiales pétreos. Revista Otarq - ISSN 2530-4933 Vol. 1 2016;.171-180.
- 40.** Cuoq F, Masion A, Labille J, Rose J, Ziarelli F, Prelot B, Bottero, JY. Preparation of amino-functionalized silica in aqueous conditions. Appl Surf Sci. 2013; 266:155-160.
- 41.** Dutrow B, Clark C. X Ray Powder Diffraction. Integrating Research and Education. 2018.
https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html.
- 42.** Goldstein J, Newbury D, Joy D, Lyman C, Echlin P, Lifshin E, Sawyer L, Michael J. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, Third Edition. PlenumPress. 2003.
- 43.** Salopek B, Krasic D, Filipovic S. Measurement and application of Zeta-potential. Rudarsko-geolosko- naftni zbornik Vol. 4 1992 147-151.
- 44.** Royal Society of Chemistry. Infrared Spectroscopy. www.rsc.org. 2009.
- 45.** Ahangaran F, Hassanzadeh A, Nouri S. Surface modification of Fe₃O₄@SiO₂ microsphere by silane coupling agent. Int Nano Lett. 2013;3(23):3-7.
- 46.** Coey J. Magnetism and magnetic materials. Cambridge University Press. 2009.
- 47.** Tokarev A, Trotsenko O, Asheghali D, Griffiths IM, Stone HA, Minko S. Reactive Magnetospinning of Nano- and Microfibers. Angew Chemie - Int Ed. 2015;54(46):13613-13616.
- 48.** Colloidal Dynamics. The Zeta Potential. www.colloidal-dynamics.com. 1999.