

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE Fe_3O_4 Y SU INCLUSIÓN EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA POSIBLES APLICACIONES BIOMÉDICAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :
ALDO SALAZAR PÉREZ

ASESOR:
M. en C. NÉSTOR MENDOZA MUÑOZ

CO-ASESOR
DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.

ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la **Tesis**:

Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ y su inclusión en nanopartículas poliméricas para posibles aplicaciones biomédicas

Que presenta el pasante: Aldo Salazar Pérez

Con número de cuenta: 303165778 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcallí, Méx. a 23 de agosto de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Luis Arias Téllez	
VOCAL	Dra. Elizabeth Piñón Segundo	
SECRETARIO	M.C. Néstor Mendoza Muñoz	
1er SUPLENTE	M.C. Luis Mendoza Romero	
2do SUPLENTE	M.C. María Zaida Urbán Morlán	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).

HHA/pm

AGRADECIMIENTOS

A mis padres: Karina Pérez Juárez y J. Antonio Salazar Padilla.

Por su confianza, cariño, amor y apoyo demostrados a lo largo de toda mi vida y a los cuales dedico este trabajo, pues gracias a ellos ha sido posible la culminación de mis estudios profesionales. Gracias por compartir una gran parte de su experiencia y conocimiento a lo largo de mi formación personal y profesional. Gracias por los dos regalos más preciados que podría tener: la vida y una educación ejemplar. Gracias por hacer de mí la persona que soy y seré de ahora en adelante. Los amo.

A mi hermana: Tania.

Por su apoyo incondicional, por esas palabras de aliento en los momentos indicados, pero sobre todo por ser mi hermana y espero que este trabajo le sirva de ejemplo para seguir adelante día a día. Estoy muy orgulloso de ser tu hermano. Te quiero.

A mis tíos, tías, primos y primas.

Por estar ahí en los momentos de celebración, pero también en los momentos de desconsuelo. Por su apoyo y cariño. Gracias.

A mi novia: Diana.

Por ser una gran compañera, una excelente amiga y una novia maravillosa. Por compartir junto a mí tantos y tantos hermosos momentos. Por estar ahí en mis alegrías, en mis tristezas, en mis triunfos y fracasos. Por permitirme compartir esta etapa a su lado, pero sobre todo por ser mi compañera de vida y una mujer admirable. Por todo lo vivido y lo que nos falta por vivir, por eso y muchas cosas más, Gracias. Te amo.

A mi asesor: M. en C. Néstor Mendoza Muñoz y Dr. David Quintanar Guerrero.

Por su apoyo y conocimientos compartidos durante mi estancia en el LPITF, por darme las facilidades para realizar este trabajo y dar mis primeros pasos como profesionalista.

A mis amigos: Anabel, Alan (Rigo), Celia, Gabriela (Marmota), Gabriela, Gustavo, Iván, León, Liliana, Marcela, Mijussa, Mónica, Santino, Xchel, etc...

Por todas esas inolvidables experiencias, risas, fiestas, anécdotas y tantas cosas que vivimos juntos a lo largo de tantos años de amistad que espero perduren por muchos años.

A mis compañeros: Ángel, Clara, Cynthia, Irene, Toño, Sergio, Zaida, etc...

Por hacer de esta experiencia una de las más enriquecedoras e inolvidables de mi vida, por todo su apoyo, por todos sus consejos, pero sobre todo por su amistad, la cual espero conservar por muchos años más. Gracias por todos los buenos deseos que recibí de cada uno de ustedes. Los quiero, estimo y respeto mucho. Gracias.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras ix

Índice de tablas xi

Índice de gráficos xii

Abreviaturas xiii

I. Introducción..... 14

II. Marco teórico 16

1. Nanopartículas magnéticas..... 16

1.1. Definición. 16

1.2. Generalidades de los materiales magnéticos..... 17

1.2.1. Ferromagnetismo..... 17

1.2.2. Diamagnetismo..... 18

1.2.3. Paramagnetismo..... 19

1.2.4. Propiedades magnéticas. 20

1.2.5. Modificación de la coercitividad con respecto al tamaño de
partícula y superparamagnetismo. 22

1.2.6. Superparamagnetismo. 23

1.3. Magnetita. 23

1.3.1. Propiedades..... 24

1.3.2. Cristalinidad..... 25

1.4. Síntesis de nanopartículas magnéticas..... 26

1.4.1. Método de co-precipitación..... 26

1.4.2. Descomposición y/o reducción térmica. 28

1.4.3. Microemulsión..... 29

1.4.4. Síntesis hidrotérmica. 31



1.4.5. Ventajas y desventajas.....	31
1.5. Protección y estabilización de nanopartículas magnéticas.	33
1.5.1. Pasivación superficial por oxidación moderada.....	34
1.5.2. Surfactante y recubrimiento polimérico.....	35
1.5.3. Revestimiento de metales preciosos.	36
1.5.4. Recubrimiento de sílice.	37
1.5.5. Revestimiento de carbono.....	37
1.6. Funcionalización y Biocompatibilidad de las NPM.	38
1.6.1. Funcionalización.....	38
1.6.2. Biocompatibilidad de las nanopartículas de óxido de hierro.	40
1.7. Aplicaciones biomédicas de NPM.	41
1.7.1. Orientación específica de las nanopartículas de óxido de hierro.....	41
1.7.2. Nanopartículas de óxido de hierro como sistemas de administración inteligente de fármacos.....	42
1.7.3. IRM y US basada en compuestos de óxido de hierro.....	42
1.7.4. Nanopartículas de óxido de hierro como agentes de contraste.....	43
1.8. Métodos de preparación de NPP.	44
1.8.1. Método de emulsificación-evaporación.....	44
1.9. Tendencia Actual.	46
III. Objetivos.....	47
1. Objetivo general	47
2. Objetivos particulares.....	47
IV. Materiales y equipos.....	48
V. Metodología	50
1. Síntesis de las NPM por el método de co-precipitación.	51

1.1.	Efecto del % de citrato de sodio como estabilizador coloidal.	52
1.2.	Efecto de la cantidad de NH ₄ OH 5 M en el tamaño y aspecto de las NPM.....	53
2.	Caracterización.	53
2.1.	Tamaño de partícula.....	53
2.2.	Morfología.....	53
2.3.	Difracción de rayos x.	54
2.4.	Magneticidad.	54
3.	Funcionalización de las NPM con ácido oleico.	54
3.1.	Efecto de la cantidad de AO puro sobre la naturaleza lipofílica de las NPM.....	55
4.	Inclusión de las NPM en las NPP.....	56
4.1.	Preparación de los sistemas NPM-NPP.	56
4.2.	Inclusión de las NPM en la matriz polimérica de las NPP.	57
4.3.	Determinación de la cantidad de Fe ₃ O ₄ incluido en las NPP.....	57
a.	Curva de Calibración.	57
b.	Preparación de la Muestra.....	59
VI.	Resultados y discusión.	60
1.	Síntesis de las nanopartículas por el método de co-precipitación.....	60
1.1.	Efecto del % de citrato de sodio como estabilizador coloidal.	61
1.2.	Efecto de la cantidad de NH ₄ OH 5 M en el tamaño y aspecto de las NPM.....	64
2.	Caracterización.	66
2.1.	Tamaño de partícula.....	67
2.2.	Morfología.....	68
2.3.	Difracción de Rayos-X.	70

2.4.	Magneticidad.	71
3.	Funcionalización de las NPM con AO.	73
3.1.	Efecto de la cantidad de AO puro sobre la naturaleza lipofílica de las NPM.....	75
4.	Inclusión de las NPM en NPP.	76
4.1.	Preparación de las NPP.	76
4.2.	Inclusión de las NPM en la matriz polimérica de las NPP.	77
4.3.	Determinación de la cantidad de Fe ₃ O ₄ incluido en las NPP.....	78
a.	Curva de calibración.	78
b.	Preparación de la muestra.....	81
VII.	Conclusiones	86
VIII.	Perspectivas	87
IX.	Referencias	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema de dominios magnéticos de un ferromagneto alineándose con un campo creciente. 18

Fig. 2. Diamagnetismo que presenta un objeto al someterse a un campo magnético. 19

Fig. 3. Paramagnetismo de un cuerpo. 20

Fig. 4. Magnetización para partículas superparamagnéticas (SPM) y partículas ferromagnéticas (FM), mostrando la coercitividad (H_c), la magnetización de saturación (M_s) y la magnetización remanente (M_R). 21

Fig. 5. Variación de la coercitividad (H_c) de nanopartículas magnéticas con el tamaño. 23

Fig. 6. (a) Estructura de espín cúbica centrada en las caras de la magnetita. (b) Ampliación de un tetraedro y un octaedro adyacentes que comparten un átomo de oxígeno. 25

Fig. 7. Elaboración de NPM por microemulsión. 30

Fig. 8. Esquema representativo de la oxidación de NPM en presencia de oxígeno (a), así como la prevención de tal fenómeno por la protección de las NPM mediante la incorporación de un recubrimiento protector (b). 34

Fig. 9. Recubrimiento polimérico de NPM. 36

Fig. 10. Recubrimiento de NPM con metales preciosos de oro. 36

Fig. 11. Esquema representativo de una protección con sílice. 37

Fig. 12. Información general de las posibles modificaciones en la superficie de las nanopartículas de óxido de hierro. 39

Fig. 13. Representación esquemática de la preparación de NPP por el método de emulsión- difusión por desplazamiento directo del disolvente. 45

Fig. 14. Diagrama de flujo experimental. 50

Fig. 15. Esquemización del proceso de síntesis de NPM. 51

Fig. 16. Afinidad de las NPM funcionalizadas con ácido oleico hacia la fase orgánica o acuosa. 55

Fig. 17. Esquematización del proceso de preparación de los sistemas NPM-NPP.....57

Fig. 18. NPM sintetizadas por el método de co-precipitación.....61

Fig. 19. Evaluación de la magneticidad de las NPM obtenidas.....61

Fig. 20. Distribución del tamaño de partícula en función de la cantidad de citrato de sodio 0.1 M.....63

Fig. 21. Evaluación del aspecto de las NPM por efecto de la cantidad de NH₄OH 5 M.65

Fig. 22. Distribución de tamaño de partícula para las NPM sintetizadas.....67

Fig. 23. Micrografías obtenidas por MET de las NPM sintetizadas. A. 50000x; B. 75000x.69

Fig. 24. Difractograma de Rayos-X de polvos (XRPD). A) NPM sintetizadas; B) Patrón de comparación correspondiente a magnetita.70

Fig. 25. Curvas de histéresis para NPM funcionalizadas con ácido oleico y NPM no funcionalizadas.....72

Fig. 26. Funcionalización de NPM. A) Separación de NPM en cloroformo; B) Esquema demostrativo de la adsorción de AO en la superficie de las NPM.74

Fig. 27. Evaluación de la lipofilicidad de las NPM vs. Cantidad de AO puro adsorbido.....75

Fig. 28. Modificación de la cantidad de NPM añadidas a cada sistema de NPP...77

Fig. 29. Representación esquemática de la formación del complejo FEN-Fe (Sandell, 1959).78

Fig. 30. Sistemas utilizados para la curva de Calibración en la cuantificación de hierro mediante la formación de un complejo con FEN.....79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los métodos de síntesis de NPM (Lu, Salabas *et al.*, 2007).32

Tabla 2. Evaluación del efecto del % de Citrato de sodio en la síntesis de NPM.52

Tabla 3 Curva de Calibración de Fe²⁺.58

Tabla 4. Efecto del % de citrato de sodio 1 M en el tamaño de partícula de las NPM sintetizadas.62

Tabla 5 Evaluación de tamaño de partícula para las NPM obtenidas.68

Tabla 6. Mediciones de susceptibilidad magnética para NPM no funcionalizadas y funcionalizadas.71

Tabla 7 Curva de Calibración de Fe²⁺.80

Tabla 8. Cuantificación de Fe embebido en las NPP por espectrofotometría.82

Tabla 9. Cuantificación de Fe₃O₄ embebido en las NPP.83

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribución de tamaño de partícula por efecto del % de citrato de sodio 0.1 M.....	62
Gráfico 2. Efecto de la cantidad de NH_4OH 5 M sobre el tamaño promedio aritmético de partícula (barras representan la desviación estándar).	65
Gráfico 3. Curva de Calibración para la cuantificación de Fe^{2+} mediante espectrofotometría y sus parámetros de regresión.	81
Gráfico 4. Comparación entre la cantidad agregada y embebida de Fe_3O_4 en las NPP.	84
Gráfico 5. Comparación del porcentaje de Fe_3O_4 embebido en las sistemas NPM-NPP.....	84

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AO	Ácido oleico
APTES	3-aminopropil trietoxilato
FEN	1,10-Fenantrolina
FM	Ferro- y Ferrimagnetismo
Hc	Coercitividad
HR-TEM	Microscopia electrónica de alta resolución
IRM	Imágenes por resonancia magnética
Ku	Constante de anisotropía magnética
MBG	Microburbujas gaseosas
MET	Microscopia electrónica de transmisión
Mr	Remanente de magnetización
Ms	Saturación de magnetización
NP	Nanopartículas
NPM	Nanopartículas magnéticas
NPP	Nanopartículas poliméricas
p/v	Relación peso sobre volumen
PEG	Polietilenglicol
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PVAL	Alcohol polivinílico
RMD	Resonancia magnética diagnóstica
RPM	Revoluciones por minuto
R _{SP}	Radio superparamagnético
SPM	Superparamagnetismo
STD	Solución estándar
US	Ultrasonido
w/o	Emulsión agua en aceite
XRPD	Difracción de rayos X para polvos

I. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es una área multidisciplinaria que consiste en la creación y utilización de materiales, dispositivos o sistemas de escala nanométrica. En la actualidad la nanotecnología juega un papel importante en el desarrollo de sistemas con aplicaciones biomédicas como los biomarcadores y biosensores que facilitan el diagnóstico de patologías (Klibanov, 1999).

Las nanopartículas magnéticas (NPM) ofrecen una amplia gama de posibles aplicaciones dentro del área biomédica (biosensores, acarreadores de fármacos, agentes de contraste en resonancia magnética (RMD) y ultrasonido (US), diagnóstico y en el tratamiento contra el cáncer, entre otras). Primero, las nanopartículas tienen tamaños que pueden asemejar en dimensiones a un virus (20-50 nm), una proteína (5-50 nm) o un gen (2 nm de ancho y 10-100 nm de largo). Segundo, éstas al ser magnéticas (obedecen la ley de Coulomb) pueden ser manipuladas por un campo magnético externo. Tercero, las nanopartículas poseen una gran área superficial, la cual puede ser modificada apropiadamente para el ataque a ciertos sitios específicos (Tartaj, Morales *et al.*, 2005).

Las NPM de óxidos de hierro son partículas sintéticas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ o Fe_3O_4 con un tamaño de partícula entre 10-100 nm, las cuales pueden ser acompañadas de un recubrimiento orgánico o inorgánico. Durante los últimos años, la síntesis de nanomateriales magnéticos se ha convertido en un campo de amplio estudio. Una variedad de métodos han sido reportados en la literatura para sintetizar NPM, tales como el método de co-precipitación, descomposición y/o reducción térmica, microemulsión, síntesis hidrotérmica, entre otros. Las partículas resultantes pueden ser dispersadas en un líquido, así como, sufrir una modificación para estabilizarlas en una suspensión biológica, además de proveer grupos funcionales en su superficie e impedir el ataque inmediato del sistema retículo endotelial (Neuberger, Schöpf *et al.*, 2005). Sin embargo, para que estas NPM cumplan con los objetivos antes mencionados requieren ser activadas o funcionalizadas, este

proceso se lleva a cabo mediante la inclusión de ciertos grupos o moléculas orgánicas biocompatibles y biodegradables en su superficie; por ejemplo: dextrán, β -ciclodextrinas, ácido oleico, alcohol polivinílico (PVAL), 3-aminopropil trietoxilato (APTES), polietilenglicol (PEG), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), entre otros (Feng, Hong *et al.*, 2008a; Hong, Feng *et al.*, 2008b; Hong, Li *et al.*, 2008c; Badruddoza, Hidajat *et al.*, 2010).

En años recientes, la funcionalización de las NPM ha incrementado drásticamente sus posibles aplicaciones dentro del área clínica y de la medicina humana: por ejemplo, el uso de ferrofluidos como agentes de contraste en RMD; además, se han realizado avances usando NPM en estudios clínicos de terapia contra el cáncer en medicina veterinaria y humana, atacando tumores con campos magnéticos externos (Neuberger, Schöpf *et al.*, 2005). Actualmente, una de las áreas de mayor desarrollo dentro de las aplicaciones de las NPM, es sin duda, el uso como agentes de contraste dentro de la imagenología. Hoy en día se busca potencializar el uso de estos agentes, mediante la inclusión de partículas magnéticas dentro de una matriz polimérica. La obtención de agentes de contraste duales, en los cuales las NPM son embebidas en microburbujas gaseosas (MBG), potencialmente pueden convertirse en un efectivo método de diagnóstico por contraste en la obtención de imágenes por RMD y US (Yang, Li *et al.*, 2009).

La idea del presente trabajo, es sentar las bases tecnológicas para el desarrollo de sistemas coloidales constituidos por NPM de Fe_3O_4 embebidas dentro de nanopartículas poliméricas (NPP) y presentarlos como sistemas con potencial aplicación en el área biomédica tales como: agentes de contraste duales, acarreadores de fármacos, entre otras; que permitan mejorar el diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades en el área de medicina humana y veterinaria.

II. MARCO TEÓRICO

1. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.

1.1. Definición.

Las NPM son partículas sintéticas de óxidos metálicos (Fe, Au, Cu, Al, Ag, etc.) con un tamaño de partícula entre 10-1000 nm, las cuales pueden ser acompañadas de un recubrimiento orgánico o inorgánico. Estas partículas pueden ser bien dispersas en un líquido, normalmente agua, y sufrir una modificación para cumplir con diferentes objetivos: 1) estabilizar las nanopartículas en una suspensión biológica con un pH cercano a 7.4 y a altas concentraciones de sal, 2) proveer de grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas para posteriores derivaciones, y finalmente 3) impedir el ataque inmediato del sistema retículo endotelial (Neuberger, Schöpf *et al.*, 2005).

El óxido de hierro es el material más investigado para fines biomédicos, gracias a su gran compatibilidad con respecto a otros materiales magnéticos, tanto en su estado puro como oxidado. Existen varios tipos de óxidos de hierro en la naturaleza y que pueden ser preparados en el laboratorio, hoy en día solo la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y magnetita (Fe_3O_4) son capaces de cumplir las necesidades requeridas para aplicaciones biomédicas. Estos requerimientos incluyen momentos magnéticos suficientemente altos, estabilidad química en condiciones fisiológicas y baja toxicidad, sin mencionar lo fácil y económico de los procedimientos de síntesis disponibles para la preparación de estos materiales. El grado de cristalinidad, así como la dispersibilidad en términos de tamaño y forma de la NP son parámetros críticos que afectan su rendimiento en técnicas terapéuticas y de diagnóstico, como la obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) e hipertermia (Figuerola, Di Corato *et al.*, 2010).

1.2. Generalidades de los materiales magnéticos.

Los materiales magnéticos son caracterizados por la presencia de dipolos magnéticos generados por el giro de algunos de sus electrones. Cada uno de estos electrones polarizados puede estar alineado de forma paralela o antiparalela con respecto a sus vecinos en la red cristalina y este tipo de interacción es lo que da lugar al efecto magnético macroscópico que podemos medir. Dependiendo de la respuesta magnética observada, podemos clasificar a los materiales magnéticos como paramagnetos, ferromagnetos, ferrimagnetos o antiferromagnetos. Sin embargo, dicho comportamiento es altamente dependiente del tamaño y de la temperatura, ya que a una temperatura en particular, el comportamiento magnético de cualquier material puede ser alterado por un ajuste en su tamaño (Wiley, 2000).

Las propiedades magnéticas que caracterizan a todos los materiales magnéticos son: *ferromagnetismo*, *diamagnetismo* y *paramagnetismo*.

1.2.1. Ferromagnetismo.

El ferromagnetismo es un fenómeno físico en el que se produce un ordenamiento magnético de todos los momentos magnéticos de una muestra, en la misma dirección (Fig. 1). Un material ferromagnético es aquel que puede presentar ferromagnetismo. La interacción ferromagnética es aquella que hace que los momentos magnéticos tiendan a disponerse en la misma dirección o sentido.

El ferromagnetismo no es una propiedad que depende solamente de la composición química de un material, sino que también depende de su estructura cristalina y la organización microscópica. Hay aleaciones ferromagnéticas de un metal, cuyos componentes no son ferromagnéticos, llamados aleaciones Heusler. Por el contrario, existen aleaciones no magnéticas, como los tipos de acero inoxidable, compuestas casi exclusivamente de metales ferromagnéticos.

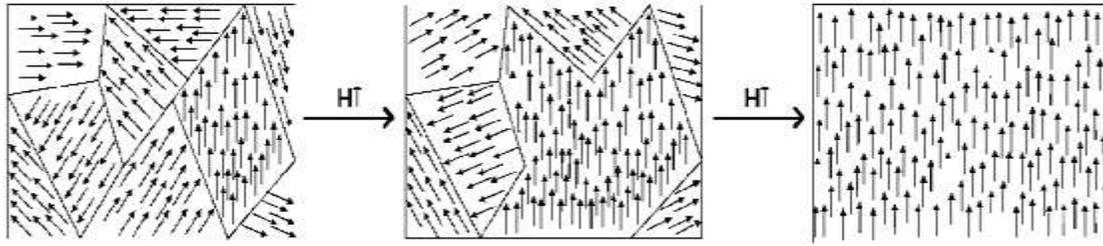


Fig. 1. Esquema de dominios magnéticos de un ferromagneto alineándose con un campo creciente.

Generalmente, los ferromagnetos están divididos en dominios magnéticos, separados por superficies conocidas como paredes de Bloch. En cada uno de estos dominios, todos los momentos magnéticos están alineados. Al someter un material ferromagnético a un campo magnético intenso, los dominios tienden a alinearse con éste, de forma que aquellos dominios en los que los dipolos están orientados en el mismo sentido o dirección que el campo magnético inductor aumentan su tamaño (Sundaresan Rao, 2009).

1.2.2. Diamagnetismo.

El diamagnetismo es una propiedad de los materiales que consiste en ser repelidos por los imanes. Es lo opuesto a los materiales ferromagnéticos los cuales son atraídos por los imanes. El fenómeno del diamagnetismo fue descubierto y nominado por primera vez en 1845 por Michael Faraday cuando vio un trozo de bismuto que era repelido por un polo cualquiera de un imán; lo que indica que el campo externo del imán induce un dipolo magnético de sentido opuesto en el bismuto.

Una sustancia se dice que es diamagnética cuando puede ser menos permeable para las líneas de fuerza magnéticas que el vacío, y en consecuencia puede tener tendencia a desplazarse de las regiones en que la densidad de las líneas de fuerza sea muy grande hacia las regiones en que la intensidad de campo sea más débil. El campo inducido en la sustancia provoca que sea repelida (Fig. 2). Cuando

una sustancia presenta el comportamiento contrario se dice que es paramagnética (Falicov, 2003).

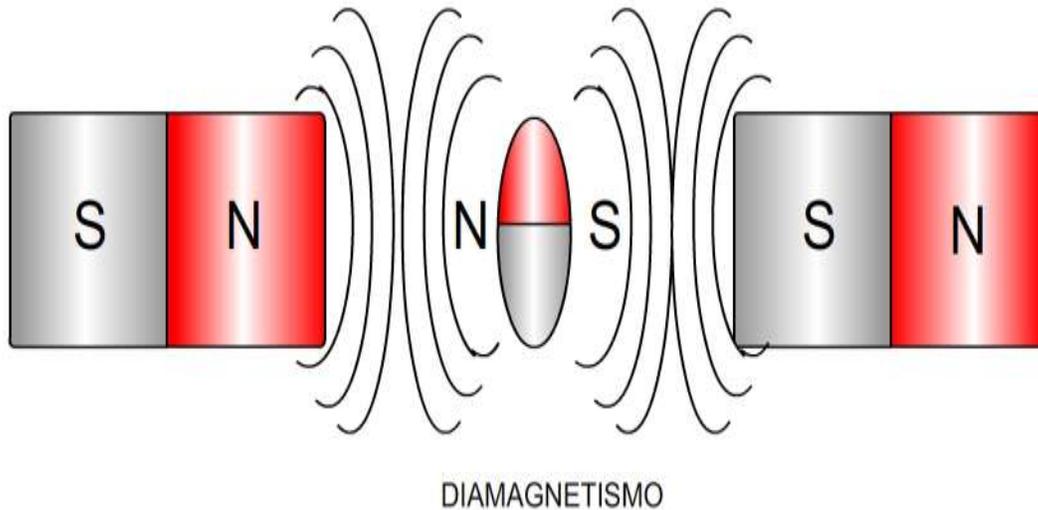


Fig. 2. Diamagnetismo que presenta un objeto al someterse a un campo magnético.

1.2.3. Paramagnetismo.

Un material paramagnético se caracteriza por la orientación al azar de sus dipolos magnéticos, los cuales solo pueden estar alineados en presencia de un campo magnético externo y a lo largo de toda su dirección. Este tipo de materiales no poseen la coercitividad de remanencia, lo cual significa que cuando un campo magnético externo es apagado, los dipolos magnéticos internos se aleatorizan de nuevo, no se requiere energía adicional para desmagnetizar el material y, por lo tanto, el cero inicial del momento magnético neto se recupera de forma espontánea (Fig. 3). Una nanopartícula con tal comportamiento magnético es superparamagnética.

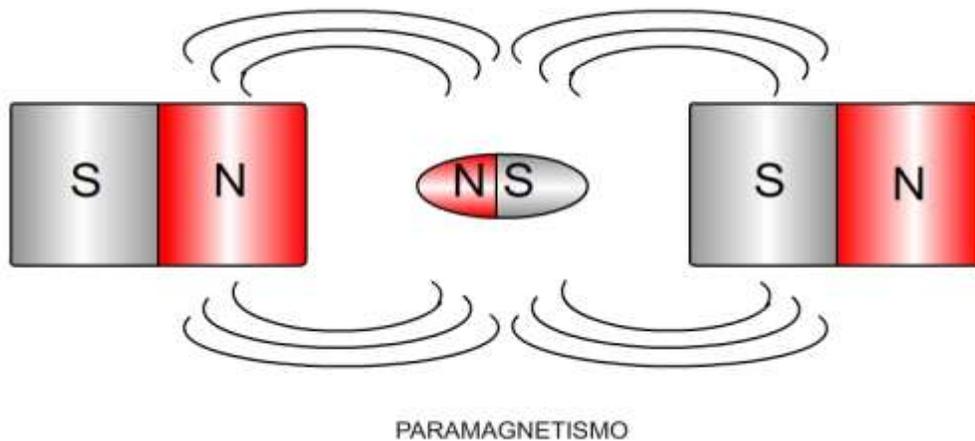


Fig. 3. Paramagnetismo de un cuerpo.

Alternativamente, los dipolos magnéticos individuales en un cristal pueden alinearse paralelamente uno con otro, por lo tanto se obtiene un mejoramiento en la respuesta colectiva incluso en ausencia de un campo magnético externo. Esto es conocido como *ferromagnetismo* (Yafet, 2003).

1.2.4. Propiedades magnéticas.

Existen tres parámetros principales para describir la fuerza y la magnetización de un material, los cuales son: 1) la coercitividad (H_c), este parámetro representa la energía mínima para la inversión de la magnetización del material. La coercitividad está estrictamente relacionada con la *constante de anisotropía magnética* (K_u) que determina la energía a ser superada en orden de invertir la dirección de los dipolos magnéticos del material.

La K_u puede tener diferentes contribuciones, las cuales surgen de la simetría de la red cristalina, la contribución de la superficie de la cubierta de las nanopartículas y de la forma de las nanopartículas; 2) la saturación de magnetización (M_s), la cual indica el valor máximo de magnetización que el material puede alcanzar bajo el

efecto de campos lo suficientemente altos y 3) el remanente de magnetización (M_R), éste indica la magnetización residual al aplicar un campo cero.

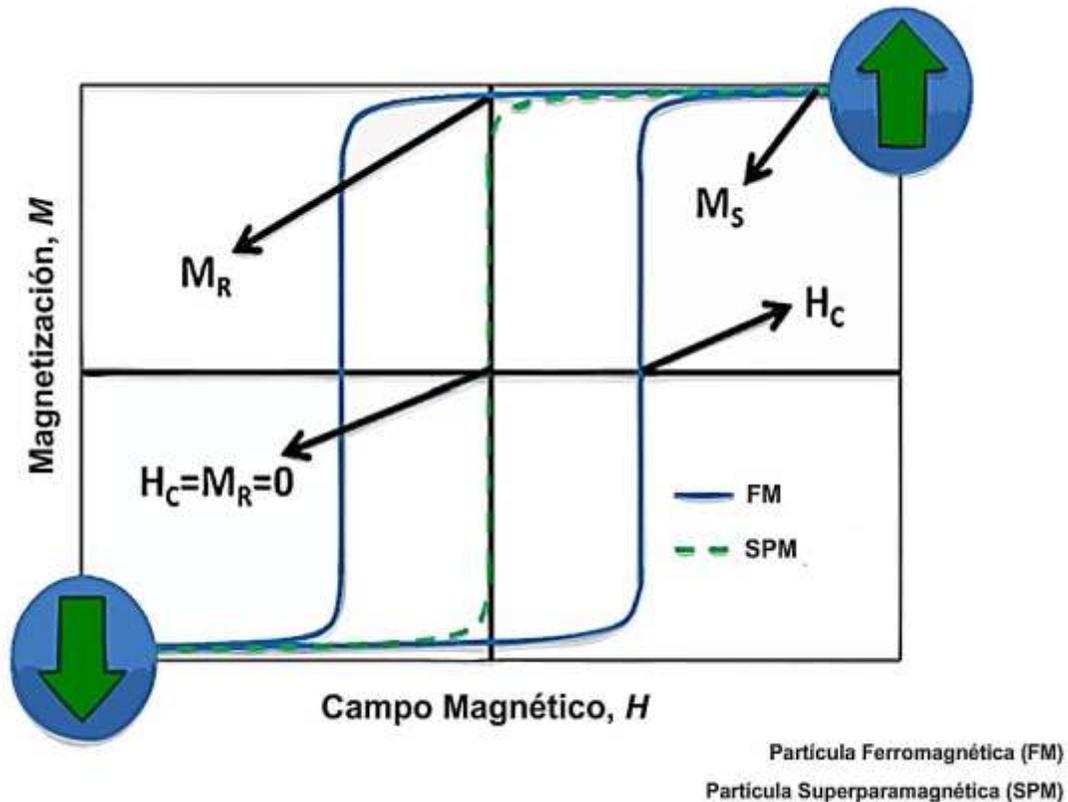


Fig. 4. Magnetización para partículas superparamagnéticas (SPM) y partículas ferromagnéticas (FM), mostrando la coercitividad (H_C), la magnetización de saturación (M_S) y la magnetización remanente (M_R).

Estos tres parámetros pueden ser fácilmente identificados en la curva de histéresis generada en las mediciones de magnetización campo-dependiente (Fig. 4). Metales como el Fe, Co o Ni, así como algunas de sus aleaciones son materiales ferromagnéticos. En contraste a la situación ferromagnética, los dipolos magnéticos vecinos pueden alinearse de manera antiparalela en la red cristalina, lo cual significa que estos pueden cancelarse unos a otros. Este tipo de intercambio magnético puede dar origen a dos situaciones diferentes: una llamada *antiferromagnetismo*, cuando los dipolos magnéticos poseen el mismo valor y por lo tanto, el material muestra una red de magnetización cero y otra conocida *ferrimagnetismo* cuando las parejas de electrones presentan diferentes

valores y, en este caso, los dipolos magnéticos distintos a cero seguirán magnetizando el material, incluso en la ausencia de un campo magnético externo.

El primer caso carece de interés para aplicaciones biomédicas, debido al momento magnético neto de cero de dichos materiales; sin embargo, la última opción es mucho más interesante y de hecho, el óxido de hierro (*magnetita* y *maghemita*) pertenece a la clase de materiales ferrimagnéticos (Figuerola, Di Corato *et al.*, 2010).

1.2.5. Modificación de la coercitividad con respecto al tamaño de partícula y superparamagnetismo.

La reducción en el tamaño de los materiales magnéticos muestra interesantes ventajas que los hacen más adecuados para técnicas terapéuticas y diagnósticas comparadas con sus contrapartes a granel. Los parámetros magnéticos como la coercitividad de las nanopartículas puede ser modificada por una disminución en su tamaño, consecuentemente, su papel biomédico puede ser optimizado para sus requerimientos prácticos. Por otra parte, una mayor reducción del tamaño por debajo de un cierto valor del radio, llamado radio superparamagnético (R_{SP}), induce una transición magnética en partículas provocando que, tanto las nanopartículas ferro- y ferrimagnéticas (FM), se conviertan en superparamagnéticas y como ya se mencionó, posean altos momentos magnéticos bajo el efecto de un campo magnético, careciendo de un momento magnético remanente, el cual estará presente cuando el campo magnético externo sea retirado. Esta propiedad se traduce en una ventaja significativa, sobre todo en experimentos *in vivo*: la falta de coercitividad, o en otras palabras, el momento magnético neto cero de las nanopartículas una vez concluidas las medidas del diagnóstico o terapia puede evitar la acumulación potencial de las partículas que podrían fácilmente causar la formación de embolias en los vasos sanguíneos (Figuerola, Di Corato *et al.*, 2010).

1.2.6. Superparamagnetismo.

El *superparamagnetismo* es una propiedad asociada a la nanoestructura de los materiales magnéticos y surgen cuando la energía térmica es suficientemente alta para sobrepasar la energía de estabilización de la partícula (Fig. 5) explicando como la coercitividad de las nanopartículas varía cuando su tamaño disminuye, hasta que el estado superparamagnético es alcanzado (Figuerola, Di Corato *et al.*, 2010).

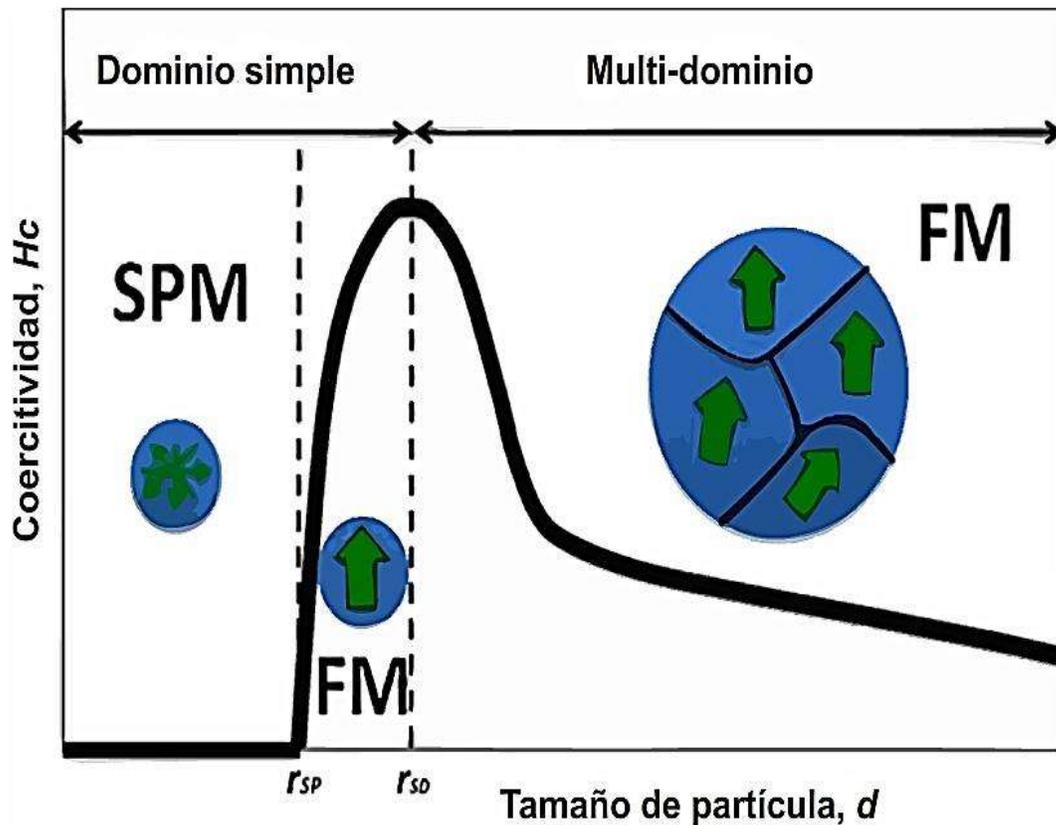


Fig. 5. Variación de la coercitividad (H_c) de nanopartículas magnéticas con el tamaño.

1.3. Magnetita.

La magnetita es un mineral ferrimagnético constituido por óxido ferroso-diférrico (Fe_3O_4) con fórmula química $\text{Fe}^{2+}(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_4$, uno de varios óxidos de hierro. El nombre IUPAC del producto químico es óxido de hierro (II, III) y su nombre común

es óxido ferroso férrico. La fórmula para magnetita también puede ser escrita como $\text{FeO}(\text{Fe}_2\text{O}_3)$, que es una parte de Wüstite (FeO) y una parte de hematita (Fe_2O_3). Esto se refiere a los estados de oxidación de las diferentes especies de hierro en una estructura, no en una solución. La temperatura de Curie de la magnetita es de 858 °K (585 °C, 1085 °F).

Es un mineral de color negro o marrón con un brillo metálico. Debe su nombre a la ciudad griega de *Magnesia*. Su fuerte magnetismo se debe a un fenómeno de ferrimagnetismo: los momentos magnéticos de los distintos cationes de hierro del sistema se encuentran fuertemente acoplados, por interacciones antiferromagnéticas, pero de forma tal que en cada celda unitaria resulta un momento magnético no compensado. La suma de estos momentos magnéticos no compensados, fuertemente acoplados entre sí, es la responsable de que la magnetita sea un imán.

1.3.1. Propiedades.

La magnetita es el mineral más magnético de todos los minerales que existen naturalmente en la Tierra. Trozos de magnetita naturalmente magnetizados, llamados piedra imán, atraían pequeños trozos de hierro, y así fue como los antiguos pobladores notaron por primera vez la propiedad del magnetismo. Magnetitas fueron utilizadas como una forma temprana de brújulas magnéticas. La magnetita normalmente forma parte de las rocas, por lo que ha sido una herramienta fundamental en el paleomagnetismo, una ciencia importante en el descubrimiento y comprensión de la tectónica de placas, además de los datos históricos para la magnetohidrodinámica y otros campos científicos. Las relaciones entre la magnetita y otros minerales ricos en óxidos de hierro como la ilmenita, hematita y ulvoespinela han sido muy estudiadas, así como las complicadas reacciones entre los minerales y el oxígeno influyen en el cómo y cuándo la magnetita conserva registros de los campos magnéticos de la Tierra.

La magnetita reacciona con el oxígeno para producir hematita. Por lo general, las rocas ígneas contienen los granos de dos soluciones sólidas, una entre magnetita y ulvoespinela, y la otra entre ilmenita y hematita. Las composiciones de los pares de minerales se utilizan para calcular la cantidad oxidante del magma (es decir, la fugacidad del oxígeno en el magma) y una serie de condiciones oxidantes se encuentran en los magmas y el estado de oxidación ayudan a determinar cómo podrían evolucionar los magmas por cristalización fraccionada.

1.3.2. Cristalinidad.

La magnetita (Fe_3O_4) ha atraído la atención como un material espintrónico particularmente interesante debido a su alta temperatura de Curie de 858 °K. A temperatura ambiente y presión atmosférica normal se cristaliza en una estructura de espín cúbica centrada en las caras, que se ilustra en la Fig. 6 (a). Curiosamente, esta es la única estructura de cristales de magnetita en la que se conocen con certeza las posiciones de los átomos. Cuando se enfría, la magnetita se somete a la transición Verwey alrededor de 122 °K, que se caracteriza por una fuerte caída en la conductividad en dos órdenes de magnitud que se acompaña de una distorsión del enrejado con menor simetría del espín cúbico.

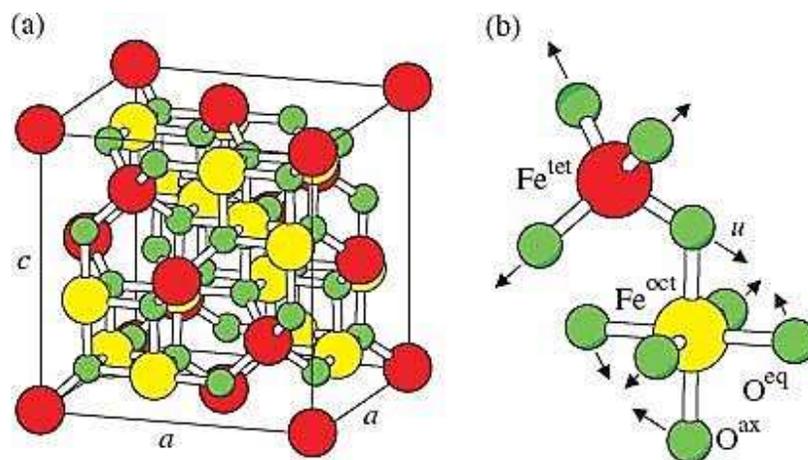


Fig. 6. (a) Estructura de espín cúbica centrada en las caras de la magnetita. (b) Ampliación de un tetraedro y un octaedro adyacentes que comparten un átomo de oxígeno. Grandes esferas marcadas por Fe^{tet} y Fe^{oct} representan los átomos de hierro en subredes tetraédricas y octaédricas

coordinadas, respectivamente. Los átomos de oxígeno se muestran como pequeñas esferas verdes. Los parámetros de red a en el plano (001) y c en la dirección perpendicular a él son idénticos en condiciones de equilibrio, pero difieren de los sistemas tetragonal. La simetría más baja en este caso también conduce a la distinción entre átomos (O^{eq} , O^{ax}) axial y ecuatorial. Las flechas indican las direcciones de desplazamiento de los átomos de oxígeno, desde sus posiciones ideales por un parámetro U interno > 0 (Lu, Salabas *et al.*, 2007).

1.4. Síntesis de nanopartículas magnéticas.

Las NPM han sido sintetizadas con un gran número de composiciones y fases, incluyendo óxidos de hierro como: Fe_3O_4 y $\gamma-Fe_2O_3$ (Neveu, Bee *et al.*, 2002; Sun Zeng, 2002), metales puros de Fe y Co (Park, Kim *et al.*, 2000), ferromagnetos como: $MgFe_2O_4$, $MnFe_2O_4$, y $CoFe_2O_4$, etc. (Chen, Rondinone *et al.*, 1999). En las últimas décadas, se han desarrollado muchas investigaciones para la síntesis de NPM, especialmente durante los últimos años, muchas publicaciones han descrito rutas eficientes en el control del tamaño y forma, alta estabilidad, y partículas monodispersas. Algunos de los métodos más populares incluyen:

- ~ Co-precipitación.
- ~ Descomposición y/o reducción térmica.
- ~ Microemulsión.
- ~ Síntesis hidrotérmica.

1.4.1. Método de co-precipitación.

El método de co-precipitación es una forma fácil y conveniente de sintetizar óxidos de hierro a partir de soluciones acuosas de sales de Fe^{2+}/Fe^{3+} por la adición de una base en condiciones inertes a temperatura ambiente o a elevadas temperaturas. El tamaño, forma y composición de las NPM depende mucho del tipo de sales utilizadas (cloruros, sulfatos, nitratos), la relación Fe^{2+}/Fe^{3+} , la temperatura de reacción, el pH y la fuerza iónica del medio. En esta síntesis, una vez que las condiciones han sido corregidas, la calidad de las NPM es altamente

reproducibles. La saturación magnética es determinada experimentalmente en un rango de 30-50 $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$, lo cual es bajo en comparación al de referencia que es de 90 $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$. Las NPM no son muy estables bajo condiciones normales, y son fácilmente oxidadas a maghemita. Desde que la maghemita se considera un ferrimagneto, la oxidación es el menor de los problemas. Por lo tanto, las NPM pueden ser sujetas a la oxidación deliberada para convertirlas en maghemita. Esta transformación se logra mediante la dispersión en medio ácido, además de nitrato de hierro (III). Las partículas de maghemita obtenidas son químicamente estables en medio ácido y alcalino.

Sin embargo, incluso si las partículas de magnetita se convierten en maghemita después de su formación inicial, el desafío experimental en la síntesis de Fe_3O_4 por co-precipitación se encuentra en el control del tamaño de partícula y, por lo tanto, lograr una distribución de tamaño de partícula estrecha. Puesto que la temperatura de bloqueo depende del tamaño de partícula, una distribución amplia en el tamaño de partícula dará lugar a una amplia gama de temperaturas de bloqueo, además de un comportamiento magnético no ideal para muchas aplicaciones. Las partículas preparadas por el método de co-precipitación por desgracia tienden a ser bastante polidispersas. Es bien sabido que la presencia de una breve explosión de nucleación y crecimiento controlado posterior son cruciales para producir partículas monodispersas. El control de estos procesos es la clave en la producción de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro monodispersas.

Recientemente, avances significativos en la preparación de nanopartículas de magnetita monodispersas, de diferentes tamaños, se han realizado mediante el uso de aditivos orgánicos como agentes de estabilización y/o reducción. Por ejemplo, las NPM con tamaños entre 4-10 nm pueden ser estabilizadas en solución acuosa al 1% p/v de PVAL. Sin embargo, cuando usamos PVAL el 0.1% molar de grupos carboxilos actúan como agentes estabilizantes, por lo que las nanopartículas de magnetita se obtienen en forma de racimos en agrupaciones de

precipitado (Lee, Isobe *et al.*, 1996). Este resultado indica que la selección del surfactante es un importante tema para la estabilización de las NPM.

Los efectos de algunos aniones orgánicos, como los carboxilatos y los iones hidroxilo, en la formación de óxidos de hierro u oxihidróxidos han sido estudiados ampliamente (Kandori, Kawashima *et al.*, 1992). Para la formación de complejos superficiales se requiere de ambos, grupos carboxi desprotonados así como grupos α -hidroxi desprotonados. Recientes estudios han mostrado que el ácido oleico es el mejor candidato para la estabilización de Fe_3O_4 (Willis, Turro *et al.*, 2005). El efecto de los iones orgánicos en la formación de óxidos metálicos u oxihidróxidos se puede racionalizar por dos mecanismo competitivos. La quelación de los iones metálicos puede impedir la nucleación y conducir a la formación de partículas más grandes porque el número de núcleos formado es pequeño y el sistema está dominado por partículas en crecimiento. Por otro lado, la adsorción de aditivos sobre los núcleos y el crecimiento de los cristales pueden inhibir el crecimiento de las partículas, lo que favorece la formación de unidades pequeñas.

1.4.2. Descomposición y/o reducción térmica.

Inspirado en la síntesis de nanocristales semiconductores de alta calidad y óxidos en medios no acuosos por descomposición térmica (Murray, Norris *et al.*, 1993; Peng, Wickham *et al.*, 1998), se han desarrollado métodos similares para la síntesis de NPM con control sobre la forma y tamaño. Nanocristales magnéticos monodispersos con un tamaño más pequeño pueden ser sintetizados a través de la descomposición térmica de compuestos organometálicos en disolventes orgánicos de alto punto de ebullición que contengan surfactantes como estabilizantes (Sun, Zeng *et al.*, 2003; Redl, Black *et al.*, 2004). Los ácidos grasos, el ácido oleico, y hexadecilamina a menudo se utilizan como surfactantes (Samia, Hyzer *et al.*, 2005). En principio, las proporciones de los reactivos de partida incluidos los compuestos organometálicos, surfactantes y solventes son los parámetros decisivos para el control del tamaño y la morfología de las NPM. La

temperatura y el tiempo de reacción, también pueden ser cruciales para el control preciso del tamaño y la morfología.

Si el metal en el precursor es cero valente, como en carbonilos, la descomposición térmica inicialmente conduce a la formación del metal, pero dos etapas del procedimiento pueden utilizarse para producir nanopartículas de óxido también. Por ejemplo, el pentacarbonilo de hierro se puede descomponer en una mezcla de octil éter y ácido oleico a 100 °C, la adición de óxido de trimetilamina $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$ como un oxidante suave a temperatura elevada, resulta en la formación de nanocristales monodispersos de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con un tamaño de aproximadamente 13 nm (Hyeon, Lee *et al.*, 2001). La descomposición de los precursores con los centros de metales catiónicos conduce directamente a los óxidos, es decir, Fe_3O_4 , si $[\text{Fe}(\text{acac})_3]$ se descompone en presencia de 1,2-hexadecanodiol, oleilamina, y ácido oleico en éter de fenol (Sun, Zeng *et al.*, 2003).

El método de descomposición térmica también se utiliza para preparar nanopartículas metálicas. La ventaja de las nanopartículas metálicas es su mayor magnetización en comparación con los óxidos metálicos, lo cual es especialmente interesante para los medios de almacenamiento de datos.

1.4.3. Microemulsión.

Una microemulsión es una dispersión isotrópica termodinámicamente estable de dos líquidos inmiscibles, donde se estabiliza el microdominio de uno o ambos líquidos por una película interfacial de moléculas surfactantes. En la microemulsión agua en aceite, la fase acuosa se dispersa como microgotas (10-50 nm de diámetro) rodeadas de una monocapa de moléculas de surfactante en la fase continua de hidrocarburos.

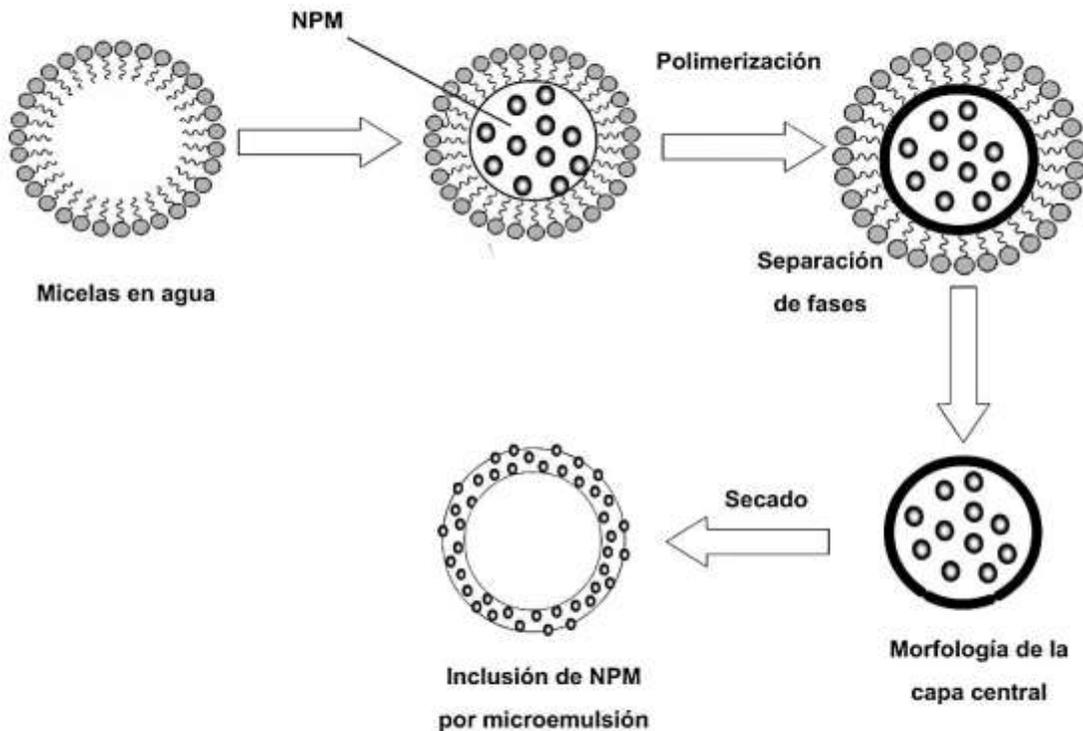


Fig. 7. Elaboración de NPM por microemulsión.

Al mezclar dos microemulsiones idénticas de agua en aceite en las que se contengan los reactivos, las microgotas continuamente chocan, se unen, se rompen de nuevo, y finalmente precipitan en forma de micelas. Por la adición de solventes, como acetona o etanol, a las microemulsiones, el precipitado puede ser extraído por filtración o centrifugación de la mezcla. En este sentido, una microemulsión puede ser utilizada como un nanoreactor para la formación de nanopartículas (Fig. 7).

Utilizando la técnica de microemulsión, las nanopartículas pueden ser preparadas como esferoides, pero también como una sección transversal rectangular o tubos. Aunque muchos tipos de nanopartículas magnéticas se han sintetizado de manera controlada usando el método de microemulsión, el tamaño de las partículas y las formas por lo general varían en un amplio rango relativo. Por otra parte, la ventana

de trabajo para la síntesis de microemulsiones suele ser bastante estrecha y el rendimiento de las nanopartículas es bajo en comparación con otros métodos, tales como la descomposición térmica y co-precipitación. Grandes cantidades de disolvente son necesarias para sintetizar cantidades apreciables de material. Por ello no es un proceso muy eficiente ni sencillo de escalar (Lu, Salabas *et al.*, 2007).

1.4.4. Síntesis hidrotérmica.

Recientemente se reportó un método generalizado para sintetizar una variedad de diferentes nanocristales por una reacción líquido-sólido-solución (Figuerola, Di Corato *et al.*, 2010). El sistema consta de linoleato del metal (sólido), una fase de ácido linoléico (líquido), y una solución de agua-etanol a diferentes temperaturas de reacción en condiciones hidrotérmicas. Esta estrategia se basa en una transferencia de fase y el mecanismo de separación que ocurre en las interfaces entre un líquido y un sólido, y la solución presente durante la síntesis. En este método se utilizan habitualmente las mezclas de reacción de varios componentes, incluyendo el etilenglicol, acetato de sodio y polietilenglicol, para dirigir la síntesis. El etilenglicol se utiliza como agente reductor del punto de ebullición, lo cual era conocido del proceso de poliol para producir nanopartículas monodispersas del metal o de óxidos metálicos; el acetato de sodio como estabilizador electrostático para prevenir la aglomeración de las partículas; y el polietilenglicol como surfactante contra la aglomeración de las partículas (Tartaj, Morales *et al.*, 2005).

1.4.5. Ventajas y desventajas.

Las ventajas y desventajas de los cuatro métodos de síntesis se resumen brevemente en la Tabla 1. En cuanto a la simplicidad de la síntesis, la co-precipitación es la ruta preferida. En términos de control de tamaño y morfología de las nanopartículas, la descomposición térmica parece el mejor método desarrollado hasta la fecha. Como alternativa, las microemulsiones también

pueden ser utilizadas para sintetizar nanopartículas monodispersas con diversas morfologías. Sin embargo, este método requiere una gran cantidad de disolvente. La síntesis hidrotérmica es un método relativamente poco explorado para la síntesis de nanopartículas magnéticas, aunque permite la síntesis de nanopartículas de alta calidad. Hasta la fecha, las NPM preparadas a partir de co-precipitación y descomposición térmica son los métodos mejor estudiados y se pueden preparar a gran escala.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los métodos de síntesis de NPM (Lu, Salabas *et al.*, 2007).

Método de síntesis	Síntesis	Temperatura de reacción (°C)	Solvente	Distribución de tamaño	Control de forma	Rendimiento
Co-precipitación	Muy simple, condiciones ambientales, atmósfera inerte, minutos.	20-90	Agua	Relativamente estrecha	Bueno	Alto-escalable
Descomposición térmica	Complicado, atmósfera inerte, horas-días.	100-320	Compuestos orgánicos	Muy estrecha	Muy bueno	Alto-escalable
Microemulsión	Complicado, condiciones ambientales, horas.	20-50	Compuestos orgánicos.	Relativamente estrecha	Bueno	Bajo
Síntesis hidrotérmica	Simple, altas presiones, horas-días.	>220	Agua-etanol	Muy estrecha	Muy bueno	Medio

La estabilidad coloidal de las NPM sintetizadas por los métodos antes mencionados, ya sea por repulsión estérica o electrostática, depende de los estabilizadores, tales como ácidos grasos o aminas y la polaridad del disolvente utilizado. Por ejemplo, las nanopartículas de magnetita sintetizadas a través de co-precipitación fueron estabilizadas por fuerzas de repulsión electrostática, porque las partículas tienen carga positiva (Bee, Massart *et al.*, 1995). Sin embargo, las

nanopartículas sintetizadas por descomposición térmica son, en general, estéricamente estabilizadas en un disolvente orgánico por ácidos grasos o surfactante (Sun Zeng, 2002).

1.5. Protección y estabilización de nanopartículas magnéticas.

Aunque ha habido muchos acontecimientos importantes en la síntesis de nanopartículas magnéticas, el mantenimiento de la estabilidad de estas partículas durante mucho tiempo sin aglomeración o precipitación es una cuestión importante. La estabilidad es un requisito fundamental para casi cualquier aplicación de nanopartículas magnéticas, especialmente los metales puros, como el Fe, Co y Ni y sus aleaciones, los cuales son muy sensibles al aire. Por lo tanto, la principal dificultad para el uso de metales puros o aleaciones surge de su inestabilidad frente a la oxidación con el aire, y la susceptibilidad a la oxidación se hace más alta cuanto más pequeñas son las partículas. Por lo tanto, es necesario desarrollar estrategias eficaces para mejorar la estabilidad química de nanopartículas magnéticas. El método más sencillo parece ser la protección con una capa que es impenetrable, de modo que el oxígeno no pueda llegar a la superficie de las partículas magnéticas (Fig. 8). A menudo, la estabilización y protección de las partículas están estrechamente vinculadas entre sí.

Todas las estrategias de protección dan como resultado nanopartículas magnéticas con una estructura base en la superficie, es decir, la nanopartícula magnética está cubierta por una concha para aislar el núcleo contra el medio ambiente.

Como alternativa, las nanopartículas magnéticas también se pueden dispersar en una matriz densa, por lo general en polímeros, sílice o carbono, para formar compuestos, que también impidan, o al menos minimicen, la aglomeración y la oxidación. Sin embargo, las nanopartículas se fijan en el espacio una con respecto a la otra, lo que a menudo no se desea. Por el contrario, los nanocristales

protegidos individualmente son libremente dispersables y estables en una variedad de medios debido a la protección que les rodea.

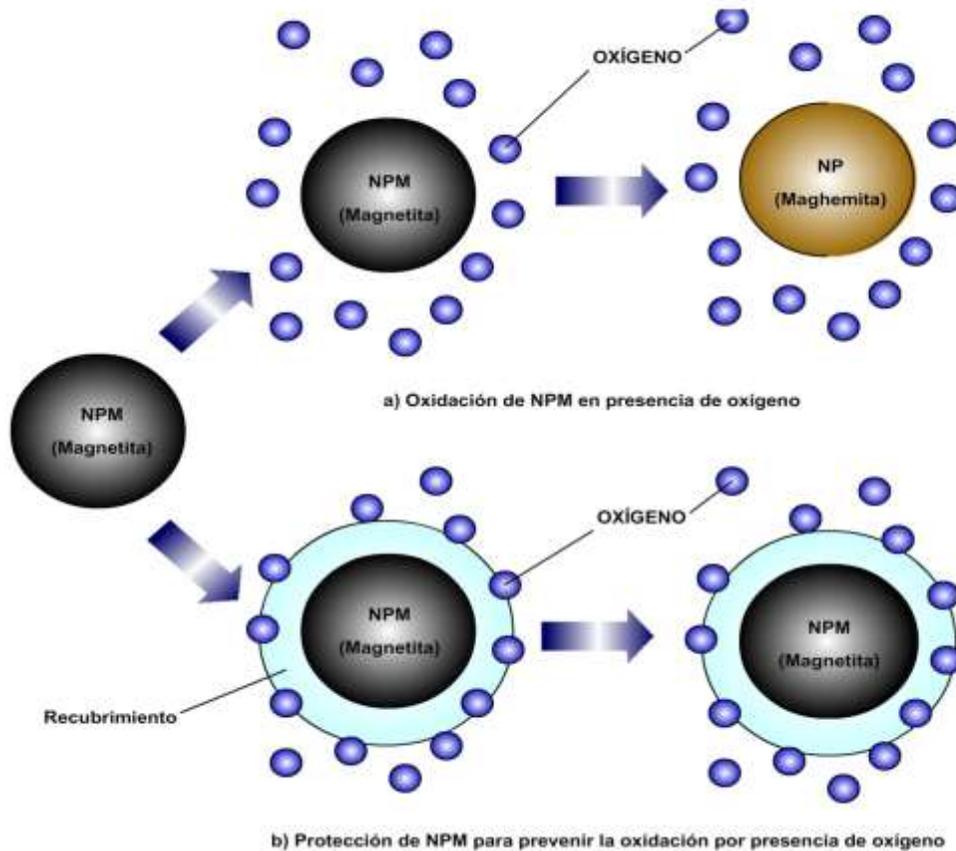


Fig. 8. Esquema representativo de la oxidación de NPM en presencia de oxígeno (a), así como la prevención de tal fenómeno por la protección de las NPM mediante la incorporación de un recubrimiento protector (b).

1.5.1. Pasivación superficial por oxidación moderada.

Un enfoque muy simple para proteger a las partículas magnéticas es inducir a una oxidación controlada de un núcleo del metal puro, una técnica muy conocida es la pasivación de catalizadores sensibles al aire. Esta oxidación se puede conseguir por varios métodos. El control de la capa de óxido, que tiene un alto impacto en el intercambio de sistemas parciales, así como en un espesor bien definido del núcleo ferromagnético y la capa antiferromagnética son deseables. Por otra parte,

la correlación directa de la estructura y el magnetismo en las partículas pequeñas puede ser determinante.

1.5.2. Surfactante y recubrimiento polimérico.

Los surfactantes o polímeros se emplean a menudo para neutralizar la superficie de las nanopartículas durante o después de la síntesis para evitar la aglomeración. En general, la repulsión electrostática o repulsión estérica se puede utilizar para dispersar las nanopartículas y mantenerlas en un estado coloidal estable. Para ejemplo, las nanopartículas de magnetita sintetizada a través de la co-precipitación de Fe^{2+} y Fe^{3+} en soluciones de amoníaco o NaOH son generalmente cargadas negativamente, lo que resulta en la aglomeración.

En general, los surfactantes o polímeros pueden ser anclados químicamente o físicamente adsorbidos en nanopartículas magnéticas para formar una capa simple o doble, que crea fuerzas de repulsión (principalmente repulsión estérica) para equilibrar las fuerzas electromagnéticas y de van der Waals atractivas que actúan sobre las nanopartículas. Por lo tanto, por la repulsión estérica, las partículas magnéticas se estabilizan en suspensión. Los polímeros que contienen grupos funcionales, tales como ácidos carboxílicos, fosfatos y sulfatos, se pueden unir a la superficie de la magnetita (Fig. 9). Algunos polímeros adecuados para el revestimiento incluyen polipirrol, polianilina, polimetiliden malonato, y los poliésteres, como el ácido poli(láctico), ácido poliglicólico, poli- ϵ -caprolactona y sus copolímeros. Al modificar la superficie de las nanopartículas magnéticas con ciertos polímeros biocompatibles se pretende estudiar la posibilidad de emplearlos como acarreadores de fármacos dirigidos magnéticamente y como agentes de contraste para resonancia magnética (Yang, Park *et al.*, 2006).

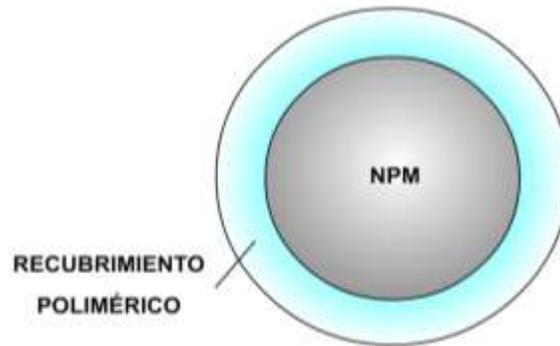
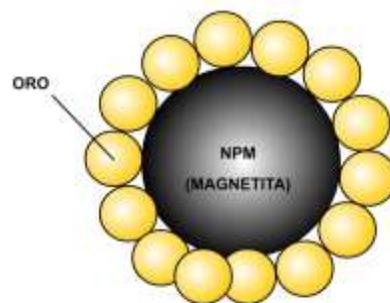


Fig. 9. Recubrimiento polimérico de NPM.

1.5.3. Revestimiento de metales preciosos.

Los metales preciosos se pueden depositar en nanopartículas magnéticas a través de reacciones de microemulsión, transmetalación redox u otros métodos, para proteger las partículas contra la oxidación. Estas partículas son estables al aire y se pueden dispersar en disolventes orgánicos típicos. El oro parece ser una capa ideal debido a su baja reactividad. Sin embargo, se encontró que el recubrimiento directo de partículas magnéticas con oro es muy difícil, debido a la naturaleza diferente de las dos superficies. Los avances realizados recientemente han resultado en la síntesis de nanopartículas de hierro recubiertas por oro con un tamaño de alrededor de 11 nm y una capa de oro de 2-5 nm de espesor (Fig. 10). Estas partículas de hierro recubiertas de oro son estables bajo condiciones acuosas neutras y ácidas. El recubrimiento se logró mediante una reacción de sustitución parcial en un disolvente aprótico polar (Lu, Salabas *et al.*, 2007).



Protección de NPM por partículas de oro

Fig. 10. Recubrimiento de NPM con metales preciosos de oro.

1.5.4. Recubrimiento de sílice.

Una cubierta de sílice no sólo protege a los centros magnéticos, sino también puede evitar el contacto directo del núcleo magnético con agentes adicionales vinculados a la superficie de la sílice evitando así las interacciones no deseadas. Los recubrimientos de sílice tienen varias ventajas derivadas de su estabilidad en condiciones acuosas (por lo menos si el pH es suficientemente bajo) por su fácil modificación de superficie como un fácil control de las interacciones entre partículas, tanto en la solución y dentro de las estructuras, a través de la variación del grosor de la cáscara (Fig. 11). Sin embargo, la sílice es inestable en condiciones básicas, además, la sílice puede contener poros a través de los cuales el oxígeno u otras especies podrían difundir.

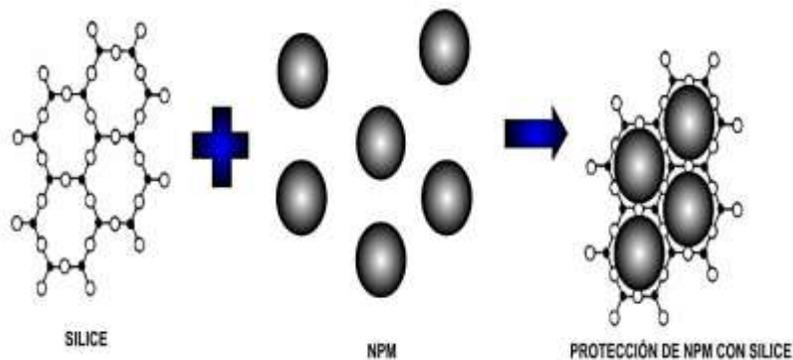


Fig. 11. Esquema representativo de una protección con sílice.

1.5.5. Revestimiento de carbono.

Inmediatamente después del descubrimiento de los fullerenos, se constató que los metales carbono-encapsulados o carburo de nanocristales de metal pueden ser generados por el proceso de Kretschmer (Figuerola, Di Corato *et al.*, 2010). Desde entonces, muchos estudios han demostrado que en presencia de nanopartículas de metales (Co, Fe, Ni, Cr, Au, etc.), las estructuras del carbono grafito, como los nanotubos de carbono y las ciclodextrinas, se forman por la ablación por láser y la irradiación de electrones. Las capas de grafito bien desarrolladas ofrecen una

barrera efectiva contra la erosión y la oxidación. Estos hechos indican que es posible sintetizar nanopartículas magnéticas recubiertas de carbono, que son térmicamente estables y tienen una alta estabilidad contra la oxidación y lixiviación ácida, que es crucial para algunos (Lu, Salabas *et al.*, 2007).

1.6. Funcionalización y Biocompatibilidad de las NPM.

1.6.1. Funcionalización.

Como se mencionó anteriormente, una cubierta protectora no sólo sirve para proteger a las nanopartículas magnéticas contra la degradación, sino también se puede utilizar para funcionalizar con ciertos componentes específicos, como las especies catalíticamente activas, diversos fármacos, sitios de unión específicos u otros grupos funcionales. La separación fácil y la colocación controlada de las nanopartículas magnéticas funcionalizadas por medio de un campo magnético externo permiten su aplicación como soportes de catalizadores, en los procesos de enzima inmovilizada y la construcción de sistemas bio-electrocatalíticos magnético-controlables (Fig. 12) (Dias, Hussain *et al.*, 2011).

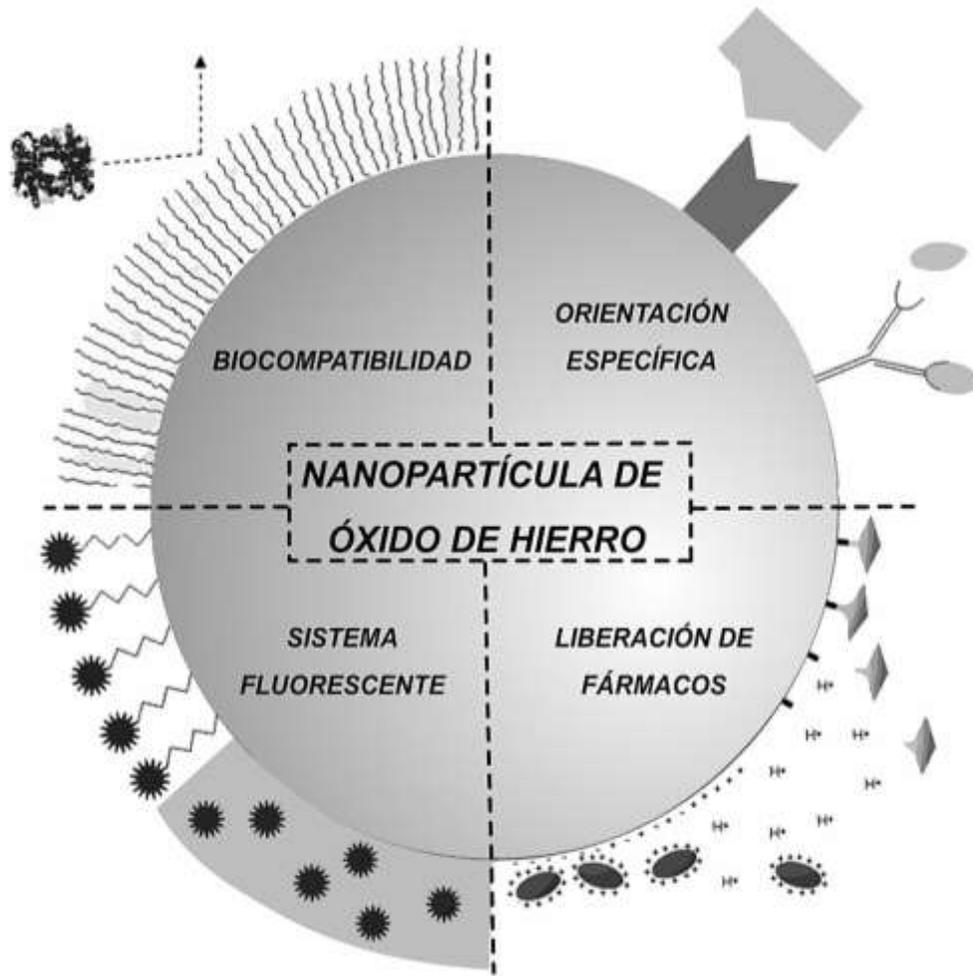


Fig. 12. Información general de las posibles modificaciones en la superficie de las nanopartículas de óxido de hierro. La superficie está recubierta con polímeros anfífilos o de lucha contra la contaminación biológica para mejorar la biocompatibilidad de las nanopartículas y aumentar el tiempo de circulación de la sangre (superior izquierda); ligandos específicos o anticuerpos que pueden fijarse en la superficie para desarrollar un sistema de objetivo activo específico (parte superior derecha), con el fin de obtener compuestos de imágenes multimodales magnéticos fluorescentes, llamados fluoróforos orgánicos, los cuales pueden estar conjugados en la superficie de las nanopartículas a través de moléculas espaciador o que se pueden incluir en una carcasa protectora (inferior izquierda); agentes terapéuticos pueden estar asociados a la superficie de las nanopartículas a través de interacciones electrostática o por enlaces covalentes, la liberación que responde a los estímulos puede ser operada por un cambio en el pH o por la acción enzimática (inferior derecha) (Dias, Hussain *et al.*, 2011)

1.6.2. Biocompatibilidad de las nanopartículas de óxido de hierro.

Cuando una nanopartícula se introduce en el cuerpo, varios aspectos pueden poner en peligro su estabilidad. En primer lugar, fisiológicamente el medio tiene diferente fuerza iónica en comparación con el agua ultra pura utilizada principalmente en los laboratorios: con el aumento de la fuerza iónica de la solución suprimirá la doble capa eléctrica alrededor de las partículas cargadas, lo que resulta en una acumulación parcial o total del sistema. Un comportamiento similar se puede observar por las partículas una vez que entran a un compartimento específico del cuerpo, debido a una variación en el pH con respecto al medio en el que las nanopartículas son inicialmente dispersadas. Además, cuando las nanopartículas se inyectan en la sangre, ocurre una adsorción no específica por medio de las proteínas del plasma en la superficie de las nanopartículas. Este fenómeno, conocido como opsonización, es más notorio en las partículas de tamaño nanométrico, debido a dos efectos principales: la alta proporción de superficie-volumen, así como las fuerzas de atracción entre las nanopartículas magnéticas. Cuando este fenómeno se produce, se observa una rápida depuración de las nanopartículas (Lu, Salabas *et al.*, 2007).

Para evitar tales efectos, varios polímeros sintéticos y naturales, incluyendo dextran, los polietilenglicoles y la polivinilpirrolidona (PVP), se han introducido a la superficie de las nanopartículas. Estas moléculas del polímero se han empleado para recubrir nanopartículas preformadas de óxido de hierro preparadas por métodos no hidrolíticos o en ocasiones como estabilizadores durante la síntesis a través de métodos convencionales de co-precipitación.

La presencia de una capa de polímero estable a menudo mejora la biocompatibilidad a largo plazo de los sistemas basados en óxido de hierro. Esta característica hace que las nanopartículas de óxido de hierro sean adecuadas para el seguimiento de los experimentos que requieren monitoreo y la proyección

de imagen de hierro en células por largos periodos (Figuerola, Di Corato *et al.*, 2010).

1.7. Aplicaciones biomédicas de NPM.

El diseño de nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas impone varias restricciones. Como se ha descrito, además de requerir de alta calidad en las propiedades magnéticas, con el fin de obtener el máximo efecto con la dosis mínima aplicada (para el diagnóstico y tratamiento) se requiere tener bajo control: el tamaño de las nanopartículas en general, la composición, la estabilidad coloidal y funcionalización de superficie. Las nanopartículas de óxido de hierro sintetizadas por métodos no hidrolíticos han ampliado la gama de las nanopartículas para aplicaciones biológicas, pero el uso de estos compuestos en la medicina se ha enfrentado a nuevos aspectos cruciales. El carácter no soluble en agua de las nanopartículas magnéticas preparadas por esta síntesis ha requerido más modificaciones químicas de la superficie de las nanopartículas con el fin de garantizar la seguridad y la buena dispersabilidad en medios acuosos (Mahmoudi, Sant *et al.*, 2010).

1.7.1. Orientación específica de las nanopartículas de óxido de hierro.

Teniendo en cuenta el tamaño y la superficie, las nanopartículas de óxido de hierro pueden dirigirse a un tumor por orientación pasiva y activa. El primer modo se basa en la acumulación de nanopartículas en los tejidos tumorales gracias a las estructuras vasculares con fugas y poros del sistema sanguíneo capilar en la región del tumor. Esta mayor permeabilidad en el sitio del tumor, acompañado por un efecto de retención debido al pobre drenaje linfático, ha sido explotada para la entrega de los diferentes sistemas de principios activos, incluidas algunas formulaciones a base de óxido de hierro.

El objetivo hacia el tumor se basa en la funcionalización de la superficie de las nanopartículas con un ligando de alta especificidad hacia las células cancerosas. Diferentes proteínas, antígenos, péptidos y vitaminas se han unido en la superficie de las nanopartículas y estudios *in vitro* realizados con estas nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas han demostrado una mejor absorción en comparación con las nanopartículas no-funcionalizadas (Figueroa, Di Corato *et al.*, 2010).

1.7.2. Nanopartículas de óxido de hierro como sistemas de administración inteligente de fármacos.

Una de las aplicaciones de las NPM es la entrega de fármacos gracias al tamaño pequeño de las nanopartículas de óxido de hierro y, por lo tanto, la disponibilidad de una gran superficie junto con la posibilidad de dirigirlas a través de campos magnéticos; convierte a las NPM en sistemas funcionales para la entrega de agentes terapéuticos. Fármacos y moléculas de genes se han administrado a través de las nanopartículas de óxido de hierro.

Cuando la interacción electrostática se proyecta a través de una variación en el pH del medio circundante, las moléculas de fármacos son puestas en libertad. Este principio ha sido aprovechado para lograr una liberación de doxorubicina en el ataque de los tumores cancerosos. El análisis *in vivo* por imágenes por resonancia magnética (IRM) y la caracterización de órganos extirpados de animales, en comparación con la administración de doxorubicina libre, revelaron una regresión del tumor, sin ningún tipo de toxicidad sistémica típica de este medicamento contra el cáncer (Fan, Gao *et al.*, 2011).

1.7.3. IRM y US basada en compuestos de óxido de hierro.

En principio, el uso de un agente de contraste para IRM permitiría la captura de la situación del paciente en una etapa pre-quirúrgica, mientras el código óptico

representaría una guía adecuada para lograr una mayor resolución espacial durante la cirugía. Trabajos anteriores han demostrado este potencial de las nanopartículas de óxido de hierro magnético. Distintos tipos de moléculas de colorante se hayan adheridas a la superficie de las nanopartículas (cianinas, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas, oligotiofenos, porfirinas, etc.), que emiten tanto en el rango visible (por lo tanto conveniente para la proyección de imagen en células *in vitro*) como en la región del infrarrojo cercano (adecuado para el estudio *in vivo*).

Un problema común basado en la unión de una molécula de colorante en la superficie de las nanopartículas es el enfriamiento sustancial de fluorescencia del colorante causado por los fenómenos de transferencia de energía entre el óxido de hierro y el colorante. Para superar este problema, el encapsulamiento de las moléculas de colorante en una cubierta polimérica o dentro de una cubierta de sílice permite ajustar la distancia entre las nanopartículas y los colorantes, y por lo tanto, ayudar a preservar la función óptica del colorante. Por otra parte, la utilización de moléculas como el espaciador polietilenglicol es también eficaz en el distanciamiento de los restos fluorescentes en la superficie de las nanopartículas de óxido de hierro.

Sistemas alternativos multimodales de óxido de hierro para resonancia magnética y las técnicas de obtención de imágenes han sido reportados recientemente. Se han descrito sistemas de doble proyección de imagen a base de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con PEG y funcionalizadas con un anticuerpo monoclonal que se radiomarca con I^{125} (Mahmoudi, Sant *et al.*, 2010).

1.7.4. Nanopartículas de óxido de hierro como agentes de contraste.

En años recientes, la funcionalización de las nanopartículas de óxido de hierro ha incrementado drásticamente sus posibles aplicaciones dentro del área clínica y de medicina humana, estas partículas han desempeñado un papel muy importante en

el uso de ferrofluidos como agentes de contraste en resonancia magnética diagnóstica, los cuales son utilizados rutinariamente dentro del campo del diagnóstico. Además, se han realizado avances usando nanopartículas de óxido de hierro en estudios clínicos de terapia contra el cáncer en medicina veterinaria y humana, atacando tumores sólidos con campos magnéticos externos (Neuberger, Schöpf *et al.*, 2005), pero con algunos efectos adversos, como hipertermia, necrosis tisular e incluso la muerte.

1.8. Métodos de preparación de NPP.

Los métodos de preparación de NPP pueden ser clasificados en dos grandes categorías: polimerización y emulsión de monómeros o dispersión de un polímero preformado. Los métodos de preparación de NPP a partir de polímeros preformados pueden ser clasificados en cuatro grupos:

- a) emulsificación-evaporación.
- b) “*salting out*”
- c) desplazamiento de solvente
- d) emulsificación-difusión.

Estas técnicas son similares en el sentido que involucran una solución orgánica que contiene los componentes de las NP's y que funcionan como una fase interna durante la preparación, y una solución acuosa que contiene un estabilizante y que constituye el medio de dispersión de las NP's (Quintanar-Guerrero, Allemann *et al.*, 1998).

1.8.1. Método de emulsificación-difusión.

Las NPP se obtuvieron mediante un nuevo proceso basado en una técnica de emulsificación-difusión involucrando la participación de solventes parcialmente miscibles en agua. El método de preparación consiste en emulsionar una solución

orgánica de polímero (saturado con agua) en una solución acuosa de un agente estabilizador (saturado con solvente) utilizando agitadores convencionales, seguido por una destilación directa del disolvente. La técnica se basa en el desplazamiento rápido del disolvente de la fase interna a la externa lo que provoca la agregación del polímero. Se cree que la formación de nanopartículas ocurre debido a la rápida difusión del disolvente produciendo regiones de sobresaturación cerca de la interfaz, donde las nanopartículas se forman debido a la transformación interfacial y la agregación de polímero que se produce en estas áreas de interface. El uso de este método permite preparar pseudolatexes de polímeros biodegradables y no biodegradables tales como ácido poli(D, L-láctico) y policaprolactona, Eudragit E[®] en acetato de celulosa con acetato etílico o 2-butanona parcialmente soluble en agua y disolventes de alcohol polivinílico o poloxámero 407 como agente estabilizador (Quintanar-Guerrero, Allemann *et al.*, 1999).

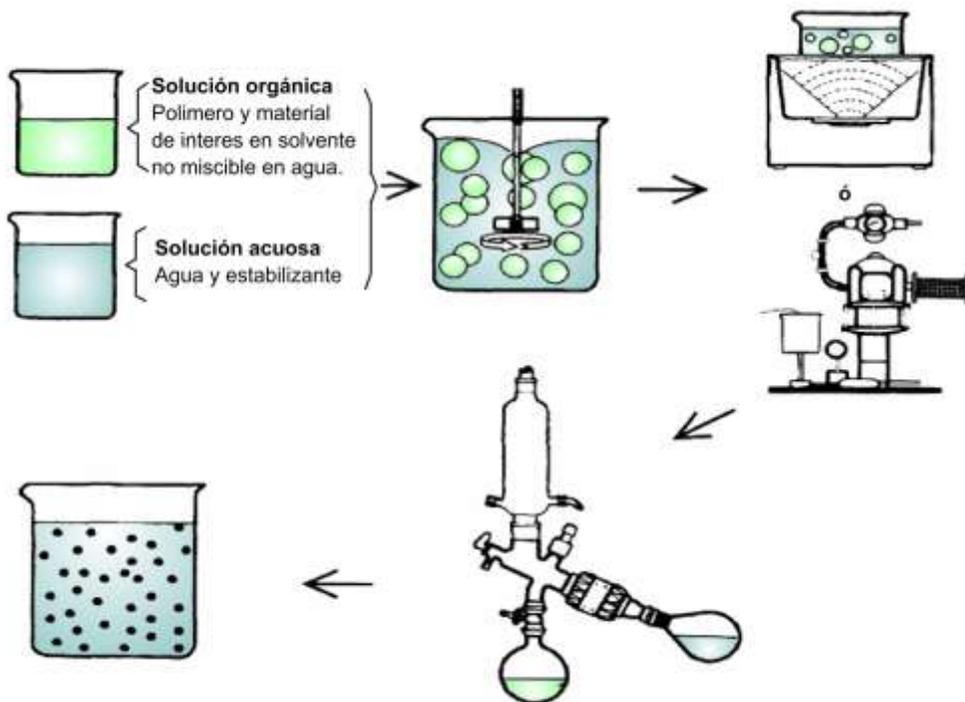


Fig. 13. Representación esquemática de la preparación de NPP por el método de emulsión-difusión por desplazamiento directo del disolvente.

1.9. Tendencia actual.

Actualmente, una de las áreas de mayor desarrollo dentro de las aplicaciones de las nanopartículas de óxido de hierro, es sin duda, el uso como agentes de contraste dentro de la medicina diagnóstica y como acarreadores de fármacos. Hoy en día se busca potencializar el empleo de estos agentes, mediante la inclusión de partículas magnéticas dentro de la matriz polimérica, con el fin de obtener agentes de contraste duales para aumentar la posibilidad de detectar una propiedad, ecogenicidad o electromagnetismo, en la obtención de imágenes por resonancia magnética y ultrasonido (Yang, Li *et al.*, 2009). Para la obtención de dichos sistemas es importante considerar la forma correcta de preparar microesferas estables (Liu, Yang *et al.*, 2006) y la inclusión de dichas nanopartículas en matrices poliméricas que formen parte de dichas micropartículas (Khan, 2008).

La obtención de agentes de contraste duales, en los cuales las nanopartículas de óxido de hierro son embebidas en las microburbujas gaseosas, potencialmente pueden convertirse en un efectivo método de diagnóstico por contraste en la obtención de imágenes por resonancia magnética y ultrasonido (Yang, Li *et al.*, 2009).

III. OBJETIVOS

1. Objetivo general

❖ Desarrollar y optimizar el método para sintetizar nanopartículas magnéticas (NPM) de Fe_3O_4 , para su posterior caracterización e inclusión en nanopartículas poliméricas (NPP), para su posible implementación en sistemas con aplicaciones biomédicas.

2. Objetivos particulares

❖ Desarrollar y optimizar el método de síntesis de NPM de Fe_3O_4 , con la finalidad de obtener nanopartículas de un tamaño entre 10-100 nm.

❖ Caracterizar las NPM obtenidas en: identidad, tamaño, forma y magneticidad.

❖ Funcionalizar las NPM mediante la adición de ácido oleico en su superficie, para favorecer su posterior inclusión en las NPP.

❖ Incluir las NPM dentro de la matriz polimérica de NPP, preparadas mediante el método de emulsificación-difusión por desplazamiento directo del disolvente.

❖ Determinar la cantidad de Fe_3O_4 incluida en las NPP mediante la cuantificación espectrofotométrica de un complejo colorido de Fe^{2+} y 1,10-Fenantrolina.

IV. MATERIALES Y EQUIPOS

❖ Polímeros y surfactantes

- Alcohol Polivinílico (PVAL), Mowiol® 4-88; Glomarza, México.
- Ácido poli(láctico co-glicólico) (PLGA) 50:50, Lakeshore Biomaterials®; Brookwood Pharmaceuticals, EUA.

❖ Reactivos

- Cloruro Férrico Hexahidratado ACS; Fermont, México.
- Cloruro Ferroso Tetrahidratado; J.T. Baker, México.
- Hidróxido de Amonio ACS; Fermont, México.
- Citrato de Sodio; J.T. Baker, México.
- Ácido Sulfúrico Concentrado; Fermont, México.
- Ácido Oleico puro; Droguería Cosmopolita, México.
- 1,10-fenantrolina monohidratada; Sigma-Aldrich, EUA.
- Clorhidrato de Hidroxilamina; Sigma-Aldrich, EUA.
- Acetato de Sodio; J.T. Baker, México.
- Sulfato Ferroso Amoniacal Hexahidratado; Sigma-Aldrich, EUA.

❖ Solventes

- Agua desionizada; Milli-Q®, Francia.
- Cloroformo GR; Fermont, México.
- Acetato de Etilo GR; Reactivos Analíticos, México.

❖ Equipos e instrumentos

- Balanza Analítica; Boeco[®] BBC32, Alemania.
- Ultrasonicador; Brasonic[®] Branson 3200, EUA.
- Microscopio Electrónico de Transmisión; JEOL[®] JEM-2010, Japón.
- Contador Submicrónico de Partículas; Nanosizer[®] N4Plus, Coulter, EUA.
- Parrilla Eléctrica con Agitación; Cimarec[®], Thermoline, EUA.
- Rotavapor, Laborota[®] 4000, Heidolph, Alemania.
- Ultracentrífuga, Optima[®] LE-80K, Beckman, EUA.
- Espectrofotómetro UV/Vis; Cary[®] UV 500, Varian, Australia.
- Agitador Mecánico; Ultraturrax[®], IKA, EUA.
- Difractómetro de Rayos X para polvos; Siemens[®] D5000, EUA.
- Mufla; Blue M[®] M15A-2A, Electric Company, EUA.
- Agitador mecánico de velocidad variable, Caframo; Heidolph[®] RZR 1, Alemania.
- Magnetómetro de gradiente de campo alternado; MicroMag[®] 2900, Alemania.
- Medidor de susceptibilidad magnética; KappaBridge[®] KLY3, EUA.

❖ Gases

- Nitrógeno

V. METODOLOGÍA

El siguiente diagrama muestra el resumen de la metodología experimental en este trabajo.

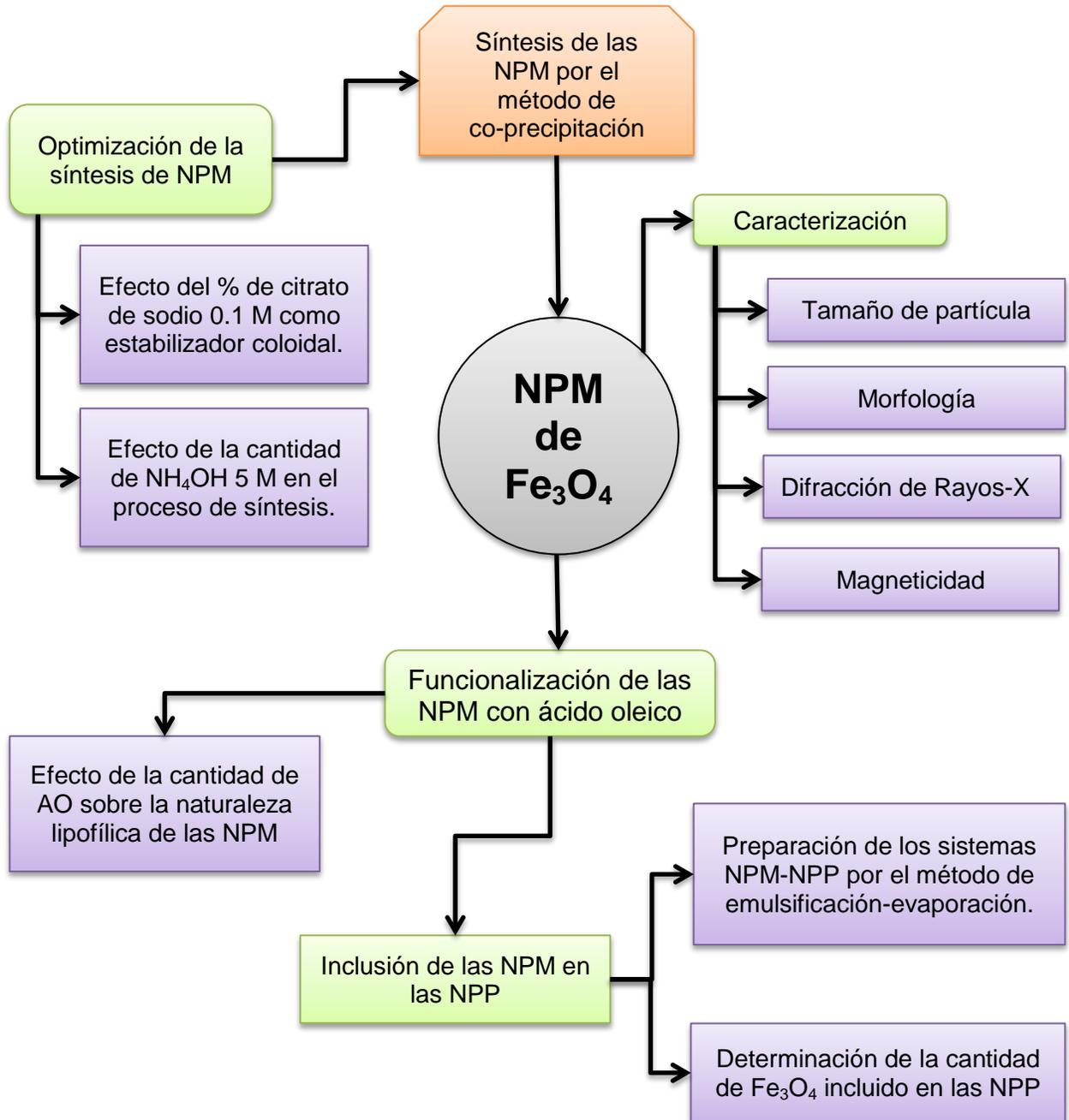


Fig. 14. Diagrama de flujo experimental.

1. Síntesis de las NPM por el método de co-precipitación.

Se sintetizaron NPM de Fe_3O_4 por el método de co-precipitación. Para la elaboración de las nanopartículas se utilizaron dos sales de Fe ($\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en una proporción molar 2:1, las sales fueron puestas dentro de un reactor en atmósfera libre de oxígeno lograda por medio del burbujeo continuo con nitrógeno. La mezcla se agitó de manera constante a 1800 rpm a una temperatura de $70 \pm 5^\circ\text{C}$, posteriormente se adicionó una solución de NH_4OH 5 M, hasta un pH cercano a 9.

La reacción se llevó a cabo en presencia de citrato de sodio 0.1 M utilizado como agente estabilizante para prevenir la agregación entre las partículas e hidrato de hidrazina para prevenir la pronta oxidación de las partículas por la eliminación del oxígeno remanente en el medio, además de garantizar una conservación de la atmósfera de nitrógeno y como co-precipitante para obtener Fe_3O_4 (Hong, Li *et al.*, 2008) (Fig. 15).

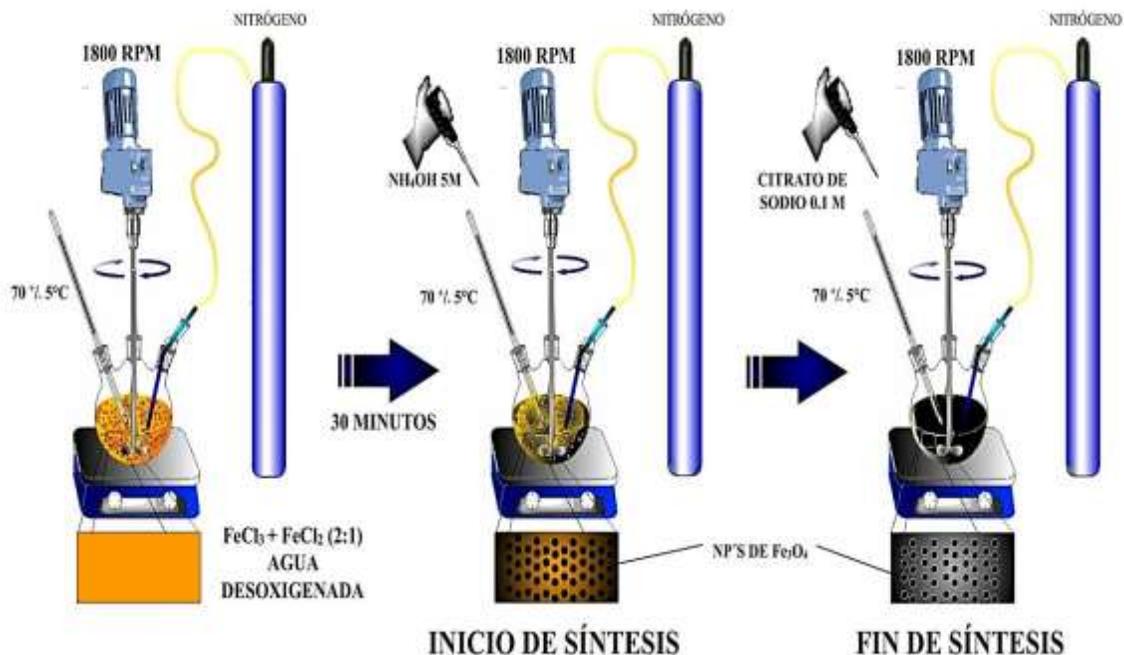


Fig. 15. Esquemización del proceso de síntesis de NPM.

1.1. Efecto del % de citrato de sodio como estabilizador coloidal.

Se determinó el efecto de la cantidad de citrato de sodio en la prevención de la agregación entre las partículas de hierro. Para la realización de esta prueba se utilizó una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0625 M y $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0315 M con una relación molar 2:1 a las mismas condiciones de síntesis; 70 ± 5 °C, 1800 RPM y atmósfera libre de oxígeno, variando el porcentaje de citrato de sodio 0.1M con respecto a la relación molar total de Fe en un 5, 10, 15, 25, 30 % como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Evaluación del efecto del % de Citrato de sodio en la síntesis de NPM.

REACTIVO	CANTIDADES DE REACTIVO POR SISTEMA				
	1	2	3	4	5
Fe (II)/Fe (III)*	10/10 mL	10/10 mL	10/10 mL	10/10 mL	10/10 mL
Agua	30 mL	30 mL	30 mL	30 mL	30 mL
NH_4OH 5 M	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Cit. de Na 0.1 M	2.35 mL	4.7 mL	7.05 mL	11.75 mL	14.1 mL
Temperatura	70 ± 5 °C	70 ± 5 °C	70 ± 5 °C	70 ± 5 °C	70 ± 5 °C
Agitación	1800 RPM	1800 RPM	1800 RPM	1800 RPM	1800 RPM

*La relación molar total de Fe es de 0.0047 moles por sistema.

Cada sistema es evaluado en tamaño y aspecto para determinar el efecto que tiene el Citrato de Sodio sobre las partículas obtenidas.

1.2. Efecto de la cantidad de NH_4OH 5 M en el tamaño y aspecto de las NPM.

Otro de los factores importantes a controlar durante el proceso de síntesis es la concentración de la base empleada como agente precipitante. Para este caso sólo se evaluó el efecto de la cantidad de NH_4OH a una concentración de 5 M. Para determinar la cantidad óptima de base necesaria en la síntesis de NPM se adicionaron cantidades de 5 ml en intervalos de 2 minutos tomando una muestra de 1 mL después de cada adición de NH_4OH , a las condiciones de $70 \pm 5^\circ\text{C}$, 1800 RPM y atmósfera de N_2 .

En esta prueba se evaluó tanto el tamaño como el aspecto y oxidación de las NPM en cada una de las adiciones de la base.

2. Caracterización.

2.1. Tamaño de partícula.

La determinación del tamaño de las NPM se realizó empleando un contador submicrónico de partículas (Nanosizer[®] N4Plus, Coulter, USA) a un ángulo de 90° . Todas las medidas se hicieron por triplicado para calcular el tamaño de partícula promedio y el índice de polidispersión (IP).

2.2. Morfología.

Se observó la morfología de las NPM por medio de microscopía electrónica de transmisión (MET) usando un microscopio JEM-CX100 (JEOL[®] JEM-2010, Japón.). Una gota de suspensión de la NPM fue colocada sobre una rejilla de cobre con una cubierta de Formvar[®] durante 2 minutos. El exceso de la solución fue removida usando papel filtro y las rejillas fueron secadas al aire hasta su observación.

2.3. Difracción de rayos x.

Para la identificación de Fe_3O_4 las partículas obtenidas y previamente liofilizadas fueron sometidas a un análisis por difracción de rayos X, proporcionando aproximadamente 100 mg de NPM liofilizadas para ser analizadas en un difractómetro de rayos X para polvos (Siemens® D5000, USA).

2.4. Magneticidad.

Para caracterizar la magneticidad de las NPM se realizaron dos pruebas a los liofilizados de partículas: 1) se evaluó la susceptibilidad magnética colocando en una cajita de plástico una cantidad conocida de NPM, la cual fue analizada en un medidor de susceptibilidad magnética (KappaBridge® KLY3,USA); 2) se obtuvo la curva de histéresis correspondiente a materiales magnéticos con la ayuda de un magnetómetro de gradiente de campo alternado (MicroMag® 2900, Alemania), para lo cual se pesó una cantidad conocida de NPM dentro de contenedores diseñados para la realización de esas determinaciones. Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Paleomagnetismo y Magnetismo de Rocas del Centro de Geociencias de la UNAM ubicado en Juriquilla, Querétaro.

3. Funcionalización de las NPM con ácido oleico.

La funcionalización de las NPM se realizó por la adición de AO puro en una etapa crítica durante el proceso de síntesis a las mismas condiciones; 1800 RPM, 70 ± 5 °C, atmósfera de N_2 . Las NPM funcionalizadas fueron recuperadas con fracciones de 10 mL de cloroformo hasta completar un volumen final de aproximadamente 50 mL.

3.1. Efecto de la cantidad de AO puro sobre la naturaleza lipofílica de las NPM.

Se prepararon 5 lotes de NPM modificando la cantidad adicionada de AO en cantidades crecientes de 50, 100, 150, 200 y 250 mg. Las NPM funcionalizadas son recuperadas y liofilizadas. Para evaluar la naturaleza de las partículas se realizó una prueba *in vitro* como se indica a continuación.

En esta prueba se evaluó la afinidad de las NPM funcionalizadas por la fase acuosa u orgánica en sistemas que contienen agua y cloroformo con relación a la cantidad de AO empleada para la funcionalización, mediante una resuspendibilidad de las NPM liofilizadas, como se muestra en la Fig. 16.

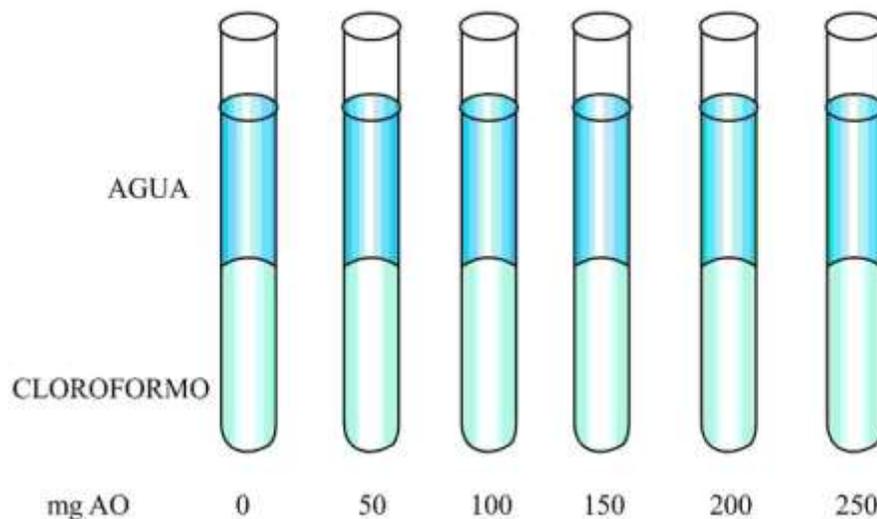


Fig. 16. Afinidad de las NPM funcionalizadas con ácido oleico hacia la fase orgánica o acuosa.

Con esta prueba se determinó la cantidad óptima de AO para modificar completamente la naturaleza hidrofílica de la superficie de las NPM para su posterior implementación en sistemas con aplicaciones biomédicas.

4. Inclusión de las NPM en las NPP.

4.1. Preparación de los sistemas NPM-NPP.

La preparación de las NPP se llevó a cabo por el método de emulsificación-evaporación de solvente (Quintanar-Guerrero, Allemann *et al.*, 1999) para lo cual se saturaron aproximadamente 250 mL de acetato de etilo y 250 mL de agua desionizada en un embudo de separación con agitación moderada por aproximadamente 5 minutos. Transcurrido ese tiempo las fases fueron separadas; se disolvió la cantidad necesaria de PVAL en la fase acuosa previamente saturada con acetato de etilo para obtener una solución del polímero al 5 %.

Por otro lado, se pesaron 150 mg de PLGA y disolvieron en 20 mL de acetato de etilo con agitación magnética moderada hasta la completa incorporación del polímero, después de la incorporación del polímero se adicionaron cantidades conocidas de las NPM. Esta solución se emulsificó en 40 mL de PVAL al 5 % a 16000 RPM durante 5 minutos.

Para la obtención de los sistemas NPM-NPP, se retiró el solvente a presión reducida en un rotaevaporador hasta un volumen aproximado de 20 mL, el cual fue recuperado y resuspendido en agua. Las NPM-NPP fueron centrifugadas a 20000 RPM en una ultracentrífuga (Optima[®] LE-80K, Beckman, USA). El sobrenadante fue desechado y la pastilla resuspendida en agua desionizada con agitación magnética durante toda la noche (se realizaron tres lavados).

La pastilla formada en el último lavado fue resuspendida en 5 mL de agua destilada y la dispersión colocada en un vial, congelada a -15 °C y liofilizada durante 48 horas. El procedimiento de preparación de las NPP se resume esquemáticamente en la Fig. 17.

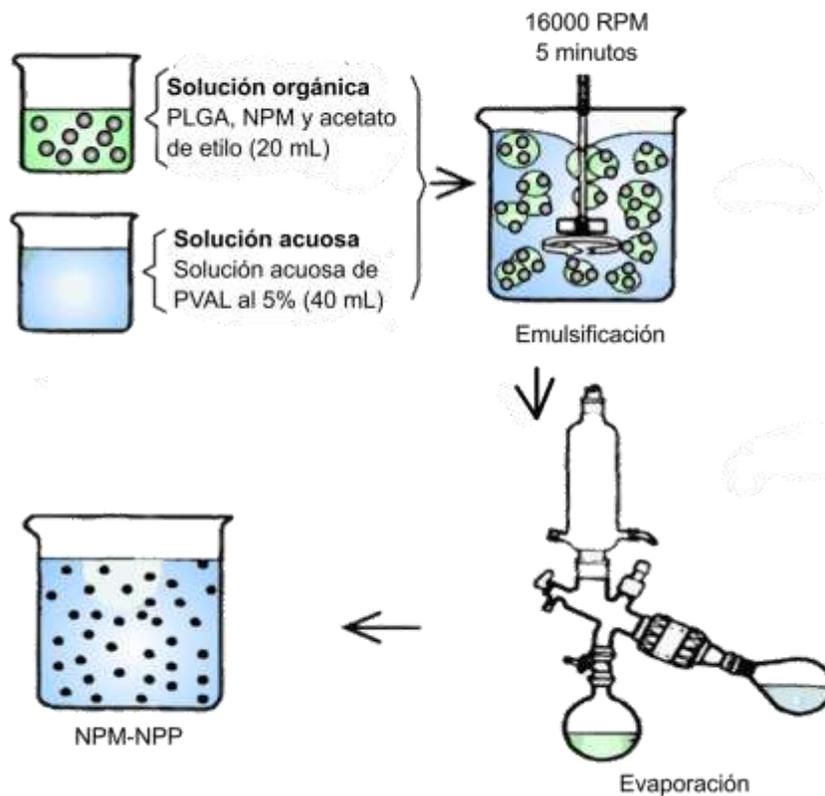


Fig. 17. Esquematación del proceso de preparación de los sistemas NPM-NPP.

4.2. Inclusión de las NPM en la matriz polimérica de las NPP.

La inclusión de las NPM dentro de la matriz polimérica de las NPP se realizó añadiendo cierta cantidad del liofilizado de nanopartículas de magnetita funcionalizadas con AO en el acetato de etilo que contiene el PLGA con agitación magnética moderada hasta la completa incorporación del polímero. Se continuó la preparación de las NPP como se explicó previamente.

4.3. Determinación de la cantidad de Fe_3O_4 incluido en las NPP.

a. Curva de Calibración.

La cuantificación de Fe_3O_4 se llevó a cabo por medio de una reacción colorimétrica por espectrofotometría UV-Visible por la formación de un complejo colorido entre

la 1,10-ortofenantrolina y el Fe con un estado de oxidación de +2 en un intervalo de pH de 6 - 9, por lo que, para la cuantificación se necesitó la presencia de la especie ferrosa lo cual se consiguió por una completa reducción con clorhidrato de hidroxilamina.

Para la curva de calibración se pesaron exactamente 20 mg de sulfato ferroso amoniacal hexahidratado con una pureza de 99.9999 %. Esta cantidad se disolvió en agua y se llevó a un volumen de aforo de 250 mL en un matraz volumétrico (STD). Para la elaboración de la curva se preparó una solución de acetato de sodio, pesando 10 g y disolviéndolo en agua llegando a un volumen de 100 mL; otra solución de clorhidrato de hidroxilamina, para lo cual se pesaron 5.0 g y se solubilizaron en 50 mL; y por último, 25 mg de 1,10-ortofenantrolina en 25 mL de agua. La preparación de los sistemas se realizó de acuerdo a la Tabla 3 por triplicado.

Tabla 3 Curva de Calibración de Fe²⁺.

REACTIVOS	SISTEMAS						
	BCO	1	2	3	4	5	6
STD	0 mL	0.5 mL	1.0 mL	3.0 mL	5.0 mL	7.0 mL	10.0 mL
Acetato de sodio	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL
1,10-Fenantrolina	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
Clorhidrato de hidroxilamina	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Volumen de aforo	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL

Para considerar adecuada ésta curva de calibración se determinó el coeficiente de variación (C.V.), el cual debe de ser <2 %, así como un coeficiente de correlación (R^2) >99 % (CIPAM, 2006).

b. Preparación de la Muestra.

Se pesó exactamente la cantidad de muestra conocida y se disolvió en aproximadamente 1 mL de ácido sulfúrico concentrado llevando a la marca de aforo en un matraz volumétrico de 100 mL, enseguida se tomó una alícuota con pipeta volumétrica de 5 mL y se ajustó el pH de la solución entre 6 y 9 con solución de acetato de sodio adicionando 1 mL de clorhidrato de hidroxilamina y finalmente, se agregaron 2.5 mL de 1,10-Ortofenatrolina; llevando la solución a una marca de aforo en un matraz volumétrico de 25 mL. Se dejó reposar la solución por aproximadamente una hora y se leyó frente a un blanco a 510 nm (cada cuantificación se hizo por triplicado). Se determinaron los mg de Fe_3O_4 por sistema.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Síntesis de las nanopartículas por el método de co-precipitación.

Se lograron sintetizar NPM de Fe_3O_4 por el método de co-precipitación utilizando $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ y $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ como fuentes de hierro en una proporción molar 2:1 en solución acuosa, se utilizó NH_4OH como base para poder precipitar la magnetita en un pH cercano a 9. La reacción se realizó en condiciones especiales, pues se tuvo que proporcionar una atmósfera libre de oxígeno por medio del burbujeo de nitrógeno para prevenir una pronta oxidación de las NPM; además, el procedimiento fue sometido durante todo el tiempo de síntesis a una agitación constante de 1800 RPM con la ayuda de un agitador mecánico de velocidad variable. Se adicionó citrato de sodio 0.1 M en una etapa crítica del método de síntesis para prevenir la agregación entre partículas. La reacción de síntesis se basa en el siguiente modelo (Lu, Salabas *et al.*, 2007):



Las nanopartículas fueron centrifugadas a $9072 \times g$ y lavadas con agua desoxigenada tres veces. Estas NPM fueron resuspendidas en la mínima cantidad de agua desoxigenada, congeladas a $-20 \text{ }^{\circ}C$ y liofilizadas durante 48 h a una presión de $<100 \mu\text{bar}$. Las partículas fueron recuperadas y almacenadas en viales de vidrio con papel parafilm (Fig. 18).

Una prueba preliminar que se realizó fue la de exponer las partículas obtenidas a un campo magnético externo de baja intensidad con la finalidad de apreciar visiblemente si las NPM presentaban características magnéticas. Esta cualidad pudo observarse al colocar un imán a aproximadamente 2 cm del vial que contenía las NPM, las cuales fueron atraídas hacia el imán de manera tal que pudo ser apreciado a simple vista (Fig. 19).



Fig. 18. NPM sintetizadas por el método de co-precipitación.



Fig. 19. Evaluación de la magnetividad de las NPM obtenidas.

Las NPM liofilizadas fueron utilizadas posteriormente para la caracterización y otras pruebas.

1.1. Efecto del % de citrato de sodio como estabilizador coloidal.

Se determinó la influencia del citrato de sodio para prevenir la agregación entre las partículas y, por lo tanto, el efecto en el tamaño de las partículas sintetizadas. Se varió la cantidad de citrato de sodio 0.1 M con respecto a la relación molar de Fe proporcionada por las fuentes de hierro utilizadas. Las NPM fueron evaluadas en tamaño por triplicado, relacionando la cantidad de citrato empleada con respecto al tamaño de partícula. Los resultados se muestran en una gráfica % de citrato de sodio 0.1 M vs tamaño de partícula (nm) (Tabla 4 y Gráfico 1.). Además se muestra un análisis de intensidad de pico de las NPM vs tamaño de partícula (nm) de cada una de las muestras analizadas (Fig. 20).

Tabla 4. Efecto del % de citrato de sodio 1 M en el tamaño de partícula de las NPM sintetizadas.

% Citrato de sodio 1 M	Tamaño de partícula Nanosizer® (nm)	Promedio aritmético (nm)	Índice de polidispersión	Desviación Estándar (nm)
5%	159.8	152.20	0.108	9.18
	142.0			
	154.8			
10%	214.8	194.20	0.446	22.43
	197.5			
	170.3			
15%	98.3	122.00	0.435	40.96
	169.3			
	98.4			
25%	161.5	139.27	0.580	19.33
	126.4			
	129.9			
30%	80.1	78.67	0.726	1.69
	76.8			
	79.1			

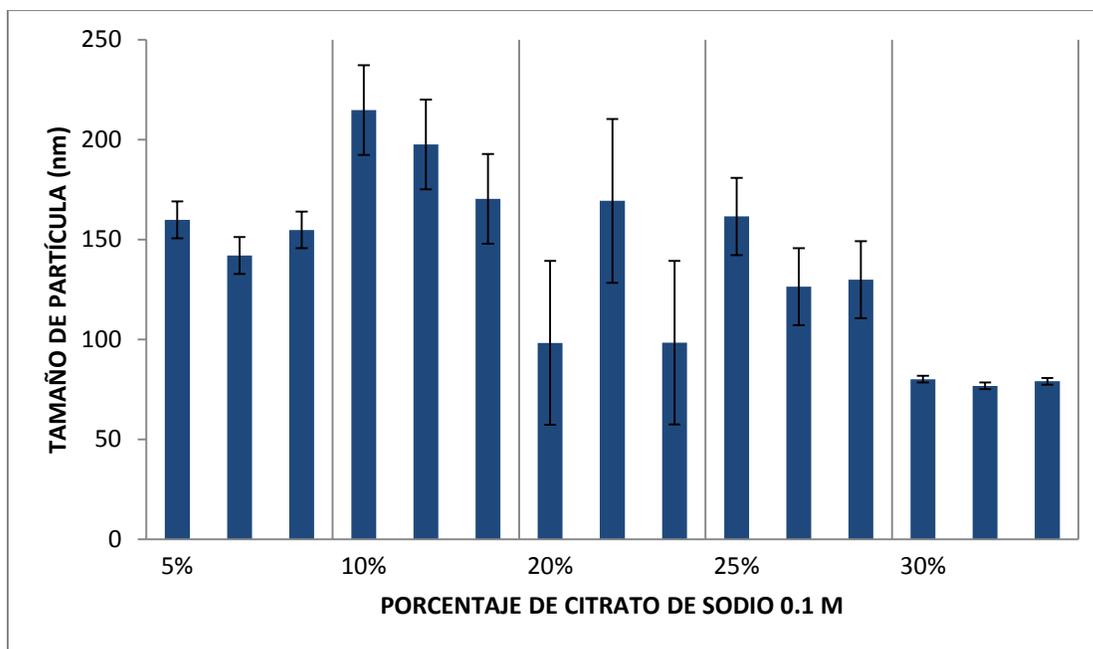


Gráfico 1. Distribución de tamaño de partícula por efecto del % de citrato de sodio 0.1 M.

*Las determinaciones para 0 % de citrato de sodio fueron mayores a 1,000 nm, por lo tanto no se consideraron (barra de error representa la desviación estándar).

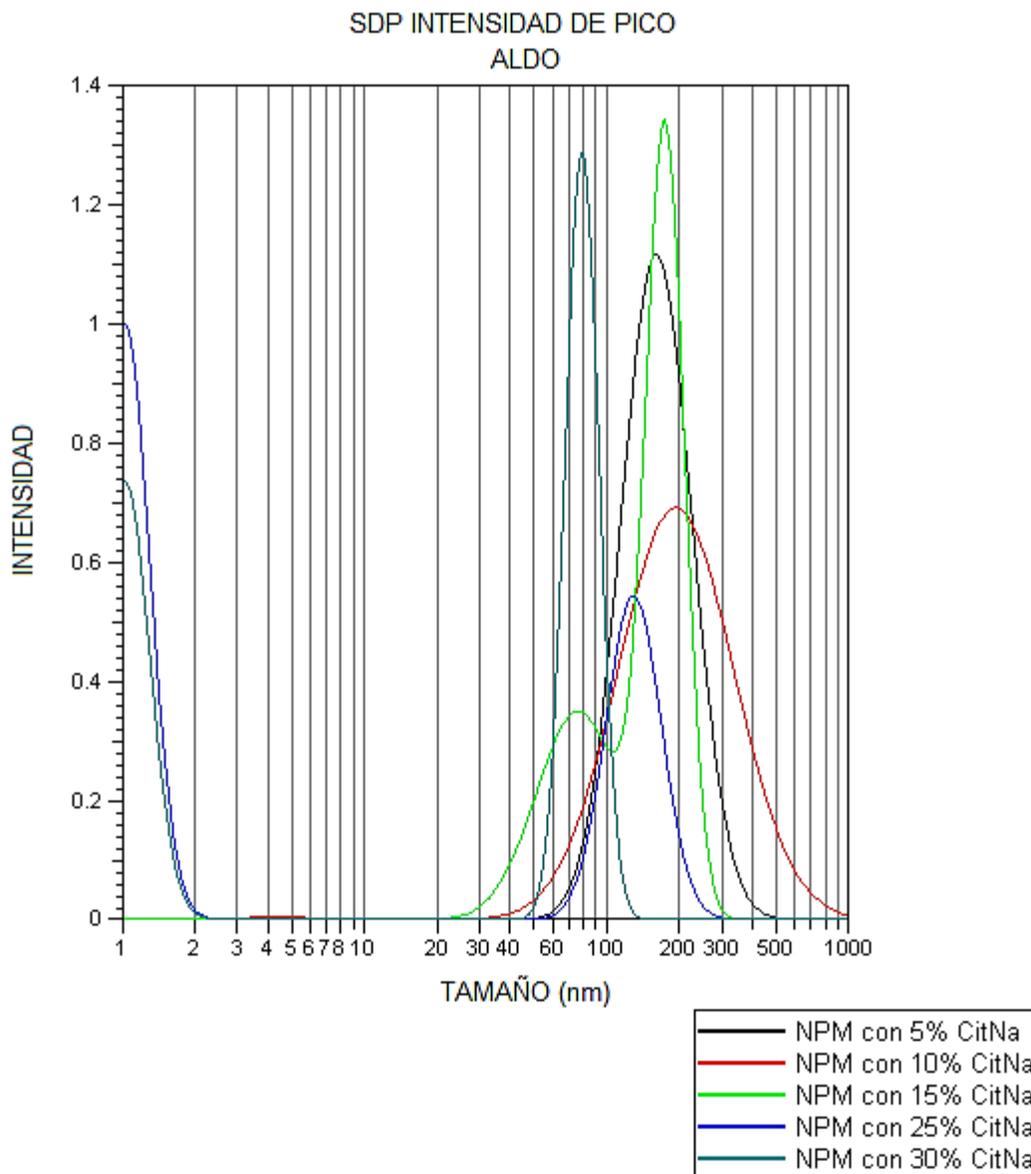


Fig. 20. Distribución del tamaño de partícula en función de la cantidad de citrato de sodio 0.1 M.

Los resultados indican que el estabilizante coloidal empleado ejerce un efecto sobre el tamaño de las NPM, debido a la cantidad de citrato de sodio adicionado en el método de síntesis. Se observó una reducción de manera significativa, tan solo con el 5 % de citrato de sodio, el tamaño de las NPM disminuyó de > 1,000 nm a un tamaño promedio entre 140-160 nm. Al ir adicionando cantidades crecientes de citrato de sodio se siguió observando una disminución en el tamaño de las partículas hasta llegar a un tamaño promedio de 78 nm; sin embargo, se

presume que este tamaño corresponde a pequeños agregados unidos por fuerzas magnéticas o electrostáticas.

La disminución en el tamaño de las NPM por efecto de la cantidad de citrato de sodio 0.1 M, es debido a una estabilización electrostática al adicionar cargas positivas en el medio proporcionadas por los iones de sodio, las cuales se interponen y evitan la atracción electromagnética al interponerse entre las partículas cargadas negativamente por la presencia de grupos OH superficiales; además es sabido que los iones orgánicos afectan la formación de aglomerados de óxidos metálicos por dos procesos: 1) la quelación de estos iones con iones metálicos previenen la nucleación entre las partículas, 2) la adsorción de estos iones en el núcleo se lleva a cabo por una inhibición hidrolítica en el crecimiento de los núcleos. (Bee, Massart *et al.*; Lu, Salabas *et al.*, 2007). Teniendo las NPM estabilizadas fueron centrifugadas para eliminar el exceso de iones Na^+ , se lavaron con agua desoxigenada y liofilizadas para su posterior funcionalización.

1.2. Efecto de la cantidad de NH_4OH 5 M en el tamaño y aspecto de las NPM.

Se evaluó el efecto de la cantidad de NH_4OH a una concentración de 5 M sobre el tamaño y aspecto de las NPM. Para dicha evaluación fue necesaria la realización de un lote de nanopartículas a las condiciones pre-establecidas ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 2:1, atmósfera de N_2 , $70 \pm 5^\circ \text{C}$, 1800 RPM, 30 % de citrato de sodio) y la adición de NH_4OH 5 M en intervalos de 5 mL cada 10 minutos. Se tomó una muestra de aproximadamente 1 mL después de cada adición de hidróxido de amonio y se colocó dentro de un vial diluyendo con agua desoxigenada. Las muestras obtenidas fueron evaluadas en tamaño por medio de un Nanosizer[®] para obtener el tamaño de partícula promedio (Gráfico 2), además de una evaluación visual de las nanopartículas (Fig. 21).

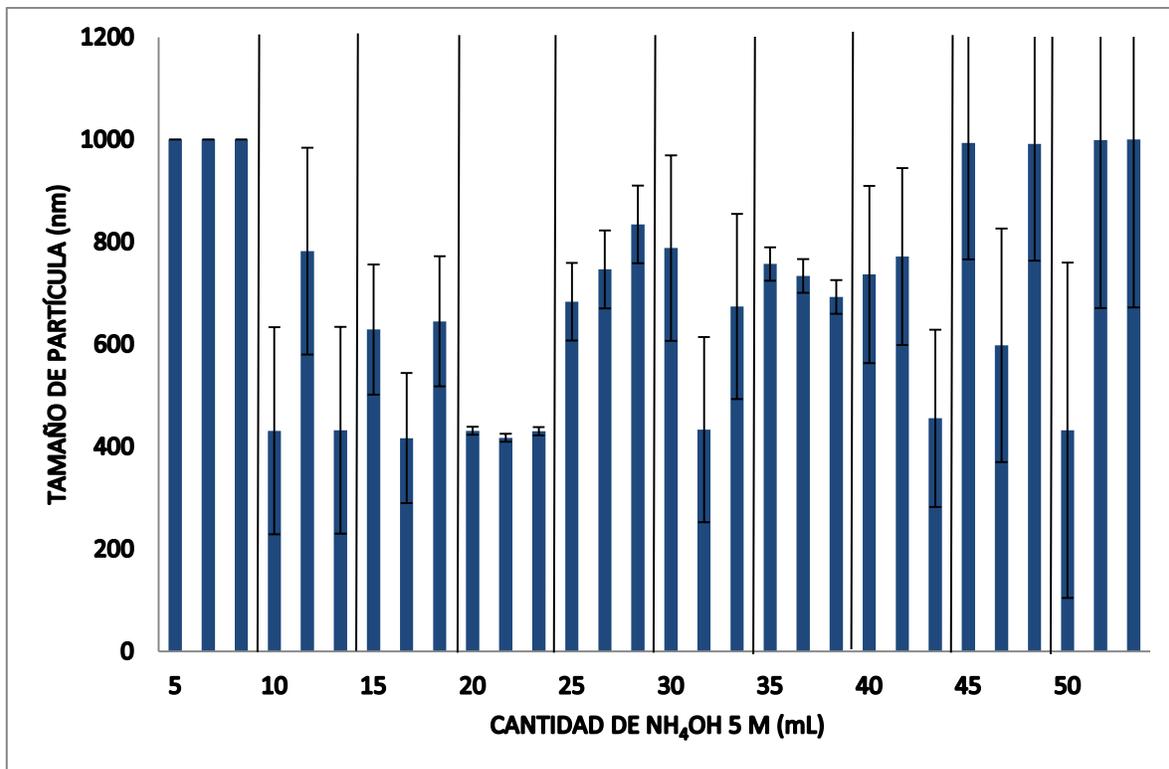


Gráfico 2. Efecto de la cantidad de NH_4OH 5 M sobre el tamaño promedio aritmético de partícula (barras representan la desviación estándar).

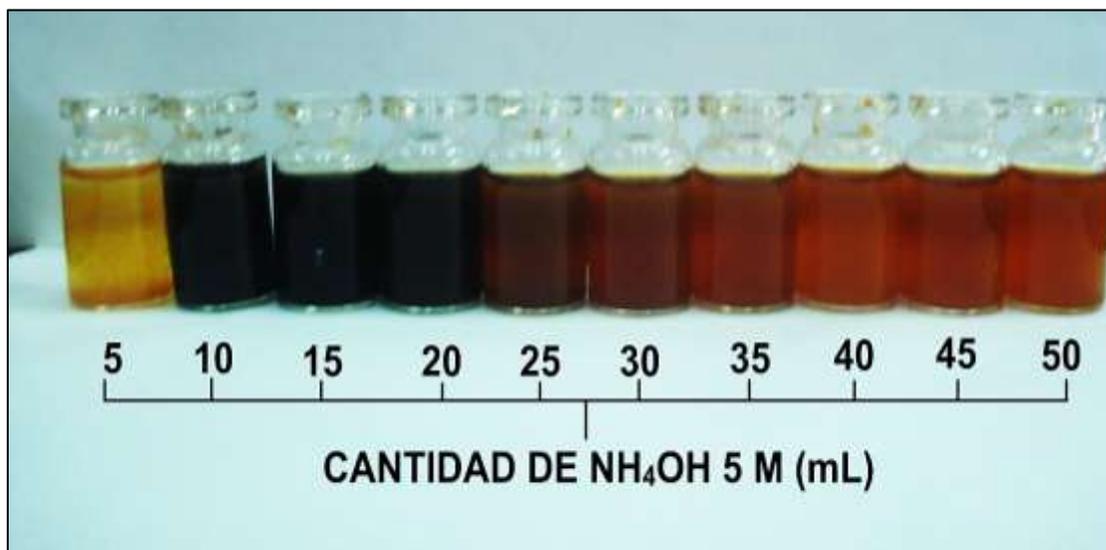
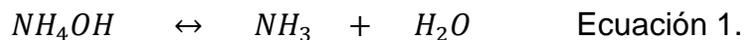


Fig. 21. Evaluación del aspecto de las NPM por efecto de la cantidad de NH_4OH 5 M.

Como se muestra en el Gráfico 2, de la misma manera que la cantidad de citrato de sodio juega un papel importante en el tamaño de las NPM, lo es la cantidad de

NH_4OH empleado como agente precipitante. Como se puede observar hay un intervalo en el cual se obtienen partículas de un tamaño aceptable, mostrando claramente el efecto de la base utilizada, este intervalo va de los 10 a los 20 mL de hidróxido de amonio 5 M. Comparando este resultado con la evaluación de aspecto mostrado en la Fig. 21, se puede observar que en este intervalo las partículas obtenidas presentan las características de la magnetita, puesto que se observa una suspensión de color negro, al contrario de las obtenidas por debajo y por encima de este intervalo donde toman un color de naranja a café, esto podría indicar que se trata de maghemita u otro óxido de hierro (Lu, Salabas *et al.*, 2007).

El efecto del hidróxido de amonio está ligado a la cantidad de oxígeno presente en el medio, debido a que la reacción es llevada en condiciones “anaerobias” (en ausencia de oxígeno), por lo tanto, al adicionar grandes cantidades de hidróxido de amonio, según su reacción de disociación (Ecuación 1.), el equilibrio se desplaza a la formación de agua no desoxigenada lo que provoca la formación de iones O^- libres, los cuales se encargan de oxidar a la magnetita a maghemita, dándole el aspecto de color café.



Con estos resultados se puede comprobar que existe una relación entre la cantidad y base empleada con el tamaño de partícula en el proceso de síntesis de las NPM. Determinado el rango en el cual se obtienen resultados favorables, es fácil estandarizar las cantidades óptimas en concentración y cantidad de la base empleada.

2. Caracterización.

Para obtener ciertas características de las NPM sintetizadas, estas fueron sometidas a diferentes evaluaciones como lo son: tamaño de partícula, morfología,

difracción de Rayos-X y pruebas para determinar algunas propiedades magnéticas.

2.1. Tamaño de partícula.

El tamaño de partícula fue analizado por un equipo contador submicrónico de partículas, Nanosizer® N4Plus, se realizó un análisis de intensidad de pico de las NPM vs tamaño de partícula (nm), por medio del cual se determinó el tamaño promedio de las partículas obtenidas con las condiciones óptimas de síntesis según las pruebas anteriores. Las condiciones utilizadas para la elaboración de las NPM fueron: fuentes de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ en una relación molar 2:1, una temperatura de reacción de 70 ± 5 °C, una agitación mecánica a 1800 RPM, citrato de sodio en un 30 % con relación a la cantidad molar de las fuentes de Fe, 20 mL de NH_4OH 5 M, agua desoxigenada y lo más importante, una atmósfera libre de oxígeno. Las partículas obtenidas bajo estas condiciones se evaluaron en tamaño obteniéndose los resultados que se muestran en la Fig. 22 y la Tabla 6.

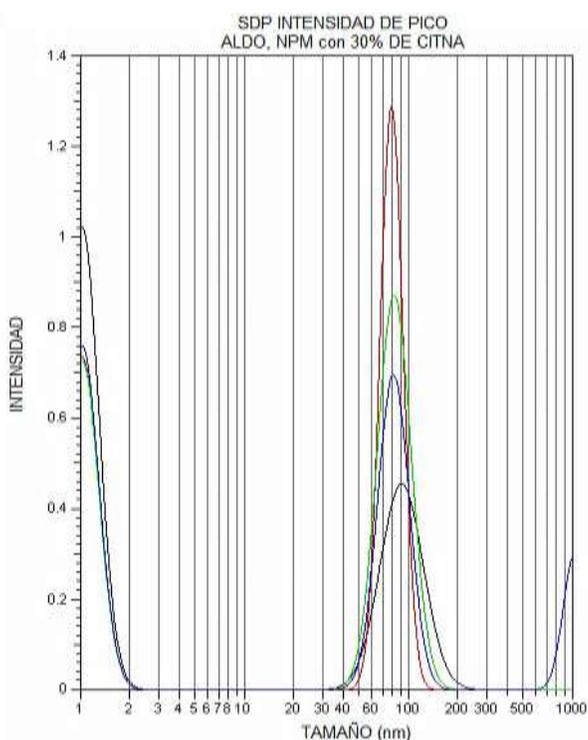


Fig. 22. Distribución de tamaño de partícula para las NPM sintetizadas.

Tabla 5 Evaluación de tamaño de partícula para las NPM obtenidas.

Sistema	Tamaño de partícula Nanosizer® (nm)
1	90.1
2	76.8
3	80.0
4	79.1
PROMEDIO	81.5
DESV. STD.	5.89

Como se puede observar en la Tabla 6 y la Fig. 22 se lograron obtener NPM con tamaño promedio de 81.5 nm de diámetro y desviación estándar de 5.89 nm, gracias a la optimización en el método de síntesis, puesto que evaluaciones previas mostraban tamaños > 1000 nm. Sin embargo, y como se mostrará en la evaluación morfológica, se plantea la hipótesis de que dichos resultados son referidos a pequeñas aglomeraciones de partículas de tamaños menores, puesto que en la mayoría de la literatura consultada el tamaño de las partículas es determinado por técnicas microscópicas (Willis, Turro *et al.*, 2005; Khan, 2008); cabe señalar que las NPM fueron sonicadas en su última etapa de manufactura para tratar de disgregar los aglomerados formados, observándose una disminución considerable en el tamaño gracias a este proceso físico debido a que este método influye directamente en el tamaño de partícula de algunos materiales con interacciones interparticulares (Bilati, Allemann *et al.*, 2003).

2.2. Morfología.

En la Fig. 23 se muestran las micrográficas obtenidas por MET de las NPM sintetizadas a las condiciones establecidas mediante las pruebas anteriores.

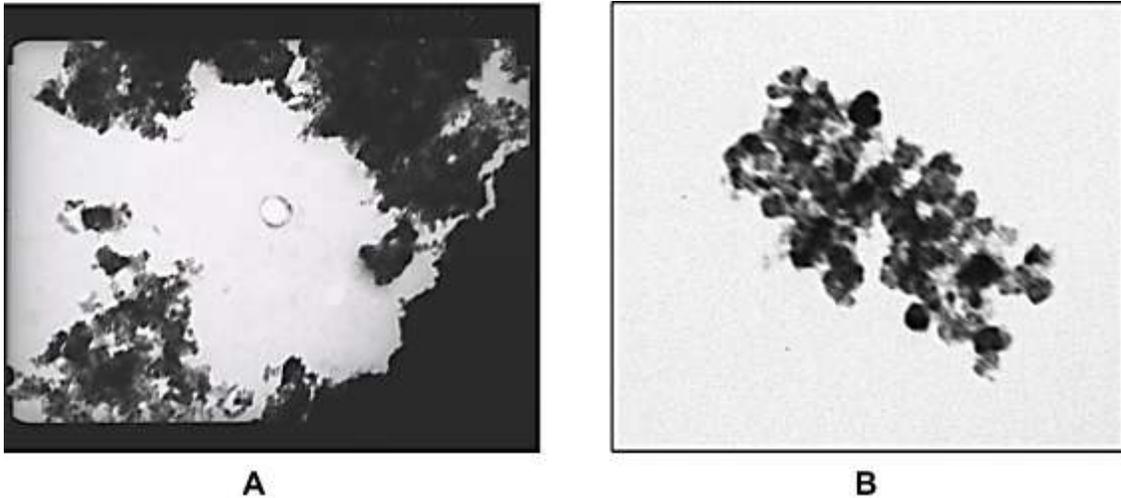


Fig. 23. Micrografías obtenidas por MET de las NPM sintetizadas. A. 50000x; B. 75000x.

El objetivo de observar las NPM por MET fue la de poder elucidar la morfología de las partículas obtenidas y la forma en la que están distribuidas y si de verdad se trata de aglomerados de partículas más pequeñas, como se mencionó en la evaluación del tamaño de partícula y, de igual manera, corroborar el tamaño de partícula obtenido.

Como se puede observar en las imágenes obtenidas, las partículas muestran una morfología esférica en agrupaciones pequeñas, por lo que se puede inferir que el tamaño de partícula obtenido por el contador submicrónico de partículas se refiere al radio hidrodinámico de las partículas (Gómez-Lopera, Plaza *et al.*, 2001). El tipo de microscopía y la resolución obtenida no permite hacer un análisis detallado del tamaño de la partícula, sin embargo, considerando el aumento y basándose en observaciones hechas con el mismo aumento a nanopartículas poliméricas desarrolladas en nuestro laboratorio y observadas a la misma magnificación, es posible inferir que las partículas obtenidas en realidad presentan un tamaño cercano a los 10 nm. La microscopía electrónica de alta resolución (HR-TEM, por sus siglas en inglés) resulta la técnica más socorrida en la caracterización de nanopartículas cerámicas de tamaño inferior a los 100 nm.

2.3. Difracción de Rayos-X.

Una de las pruebas más importantes a realizar, sin duda es la de identificación de cualquier material o sustancia, en este caso la difracción de rayos X nos permite identificar un material. En el caso de las NPM, la bibliografía nos dice que pueden existir tres diferentes formas de óxidos de hierro hematita (Fe_2O_3), magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), cada uno con propiedades y características diferentes. El objetivo de esta prueba fue la comprobación de la obtención de magnetita como óxido de hierro de interés para la elaboración de estas NPM, como se muestra en la Fig. 24.

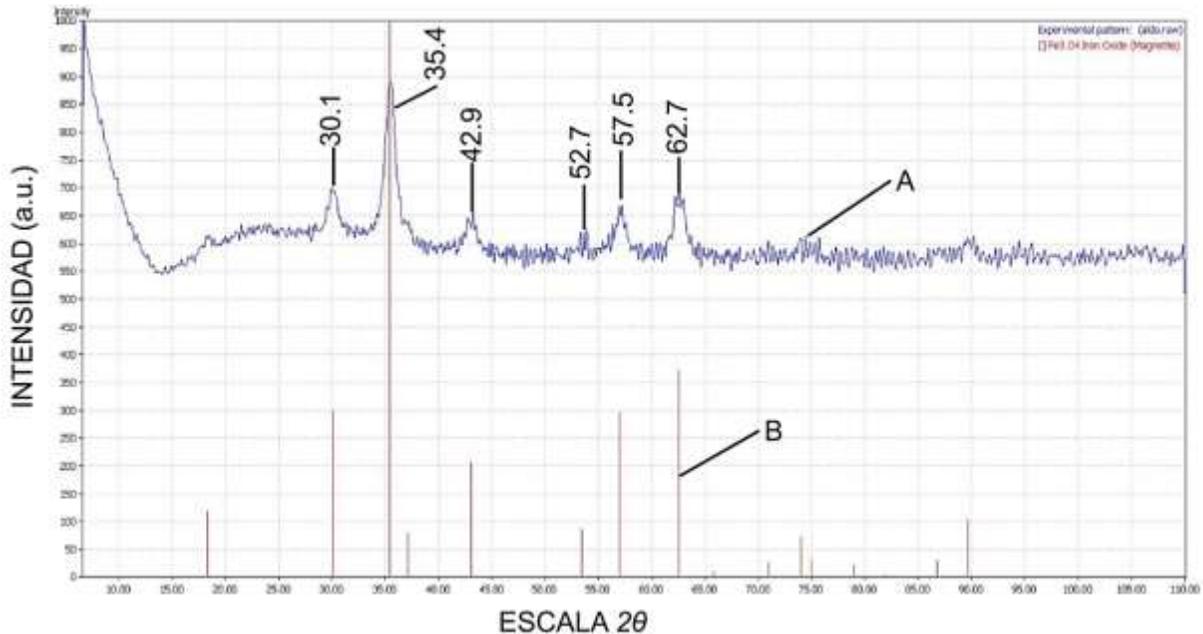


Fig. 24. Difractograma de Rayos-X de polvos (XRPD). A) NPM sintetizadas; B) Patrón de comparación correspondiente a magnetita.

Como se puede observar en la Fig. 24, correspondiente al difractograma de las NPM sintetizadas obtenido en el difractómetro de rayos X para polvos (Siemens[®] D500), es posible identificar 6 picos de difracción a 2θ , característicos y que confirman la presencia de magnetita, a 30.1, 35.4, 42.9, 52.7 57.5 y 62.7 tal y como se muestra en la literatura (Khan, 2008).

2.4. Magneticidad.

Para la caracterización de las NPM con respecto a sus propiedades magnéticas se requirió del apoyo del Laboratorio de Paleomagnetismo y Magnetismo de Rocas del Centro de Geociencias, UNAM, en Juriquilla. Estas pruebas fueron realizadas al liofilizado de NPM.

a) Susceptibilidad magnética.

Es bien sabido que toda sustancia, al ser colocada en un campo magnético externo, experimenta una magnetización. La susceptibilidad magnética (χ) es una de las propiedades inherentes de la materia y nos permite describir la forma y grado de magnetización de cualquier sustancia al ser colocada en un campo magnético. El valor de susceptibilidad magnética puede ser positivo si la magnetización de la muestra refuerza el campo (paramagnético), o negativo, si se opone al campo (diamagnético). La susceptibilidad magnética puede determinarse mediante una balanza de Gouy. (M. Sosa, 2004).

Para la determinación de la susceptibilidad de las NPM se utilizó un equipo KappaBridge[®] KLY3, obteniéndose los siguientes resultados para 0.1322 g de NPM no funcionalizadas; además de 0.1040 g de una muestra de NPM funcionalizadas, por triplicado (Tabla 6.).

Tabla 6. Mediciones de susceptibilidad magnética para NPM no funcionalizadas y funcionalizadas.

	NPM no funcionalizadas $\times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{Kg}$	NPM funcionalizadas $\times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{Kg}$
	15.96	5.156
	15.84	5.156
	16.03	5.157
PROMEDIO	15.94	5.16
DESV. STD.	0.0961	0.0006

Como se puede ver en la Tabla 6, la susceptibilidad magnética de las NPM se ve disminuida de manera considerable por la presencia del ácido oleico superficial, esto debido a la presencia de una capa aislante que se interpone entre el núcleo de las NPM y el campo magnético externo, por lo tanto, a mayor cantidad de ácido oleico adherido a las NPM influirá inversamente en la capacidad de las partículas para ser objeto de una magnetización (Gómez-Lopera, Plaza *et al.*, 2001; Figuerola, Di Corato *et al.*, 2010).

b) Curva de histéresis.

La curva de histéresis es un análisis muy importante ya que nos da varios parámetros para describir la fuerza y la magnetización de un material, como ya se dijo en el marco teórico. Los valores que se pueden obtener de una curva de este tipo son la coercitividad (H_c), la magnetización de saturación (M_s) y el remanente de magnetización (M_r). Se analizaron dos muestras de NPM, una que estaba funcionalizada con ácido oleico y otras, no funcionalizadas. Las muestras fueron analizadas por un magnetómetro de gradiente de campo alternado (MicroMag[®] 2900, Alemania), obteniendo el siguiente resultado (Fig. 25).

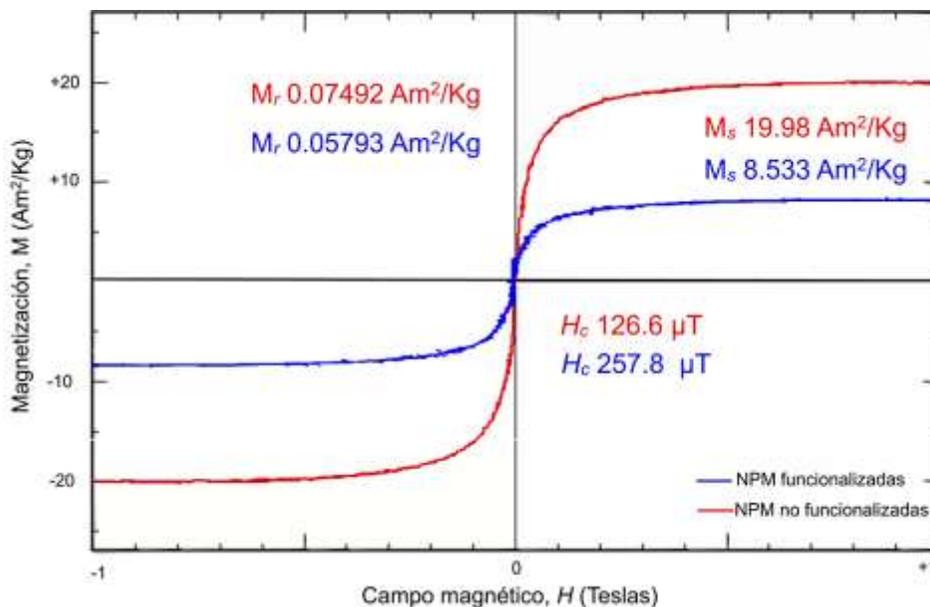


Fig. 25. Curvas de histéresis para NPM funcionalizadas con ácido oleico y NPM no funcionalizadas.

Como se observa en la Fig. 25, la gráfica representa las curvas de histéresis para NPM previamente funcionalizadas con AO y NPM no funcionalizadas, estas últimas presentando valores mayores de M_s , $19.98 \text{ Am}^2/\text{Kg}$, en comparación con las que presentaban AO, $8.533 \text{ Am}^2/\text{Kg}$, lo cual indica que las partículas sin algún recubrimiento poseen una mayor capacidad de saturación. De la misma manera se compararon los valores de M_r en donde las NPM funcionalizadas presentan un valor de $0.05793 \text{ Am}^2/\text{Kg}$ en comparación al $0.07492 \text{ Am}^2/\text{Kg}$ de las NPM no funcionalizadas, lo cual indica la magnetización remanente cuando el campo externo se acerca a 0, la cual es casi nula en ambos casos, dicho comportamiento se asemeja a resultados reportados en la literatura (Gómez-Lopera, Plaza *et al.*, 2001).

Para la coercitividad se observó una relación a la inversa a la mostrada por la M_s y la M_r ; en este caso la NPM con ácido oleico presentaron una mayor coercitividad, $257 \mu\text{T}$, que las NPM no funcionalizadas, $126.6 \mu\text{T}$, esto por una sencilla razón relacionada con el tamaño de las partículas. Al ser partículas no funcionalizadas, quiere decir, que las NPM se encuentran solas y que su tamaño es menor con comparación a las partículas funcionalizadas en las cuales el tamaño es mayor debido a la presencia de AO en la superficie. La coercitividad nos habla de la energía mínima necesaria para la inversión de la magnetización del material (Figuerola, Di Corato *et al.*, 2010).

3. Funcionalización de las NPM con AO.

Una de las etapas críticas, para la implementación de las NPM con fines biomédicos, es la modificación de su superficie por la adición de compuestos o moléculas orgánicas e inorgánicas. Esta modificación debe cumplir ciertos objetivos, entre los más importantes se pueden citar: la estabilización de las NPM a ciertas condiciones semejantes a las fisiológicas e impedir el ataque del sistema inmune para cumplir con fines terapéuticos o diagnósticos.

Para este trabajo se utilizó ácido oleico puro como agente modificante de la superficie de las NPM, esta modificación fue lograda agregando en primera instancia 0.3 mL de AO puro a un lote de nanopartículas sintetizadas, las cuales fueron recolectadas en cloroformo, obteniéndose dos fases como se muestra en la Fig. 26.

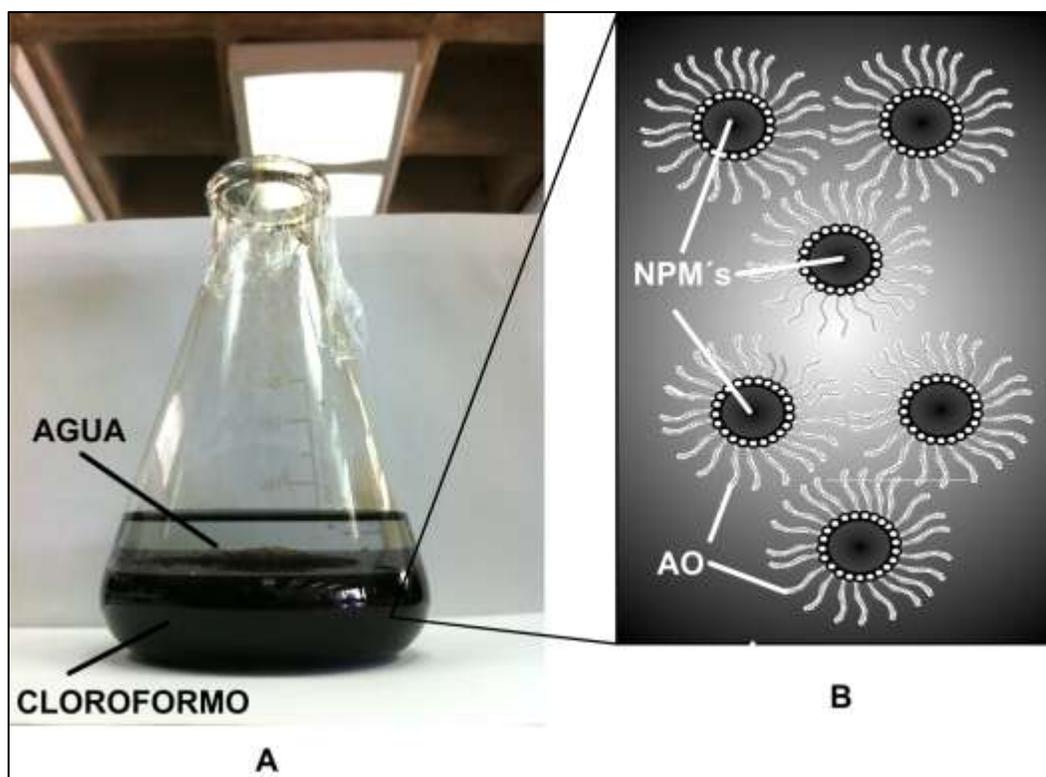


Fig. 26. Funcionalización de NPM. A) Separación de NPM en cloroformo; B) Esquema demostrativo de la adsorción de AO en la superficie de las NPM.

Es bien sabido que el óxido de hierro magnético preparado por el método de coprecipitación posee un gran número de grupos hidroxilo en la superficie de contacto con la fase acuosa. Los grupos $-OH$ en la superficie de las partículas de Fe_3O_4 reaccionan fácilmente con la cabeza de ácidos carboxílicos de las moléculas de ácido oleico. El exceso de ácido oleico es posteriormente absorbido como ácido oleico pre-enlazado para formar una capa hidrofóbica. Cuando las NPM se ponen en una solución de NH_4OH , la capa externa de AO en la superficie de Fe_3O_4 se transforma en una sal de amonio de ácido oleico, que modifica las

NPM para que estas puedan existir en una dispersión acuosa debido a que la superficie de las partículas ahora es hidrofílica (Khan, 2008).

3.1. Efecto de la cantidad de AO puro sobre la naturaleza lipofílica de las NPM.

Se determinó el papel que desempeña la cantidad de AO adsorbido en la superficie de las NPM en relación a la modificación de su naturaleza hidrofílica al adicionar cantidades crecientes de AO puro. Se elaboraron lotes de las NPM adicionando diferentes cantidades de AO (desde 50, 100, 150, 200 y 250 mg) en un punto crítico del proceso de síntesis.

Estas partículas fueron recuperadas en aproximadamente 50 mL de cloroformo, posteriormente se adicionó cierta cantidad de las NPM funcionalizadas de cada lote, obteniéndose el resultado que se muestra a continuación (Figura 27).



Fig. 27. Evaluación de la lipofilicidad de las NPM vs. Cantidad de AO puro adsorbido.

La Fig. 27 muestra la modificación de la superficie de las NPM dependiendo de la cantidad de AO; como se puede observar, las NPM son de naturaleza hidrofílica lo

cual indica que pueden ser resuspendidas en agua; sin embargo, para los fines propuestos en este trabajo es necesaria la modificación de este comportamiento, por lo tanto, deben comportarse como partículas lipofílicas.

La modificación superficial se logró gracias a la implementación de AO puro en cantidades crecientes, se puede observar que en cantidades menores a 100 mg, la cantidad de AO no es suficiente para modificar por completo la naturaleza de las partículas; sin embargo, en 100 mg se puede observar que la parte orgánica del sistema (cloroformo) muestra una apariencia turbia, indicativo de la presencia de partículas ya funcionalizadas. También, podemos decir que por encima de cantidades de 150 mg, existe una completa saturación superficial de las NPM lo cual se comprueba por la completa deposición en la fase que contiene cloroformo. Además de estas cantidades, se realizaron pruebas con cantidades mayores a 300 mg, sin embargo, se presentó la complicación de que los sistemas presentaban la formación de espuma, debida a la formación de un jabón o detergente mediante una reacción de saponificación entre el hidróxido de amonio y un ácido graso, en este caso, ácido oleico.

Por lo tanto, podemos decir que es posible la modificación de las NPM por medio de AO puro en un intervalo de 150 a 300 mg, pero por encima de estas cantidades no es posible obtener sistemas homogéneos debido a la generación de un jabón y a la agitación.

4. Inclusión de las NPM en NPP.

4.1. Preparación de las NPP.

Se incluyeron NPM en NPP obtenidas mediante un método previamente establecido en nuestro grupo de trabajo (Mendoza-Muñoz, Piñon-Segundo et al.). Se prepararon sistemas de NPP como se muestra en la Fig. 17 añadiéndose cierta cantidad de NPM previamente funcionalizadas en la fase que contiene el PLGA y

acetato de etilo para poder formar una recubierta polimérica sobre las nanopartículas, y de esta manera facilitar su inclusión en las NPP.

Visiblemente es posible apreciar que las NPM se incluyeron en las NPP, debido a una modificación en el color de la emulsión; debido a que la emulsión obtenida sin las partículas metálicas es de un color blanco, mientras que los sistemas que contienen las NPM presentan una coloración café con variación en la intensidad de color dependiendo de la cantidad de partículas añadidas (Fig. 28), por lo tanto, es factible la obtención de sistemas formados por NPM-NPP.

4.2. Inclusión de las NPM en la matriz polimérica de las NPP.

Se prepararon 100 mL de una suspensión de NPM funcionalizadas con AO a una concentración de Fe_3O_4 de $26.31 \mu\text{g/mL}$ en cloroformo. La suspensión anterior se utilizó para la preparación de los sistemas NPM-NPP con cantidades crecientes de las NPM de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mL. Los sistemas fueron elaborados en las mismas condiciones y de manera rápida debido a que el cloroformo puede evaporarse y con eso, modificar la cantidad de Fe_3O_4 agregada.

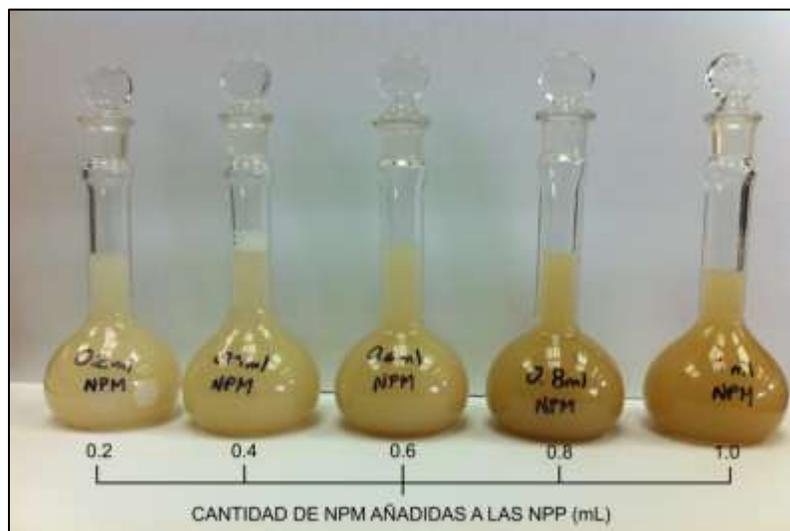


Fig. 28. Modificación de la cantidad de NPM añadidas a cada sistema de NPP.

4.3. Determinación de la cantidad de Fe_3O_4 incluido en las NPP.

a. Curva de calibración.

Para la cuantificación de Fe_3O_4 en los sistemas que contienen a las NPM se elaboró una curva de calibración. Se utilizó sulfato ferroso amoniacal hexahidratado 99.999 % (Sigma-Aldrich, USA) como estándar, para la realización de una cuantificación espectrofotométrica a 510 nm. La cuantificación de las muestras es llevada a cabo por la disolución en ácido sulfúrico concentrado en presencia de clorhidrato de hidroxilamina, utilizando acetato de sodio para ajustar el pH; además, se empleó 1,10-fenantrolina monohidratada para la formación del complejo colorido que nos ayudó a la determinación de Fe.

La reacción entre el ion ferroso y la 1,10-fenantrolina para formar un complejo que va de color naranja a rojo en un pH entre 6 y 9, es utilizado como un método sensible para la determinación de hierro (Sandell, 1959) (Fig. 29).

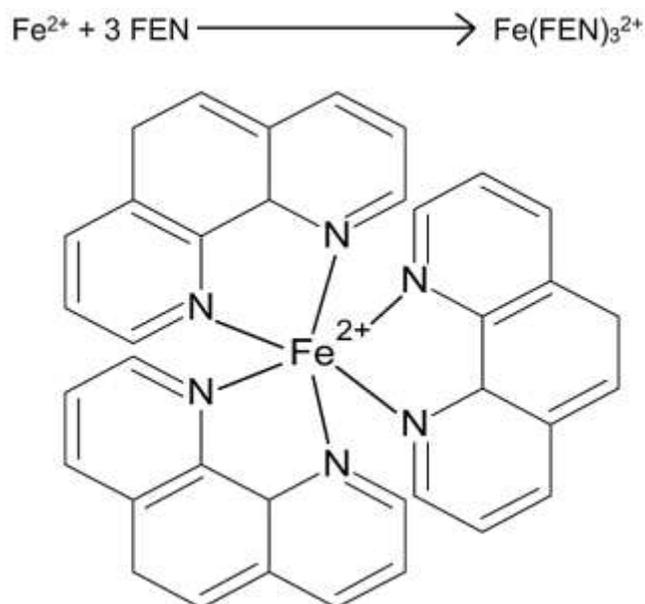
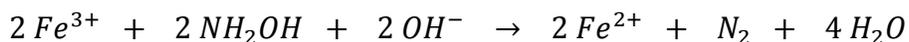


Fig. 29. Representación esquemática de la formación del complejo FEN-Fe (Sandell, 1959).

La absorptividad molar del complejo $[(C_{12}H_8N_2)_3Fe]^{2+}$, es 11,100 a 508 nm. La intensidad de color depende del pH en un rango de 2 a 9. El complejo es muy estable y la intensidad de color no cambia apreciablemente por largos periodos, obedeciendo la Ley de Beer (Sandell, 1959). El hierro debe encontrarse en su estado ferroso y para esto se adiciona un agente reductor antes del desarrollo de color. La hidroxilamina, en su forma de clorhidrato, puede ser utilizada para reducir cualquier ión férrico que esté presente según la siguiente reacción:



El pH debe ser ajustado a un valor entre 6 y 9 mediante la adición de acetato de sodio (Furman, 1952).

Para la curva de calibración se pesaron 0.0205 g de estándar de Fe^{2+} con 1 mL de ácido sulfúrico concentrado dentro de un matraz volumétrico de 250 mL. Se llevó a la marca de aforo con agua desoxigenada. Posteriormente se elaboró cada sistema de acuerdo a la Tabla 3 (Fig. 30).

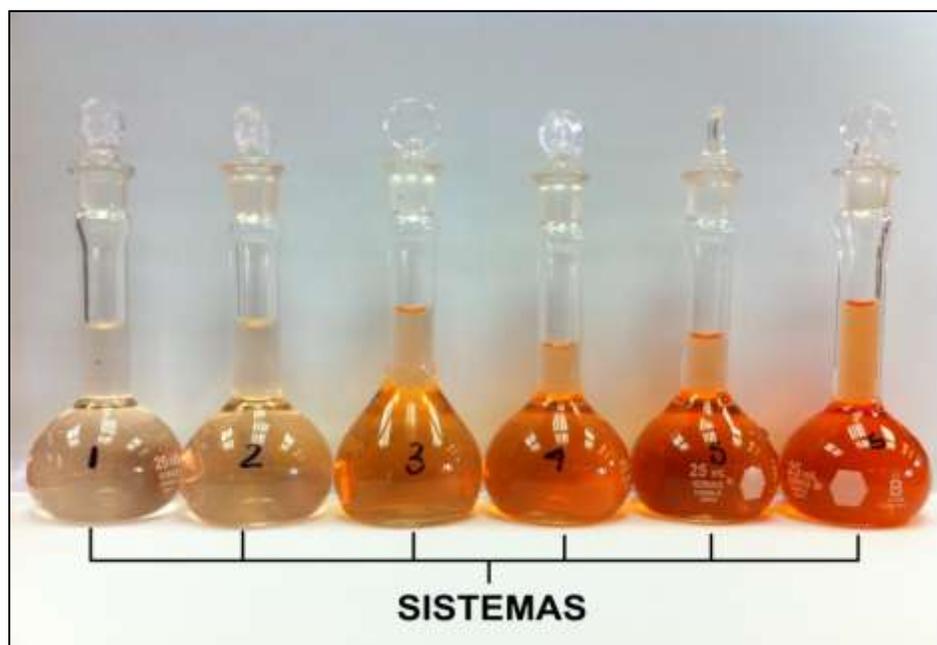


Fig. 30. Sistemas utilizados para la curva de Calibración en la cuantificación de hierro mediante la formación de un complejo con FEN.

Cada sistema fue leído por triplicado a 510 nm, los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 7 en la que se determinó el C.V.; además del Gráfico 3 donde se hace el análisis de linealidad de la misma.

Tabla 7 Curva de Calibración de Fe^{2+} .

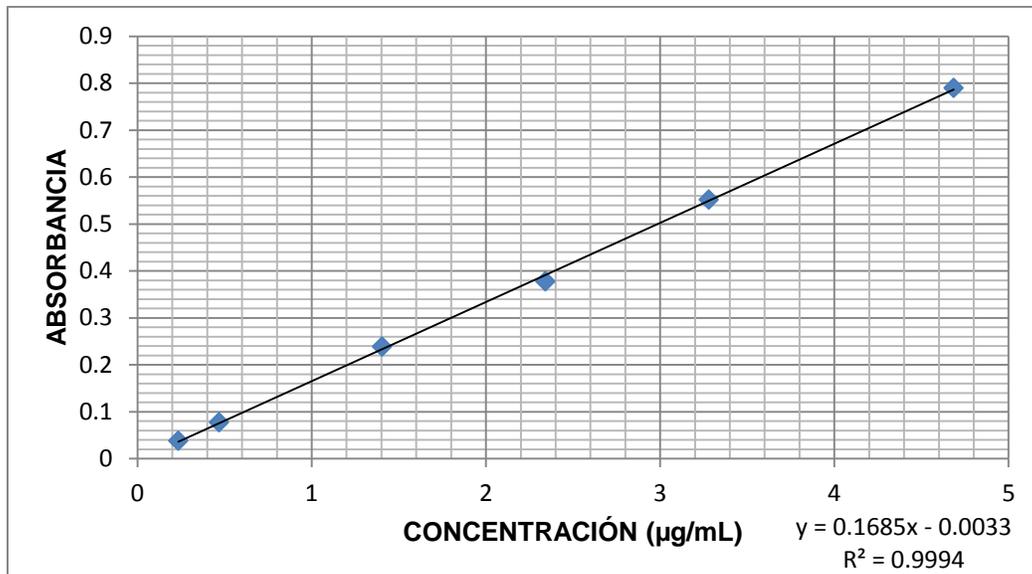
SISTEMA	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	α (ABS/CONC)
1	0.0379	0.2343	0.1618
	0.0387		0.1652
	0.0385		0.1643
2	0.0769	0.4686	0.1641
	0.0774		0.1652
	0.0771		0.1645
3	0.2384	1.4057	0.1696
	0.2321		0.1651
	0.2365		0.1682
4	0.3776	2.3429	0.1612
	0.3752		0.1601
	0.3803		0.1623
5	0.5519	3.2800	0.1683
	0.5517		0.1682
	0.5527		0.1685
6	0.7897	4.6857	0.1685
	0.7813		0.1667
	0.7904		0.1687

DESV.STD	0.0029
PROMEDIO	0.1656
C.V. (%)	1.7650

La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos en la elaboración de la curva de calibración del ion Fe^{2+} , cada punto fue preparado por triplicado. Se determinó el

coeficiente de absorptividad molar y se obtuvieron algunos parámetros estadísticos como la desviación estándar, el promedio y con ello el C.V., el cual es de 1.765 %, lo cual es $<2\%$ (CIPAM, 2006), por lo tanto, es factible el uso de esta curva de calibración para la cuantificación de hierro en las muestras.

Gráfico 3. Curva de Calibración para la cuantificación de Fe^{2+} mediante espectrofotometría y sus parámetros de regresión.



El Gráfico 3 muestra la representación gráfica de las lecturas obtenidas en absorbancia vs concentración, del cual se obtuvo la ecuación de la línea recta y el coeficiente de correlación el cual muestra un valor $>99\%$. Este criterio, junto con el C.V. $<2\%$ son parámetros suficientes para considerar útil esta curva de calibración.

b. Preparación de la muestra.

Para la determinación de la cantidad de Fe_3O_4 incluida en las NPP, los sistemas fueron colocados en un vial de manera individual, congelados a -20°C y liofilizados durante 48 h a una presión $<100\ \mu\text{bar}$. Posteriormente los sistemas liofilizados fueron pesados con exactitud dentro de un crisol, el crisol con la muestra fue expuesto a la flama de un mechero para quemar toda la materia orgánica presente

llevando la muestra hasta la obtención de cenizas, las cuales fueron colocadas en una mufla previamente calentada a 300 °C durante 2 horas para la incineración completa.

Transcurrido el tiempo, los crisoles fueron sacados de la mufla y enfriados a temperatura ambiente, posteriormente se adicionó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado para la recuperación del hierro presente.

La muestra con ácido sulfúrico fue llevada a la marca de aforo en un matraz volumétrico de 100 mL con agua desoxigenada, enseguida se tomó una alícuota con la ayuda de una pipeta volumétrica de 5 mL y este volumen se colocó dentro de un matraz volumétrico de 25 mL, a continuación se adicionó la cantidad suficiente de acetato de sodio para que la solución se encuentre en un rango de pH entre 6 y 9, ajustado el pH se adicionó 1 mL de clorhidrato de hidroxilamina, y finalmente, se agregaron 2.5 mL de 1,10-ortofenantrolina llevando cada sistema a la marca de aforo con agua desoxigenada. Se dejó reposar la muestra por aproximadamente una hora para la garantizar el desarrollo completo de color.

En la Tabla 8, se muestra la cantidad de mg de Fe_3O_4 añadido por sistema de NPM-NPP; mientras que en la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación, la cual fue realizada a 510 nm por triplicado en un espectrofotómetro UV-Visible.

Tabla 8. Cuantificación de Fe embebido en las NPP por espectrofotometría.

SISTEMA NPM-NPP	CANTIDAD DE NPM AÑADIDAS (mL)	mg de Fe_3O_4 adicionados
1	0.2	0.6314
2	0.4	1.2629
3	0.6	1.8943
4	0.8	2.5258
5	1.0	3.1572

En la Tabla anterior se muestra la cantidad de Fe_3O_4 adicionado a cada uno de los sistemas NPM-NPP para poder hacer una comparación de la cantidad incluida.

Tabla 9. Cuantificación de Fe_3O_4 embebido en las NPP.

SISTEMA	PESO DE MUESTRA (mg)	ABS	mg DE Fe_3O_4 EMBEBIDOS EN LAS NPP	\bar{X} (mg)	% EMBEBIDO	\bar{X} (%)
1	82.3	0.1363	0.0686	0.0684	10.8720	10.8331
		0.1352	0.0681		10.7864	
		0.1359	0.0684		10.8409	
2	67.1	0.1734	0.0869	0.0862	6.8801	6.8282
		0.1702	0.0853		6.7555	
		0.1726	0.0865		6.8490	
3	80.9	0.1786	0.0894	0.0880	4.7219	4.6431
		0.1727	0.0865		4.5687	
		0.1754	0.0879		4.6388	
4	42.3	0.2001	0.1000	0.1002	3.9599	3.9664
		0.2007	0.1003		3.9716	
		0.2005	0.1002		3.9677	
5	44.5	0.8152	0.4025	0.4051	12.7481	12.8296
		0.8267	0.4081		12.9272	
		0.8194	0.4045		12.8135	

En la Tabla 9 se observa la cantidad de Fe_3O_4 embebida en las NPP obtenida después del procesamiento de la muestra, así como la determinación del porcentaje incluido con referencia a la cantidad previamente adicionada, los cuales se representan en los Gráficos 4 y 5, respectivamente.

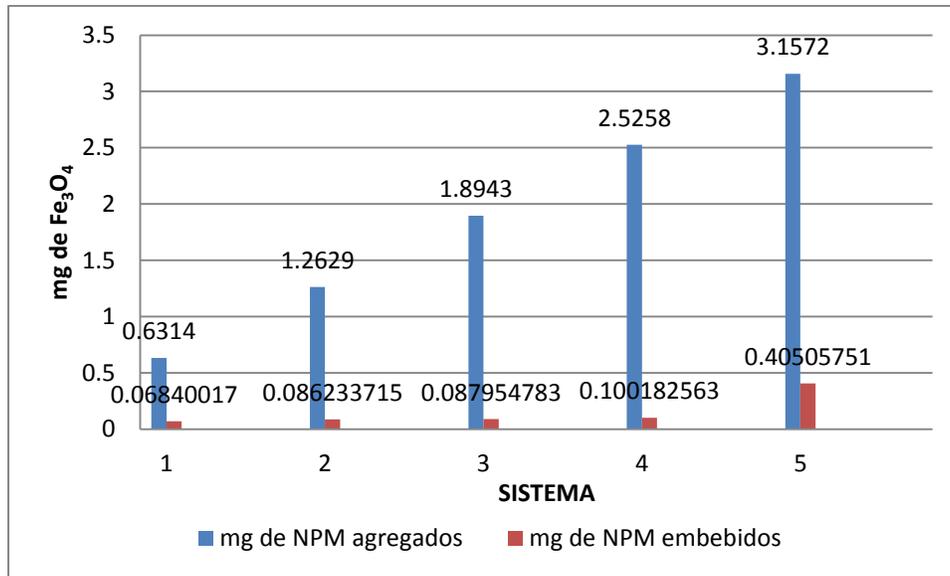


Gráfico 4. Comparación entre la cantidad agregada y embebida de Fe_3O_4 en las NPP.

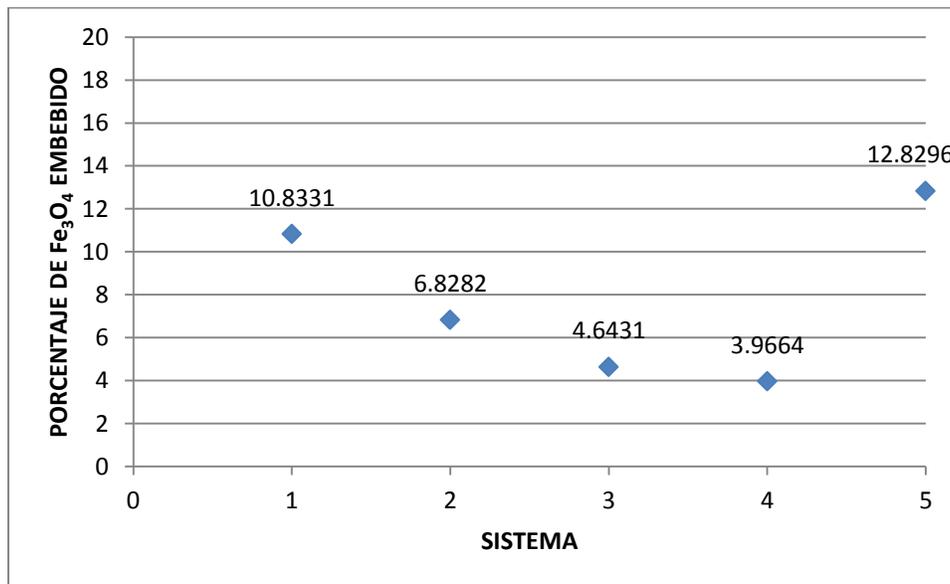


Gráfico 5. Comparación del porcentaje de Fe_3O_4 embebido en los sistemas NPM-NPP.

En el Gráfico 4 se observa la cantidad de Fe_3O_4 embebida en las NPP con respecto a la cantidad previamente añadida, en la cual podemos confirmar lo que se observa en la Fig. 30, en la que se observan los sistemas NPM- NPP elaborados con una variación en la intensidad de color en relación a la cantidad de las NPM añadidas, por lo tanto, podemos decir que aunque en cantidades muy pequeñas es posible observar la relación entre el color de los sistemas y la

cantidad de Fe_3O_4 cuantificada que va de menos a más; sin embargo, al calcular el % de Fe_3O_4 embebido en cada uno de los sistemas (Gráfico 5.) se puede observar que no hay una relación clara entre las preparaciones.

En este caso podemos concluir que a mayor cantidad de las NMP adicionadas a las NPP, mayor será la cantidad atrapada por cada uno de los sistemas, por otro lado, no fue posible determinar una cantidad de saturación de los sistemas debido a las cantidades empleadas; sin embargo se requiere de una prueba visible como lo es HR-TEM para la visualización y confirmación de la inclusión de las NPM en las NPP.

VII. CONCLUSIONES

Se logró sintetizar partículas magnéticas de Fe_3O_4 de tamaño nanométrico (<10 nm) mediante el método de co-precipitación en atmósfera libre de oxígeno por burbujeo de nitrógeno. Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron en: tamaño, morfología, identidad (XRPD) y algunas propiedades magnéticas (susceptibilidad magnética y curva de histéresis), comprobándose su identidad química y su comportamiento superparamagnético. De la misma manera fue posible optimizar el método de síntesis, por una variación en la cantidad de hidróxido de amonio, citrato de sodio para la obtención de las NPM.

Las NPM obtenidas por el método de síntesis desarrollado se funcionalizaron satisfactoriamente con AO; estas NPM funcionalizadas se incluyeron en la matriz polimérica de las NPP, formada por PLGA, para posteriores aplicaciones biomédicas de diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades.

Fue posible determinar la cantidad de Fe_3O_4 , correspondiente a las NPM, que fue embebido en las NPP por medio de una cuantificación espectrofotométrica UV-Visible, mediante la formación de un complejo colorido formado por Fe^{2+} y 1,10-Fenantrolina, lo cual nos permitió saber el % de Fe_3O_4 que es atrapado dentro de la matriz polimérica de las NPP.

En general, se obtuvieron NPM de Fe_3O_4 de un tamaño menor a 10 nm, las cuales fueron caracterizadas, funcionalizadas con AO e incluidas dentro de un sistema NPM-NPP para aplicaciones biomédicas en medicina humana y veterinaria como agentes de contraste, acarreadores de fármacos, entre otros.

VIII. PERSPECTIVAS

Dentro de las perspectivas para este trabajo está el estudio de otras variables en la síntesis que influyen en el tamaño y estabilidad de las partículas como lo es la temperatura y la modificación de la atmosfera con argón, así como una caracterización más extensa. Otro de los puntos a tratar sería el poder separar los aglomerados de partículas (observados por MET) por métodos físicos como lo es el ultrasonido, para que de esta manera, se pudieran obtener núcleos aislados con la capacidad de ser funcionalizados y empleados para fines biomédicos.

Realizar observaciones por HR-TEM de las NPM y de los sistemas elaborados para la comprobación de la inclusión de las NPM en las NPP de manera visual, así como poder observar la morfología de estos sistemas y el tamaño de las partículas.

Continuar con estudios *in vivo* de los sistemas ya optimizados, para determinar la viabilidad de emplear estos sistemas en el área de la medicina veterinaria y humana como agentes de contraste; además, de poder utilizar estos sistemas como acarreadores de fármacos y otras aplicaciones biomédicas como lo es el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

IX. REFERENCIAS

- Badruddoza, A. Z., Hidajat, K., et al. "Synthesis and characterization of beta-cyclodextrin-conjugated magnetic nanoparticles and their uses as solid-phase artificial chaperones in refolding of carbonic anhydrase bovine." *J Colloid Interface Sci* 346(2) (2010): 337-346.
- Bee, A., Massart, R., et al. "Synthesis of very fine maghemite particles." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 149(1-2) (1995): 6-9.
- Bilati, U., Allemann, E., et al. "Sonication parameters for the preparation of biodegradable nanocapsules of controlled size by the double emulsion method." *Pharm Dev Technol* 8(1) (2003): 1-9.
- CIPAM "Buenas prácticas de validación." (2006).
- Chen, Q., Rondinone, A. J., et al. "Synthesis of superparamagnetic $MgFe_2O_4$ nanoparticles by coprecipitation." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 194(1-3) (1999): 1-7.
- Dias, A. M. G. C., Hussain, A., et al. "A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides." *Biotechnology Advances* 29(1) (2011): 142-155.
- Falicov, L. M. *Diamagnetism*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, (2003).
- Fan, C., Gao, W., et al. "Tumor selectivity of stealth multi-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles." *International Journal of Pharmaceutics* 404(1-2) (2011): 180-190.
- Feng, B., Hong, R. Y., et al. "Synthesis of Fe_3O_4 /APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging." *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 328(1-3) (2008a): 52-59.
- Figuerola, A., Di Corato, R., et al. "From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications." *Pharmacological Research* 62(2) (2010): 126-143.
- Furman, N. H. "Colorimetric determination of traces of metals. 2nd ed. : By , Professor of Analytical Chemistry, University of Minnesota, Minneapolis, Minn." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 36(1) (1952): 247-248.

- Gómez-Lopera, S. A., Plaza, R. C., et al. "Synthesis and Characterization of Spherical Magnetite/Biodegradable Polymer Composite Particles." *Journal of Colloid and Interface Science* 240(1) (2001): 40-47.
- Hong, R. Y., Feng, B., et al. "Synthesis, characterization and MRI application of dextran-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles." *Biochemical Engineering Journal* 42(3) (2008b): 290-300.
- Hong, R. Y., Li, J. H., et al. "Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles without inert gas protection used as precursors of magnetic fluids." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 320(9) (2008c): 1605-1614.
- Hyeon, T., Lee, S. S., et al. "Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Maghemite Nanocrystallites without a Size-Selection Process." *Journal of the American Chemical Society* 123(51) (2001): 12798-12801.
- Kandori, K., Kawashima, Y., et al. "Effects of citrate ions on the formation of monodispersed cubic hematite particles." *Journal of Colloid and Interface Science* 152(1) (1992): 284-288.
- Khan, A. "Preparation and characterization of magnetic nanoparticles embedded in microgels." *Materials Letters* 62(6-7) (2008): 898-902.
- Klibanov, A. L. "Targeted delivery of gas-filled microspheres, contrast agents for ultrasound imaging." *Adv Drug Deliv Rev* 37(1-3) (1999): 139-157.
- Lee, J., Isobe, T., et al. "Magnetic properties of ultrafine magnetite particles and their slurries prepared via in-situ precipitation." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 109(1996): 121-127.
- Liu, Z. L., Yang, X. B., et al. "Preparation and characterization of magnetic P(St-co-MAA-co-AM) microspheres." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 302(2) (2006): 529-535.
- Lu, A.-H., Salabas, E. L., et al. "Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application." *Angewandte Chemie International Edition* 46(8) (2007): 1222-1244.
- M. Sosa, T. C., J.J. Bernal, et al. "Medición de las susceptibilidad magnética de sustancias líquidas en el laboratorio de física." *Revista Mexicana de Física* 52(2) (2004): 111-115.

- Mahmoudi, M., Sant, S., et al. "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy." *Advanced Drug Delivery Reviews* In Press, Corrected Proof(2010).
- Mendoza-Muñoz, N., Piñon-Segundo, E., et al. "Preparación y evaluación in vitro de nanopartículas poliméricas biodegradables como agente de contraste para ultrasonido." *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 10(1) (2007): 9-15.
- Murray, C. B., Norris, D. J., et al. "Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E=sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites." *Journal of the American Chemical Society* 115(19) (1993): 8706-8715.
- Neuberger, T., Schöpf, B., et al. "Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293(1) (2005): 483-496.
- Neveu, S., Bee, A., et al. "Size-Selective Chemical Synthesis of Tartrate Stabilized Cobalt Ferrite Ionic Magnetic Fluid." *Journal of Colloid and Interface Science* 255(2) (2002): 293-298.
- Park, S.-J., Kim, S., et al. "Synthesis and Magnetic Studies of Uniform Iron Nanorods and Nanospheres." *Journal of the American Chemical Society* 122(35) (2000): 8581-8582.
- Peng, X., Wickham, J., et al. "Kinetics of II-VI and III-V Colloidal Semiconductor Nanocrystal Growth: "Focusing" of Size Distributions." *Journal of the American Chemical Society* 120(21) (1998): 5343-5344.
- Quintanar-Guerrero, D., Allemann, E., et al. "Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation." *Int J Pharm* 188(2) (1999): 155-164.
- Redl, F. X., Black, C. T., et al. "Magnetic, Electronic, and Structural Characterization of Nonstoichiometric Iron Oxides at the Nanoscale." *Journal of the American Chemical Society* 126(44) (2004): 14583-14599.

- Samia, A. C. S., Hyzer, K., et al. "Ligand Effect on the Growth and the Digestion of Co Nanocrystals." *Journal of the American Chemical Society* 127(12) (2005): 4126-4127.
- Sandell, E. B. "Colorimetric Determination of Traces of Metals." Interscience Publishers(1959).
- Sun, S.Zeng, H. "Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles." *Journal of the American Chemical Society* 124(28) (2002): 8204-8205.
- Sun, S., Zeng, H., et al. "Monodisperse MFe_2O_4 (M=Fe, Co, Mn) Nanoparticles." *Journal of the American Chemical Society* 126(1) (2003): 273-279.
- Sundaresan, A.Rao, C. N. R. "Ferromagnetism as a universal feature of inorganic nanoparticles." *Nano Today* 4(1) (2009): 96-106.
- Tartaj, P., Morales, M. P., et al. "Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 290-291(Part 1) (2005): 28-34.
- Willis, A. L., Turro, N. J., et al. "Spectroscopic Characterization of the Surface of Iron Oxide Nanocrystals." *Chemistry of Materials* 17(24) (2005): 5970-5975.
- Yafet, Y. (2003). *Paramagnetism*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
- Yang, F., Li, Y., et al. "Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-embedded encapsulated microbubbles as dual contrast agents of magnetic resonance and ultrasound imaging." *Biomaterials* 30(23-24) (2009): 3882-3890.
- Yang, J., Park, S. B., et al. "Preparation of poly [ϵ]-caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier." *International Journal of Pharmaceutics* 324(2) (2006): 185-190.