



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro por ablación láser en medio acuoso

María José Rivera Chaverra

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física y Química
Manizales, Colombia

2020

Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro por ablación láser en medio acuoso

María José Rivera Chaverra

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias – Física

Director (a):

Ph.D. Elisabeth Restrepo Parra

Codirector (a):

Ph.D. Rogelio Ospina Ospina

Línea de Investigación:

Nanomateriales

Grupo de Investigación:

Laboratorio de Física de Plasma

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física y Química
Manizales, Colombia

2020

A mis abuelitas que esta vez no pudieron acompañarme en este logro.

Agradecimientos

- A la Universidad Nacional de Colombia por ser mi alma máter.
- A mi directora y profesora Elisabeth Restrepo Parra por permitirme ser parte de su grupo de investigación, el cual crece cada día más gracias a su esfuerzo y labor.
- A mi co-director Rogelio Ospina Ospina por poner a mi servicio cada uno de los espacios de su laboratorio y sus referencias académicas.
- A los integrantes del Laboratorio de física del Plasma y a mis amigos por estar siempre prestos a servir y compartir su conocimiento.
- A mi familia por su apoyo y capacidad de asombro ante los temas de los que les hablo.

Resumen

Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro por ablación láser en medio acuoso

Actualmente, el diseño y síntesis de materiales en la escala de los nanómetros para aplicaciones biomédicas es de gran interés debido a sus características comparadas con las del mismo material en bulk. Entonces el estudio de estas características, así como la producción de dichos nanomateriales, constituye un área importante de estudio que no ha sido completamente investigado para la posible aplicación en este campo.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue producir muestras con nanopartículas de hierro por ablación láser en líquidos, con potenciales aplicaciones biomédicas y en el área de la hipertermia magnética. Para encontrar las condiciones experimentales que permitieran la producción de las nanopartículas, se realizaron experimentos a temperatura ambiente con un blanco de hierro puro (99,99% de pureza), cada muestra fue tomada durante 5 minutos de ablación láser en 10mL de agua Milli-Q a 90mJ, 173mJ, 279mJ y 370mJ respectivamente. La morfología de estas nanopartículas se determinó mediante las técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión por dispersión (STEM), confirmando que el tamaño de las partículas era del orden de nanómetros. También se observó una gran influencia de la potencia del láser en el tamaño de las partículas, provocada por la competencia entre la energía y la temperatura. La composición se determinó mediante difracción de rayos X y espectroscopía Raman, mostrando la presencia de magnetita, maghemita y hematita. Las mediciones de hipertermia mostraron que el aumento de temperatura de las nanopartículas (NPs) de óxido de hierro no se vio muy influenciado por el cambio de energía, la capacidad de calentamiento de las NPs magnéticas se cuantifica por la tasa de absorción específica (SAR), que tiende a disminuir al aumentar la energía, lo que indica una dependencia de estos valores de la concentración de nanopartículas.

Palabras clave: Nanopartículas, Ablación láser, óxido de hierro, Aplicaciones biomédicas.

Abstract

Synthesis of iron oxide nanoparticles by laser ablation in aqueous media

Currently, the design and synthesis of materials on the nanometer scale for biomedical applications is of great interest due to its characteristics compared to those of the same material in bulk. The study of these characteristics, as well as the production of said nanomaterials, constitutes an important area of study that has not been fully investigated for possible application in this field.

Therefore, the objective of this work was to produce samples with iron nanoparticles by laser ablation in liquids, with potential biomedical applications and in the area of magnetic hyperthermia. To find the experimental conditions that would allow the production of the nanoparticles, experiments were carried out at room temperature with a pure iron blank (99.99% purity), each sample was taken during 5 minutes of laser ablation in 10mL of Milli- water. Q at 90mJ, 173mJ, 279mJ and 370mJ respectively. The morphology of these nanoparticles was determined using dynamic light scattering (DLS) and transmission scattering electron microscopy (STEM) techniques, confirming that the size of the particles was on the order of nanometers. A large influence of laser power on particle size was also observed, caused by competition between energy and temperature. The composition was determined by X-ray diffraction and Raman spectroscopy, showing the presence of magnetite, maghemite and hematite. Hyperthermia measurements showed that the increase in temperature of iron oxide nanoparticles (NPs) was not greatly influenced by the energy change, the heating capacity of magnetic NPs is quantified by the specific absorption rate (SAR), which tends to decrease with increasing energy, indicating a dependence of these values on the concentration of nanoparticles.

Keywords: Laser ablation, nanoparticles, iron oxide, biomedical applications.

Contenido

1. Marco teórico	20
1.1 Nanopartículas de óxido de hierro.....	21
1.2 Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro.....	22
1.2.1 Coprecipitación.....	22
1.2.2 Hidrotermal.....	23
1.2.3 Sol gel.....	23
1.2.4 Ablación láser en medio líquido.....	23
1.3 Aplicación en Hipertermia magnética.....	26
1.3.1 Pruebas biológicas.....	26
1.3.2 Hipertermia magnética.....	28
2. Metodología	30
2.1 Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro por ablación láser.....	30
2.2 Caracterización composicional y estructural.....	32
2.2.1 XPS.....	32
2.2.2 EDS.....	33
2.2.3 XRD.....	33
2.2.4 Espectroscopia RAMAN.....	33
2.2.5 UV-vis.....	33
2.3 Caracterización morfológica.....	34
2.3.1 STEM.....	34
2.3.2 DLS.....	34
2.4 Evaluación.....	34
2.4.1 Pruebas biológicas.....	34
2.4.2 Hipertermia magnética.....	35
3. Resultados y análisis	37
3.1 DLS.....	37
3.2 STEM.....	40
3.3 XPS.....	40
3.4 EDS.....	41
3.5 UV-VIS.....	42
3.6 XRD.....	37
3.7 RAMAN.....	38
3.8 Pruebas biológicas.....	44
3.9 Hipertermia magnética.....	46
4. Conclusiones	48
5. Trabajos futuros	51
5.1 Contribuciones.....	51
5.2 Trabajos futuros.....	51

Lista de figuras

	Pág.
Ilustración 1. Modelo de una nanopartícula 3D	20
Ilustración 2. Formación de nanopartículas por ablación láser.	24
Ilustración 3. Esquema montaje experimental hipertermia magnética	30
Ilustración 4. Esquema del montaje para la producción de nanopartículas de óxido de hierro.	31
Ilustración 5. Espectros de alta resolución y deconvolución para las nanopartículas producidas a 173mJ. (a) Fe 2p y (b) O 1s.	40
Ilustración 6. Patrón de difracción de nanopartículas de óxido de hierro para diferentes energías.....	41
Ilustración 7. Espectros de absorción UV-visible para nanopartículas producidas con energías de láser de 90mJ, 173mJ, 279mJ y 370mJ.	42
Ilustración 8. Espectros Raman de nanopartículas de óxido de hierro en agua sintetizadas a diferentes energías de pulso.	44
Ilustración 9. Imágenes STEM para nanopartículas sintetizadas usando (a) 370 mJ, (b) 279 mJ, (c) 173 mJ y (d) 90 mJ con ablación láser.	39
Ilustración 10. Viabilidad celular para las muestras de las nanopartículas tomadas a 90 mJ, 173 mJ y 279 mJ.	45
Ilustración 11. Proliferación celular para las muestras de las nanopartículas tomadas a diferentes valores de energía, 90 mJ, 173 mJ y 279 mJ.	45
Ilustración 12. Medidas de hipertermia magnética para diferentes valores de energía de ablación.	47
Ilustración 13. Valores SAR para nanopartículas de óxido de hierro en función de la energía láser, utilizando un ajuste lineal y un ajuste Box Lucas.	48
Ilustración 14. Difracción de Rayos X por Ley de Bragg.....	53

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Características preliminares para la determinación de los parámetros de trabajo	31
Tabla 2. Pruebas preliminares con diferentes parámetros	32
Tabla 3. Parámetros de trabajo para sintetización de nanopartículas de óxido de hierro.32	
Tabla 4. Resumen de técnicas usadas para la caracterización de las nanopartículas de óxido de hierro.....	36
Tabla 5. Porcentaje atómico de nanopartículas producidas variando la energía del láser, calculado a partir del análisis EDS.	40
Tabla 6. Identificación de picos obtenidos en análisis Raman	43
Tabla 7. Tamaño promedio de partícula para diferentes valores de energía de ablación láser a partir de DLS y STEM.	38

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
<i>SAR</i>	Tasa específica de absorción, ajuste lineal	$\frac{W}{g}$	Ec. 1
<i>SAR_{B.L}</i>	Tasa específica de absorción, Box Lucas	$\frac{W}{g}$	Ec. 2
<i>Y</i>	Ecuación Box Lucas		Ec. 3

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>LAL</i>	Ablación láser en líquidos
<i>LPAL</i>	Ablación por láser pulsado
<i>MNPs</i>	Nanopartículas magnética
<i>NPs</i>	Nanopartículas
<i>UV-Vis</i>	Espectroscopia Ultravioleta - visible
<i>XRD</i>	Difracción de rayos X
<i>XPS</i>	Espectrometría fotoelectrónica X
<i>NPs</i>	Nanopartículas
<i>BL</i>	Box Lucas

Introducción

En los últimos años, los investigadores se han dedicado en gran medida al estudio de la producción y síntesis de nanopartículas para diferentes tipos de aplicaciones. Su importancia recae en las características que las nanopartículas poseen a diferencia de las características de los materiales en bulk de la misma composición; lo que se debe principalmente a los efectos de tamaño. Por ejemplo, los nanomateriales magnéticos, presentan unas propiedades excepcionales debido a que su tamaño es comparable al de los dominios magnéticos. [1]; además, las propiedades magnéticas y electrónicas se ven fuertemente influenciadas por los fenómenos de superficie, a medida que se reduce el tamaño [2][3].

Por tal razón, las nanopartículas exhiben propiedades fisicoquímicas únicas, tales como alta relación superficie/volumen, en algunos casos estas exhiben una fuerte respuesta magnética y baja toxicidad en función de su tamaño y forma, convirtiéndose en candidatos para una gran variedad de aplicaciones en áreas como grabación magnética [4], biomedicina [5][6] entre otras. Las nanopartículas magnéticas son empleadas en diferentes campos de aplicación como en nanotecnología, remediación bioambiental, fisicomedicina, ingeniería, entre otras; más específicamente, este tipo de nanoestructuras se han estado utilizando como apoyo al diagnóstico en imágenes de resonancia magnética, administración de medicamentos y su entrega dirigida, además de remoción de metales pesados de agua, crecimiento de plantas, catálisis, etc. [7][8][2]

Las nanopartículas de óxido de hierro como la magnetita (Fe_3O_4) y la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) son, las nanopartículas más comúnmente empleadas para aplicaciones biomédicas; esto se debe principalmente a que otros materiales altamente magnéticos como el cobalto y el níquel, son susceptibles a la oxidación y son tóxicos, lo que ha hecho que sean de poco interés en aplicaciones biomédicas [2].

Por otro lado, la magnetita y la maghemita poseen una estructura inversa de la espinela, $(\text{Fe}^{3+})(\text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+})\text{O}_4$ y se deriva de un empaquetado cúbico de oxígeno con cationes en los sitios tetraédricos y octaédricos intersticiales. [9] Donde Fe (II) y Fe (III) están desordenados en los sitios octaédricos, mientras que los tetraedros están completamente ocupados por el catión Fe (III). Desde el punto de vista de las propiedades magnéticas ambas fases son ferrimagnéticas aunque la magnetización y la saturación de la maghemita es inferior. Tras la exposición a la atmósfera ambiental, la superficie de los cristalitos de Fe_3O_4 a menudo se cubren con multicapas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. [10] Pero las nanopartículas de magnetita con diámetros menores a 30 nm exhiben un comportamiento superparamagnético, lo cual significa que, en ausencia de un campo magnético externo, estas partículas tienen magnetización cero debido a que poseen un dominio único, el superparamagnetismo ocurre por debajo de la temperatura de Curie, concretamente sucede en nanopartículas, ya que se consideran de monodominio y se supone que la magnetización es debida a un momento magnético gigante único el cual

es la suma de todos los momentos magnéticos individuales de los átomos de la nanopartícula [11]. Adicionalmente, presentan un mayor rendimiento en términos de estabilidad química y biocompatibilidad en comparación con NPs metálicas como NPs de cobalto y níquel [12].

L. Labusca, et, al. [13] informaron que las nanopartículas magnéticas de diversos tamaños y recubrimientos tienen buena compatibilidad con una gran variedad de tipos de células y tejidos. Así mismo, afirmaron que las nanopartículas de óxido de hierro no recubiertas no son tóxicas, no son genotóxicas y carecen de actividad hemolítica en contacto con la sangre, los resultados fueron demostrados a partir de medidas de proliferación y viabilidad celular.

Es importante además tener en cuenta que, el método de síntesis de los nanomateriales, y en este caso, las nanopartículas magnéticas, representa uno de los desafíos más importantes que determinarán la forma, el tamaño de partícula, la distribución de tamaños, la química de superficie de las partículas y, en consecuencia, las características para su aplicación. Desafortunadamente, el proceso de preparación, puede aumentar el impacto ambiental y el costo de producción.[14] Un inconveniente fundamental a la hora de producir las nanopartículas, y especialmente, a la hora de buscar su aplicación son los fenómenos de agregación y aglomeración. Esta aglomeración se debe a que su superficie es altamente reactiva, lo que las hace altamente inestable; por esta razón, generalmente se requiere que sean funcionalizadas, agregando un agente estabilizador, siendo casi siempre producidas en forma de coloide [15]

Algunas de las técnicas más empleadas para producir este tipo de nanopartículas son: ruta hidrotermal [16][17] síntesis verde [8], co-precipitación [18] y ablación láser, entre otras. La técnica de ablación láser particularmente ha despertado el interés de la comunidad científica como método de síntesis; por ejemplo, G.W. Yang et al,[19] registraron que la ablación con láser en líquidos ha demostrado ser un método de síntesis simple y limpio y que no requiere de condiciones ambientales extremas de temperatura y presión. Estas ventajas permiten combinar objetivos sólidos y líquidos para fabricar nanoestructuras compuestas con las funciones deseadas.

Sin embargo, el buen desempeño del método depende fuertemente de los parámetros de síntesis, donde uno de los parámetros más importantes es la energía de producción del material; esta energía, puede influenciar, la estructura, estequiometría, tamaño y cantidad del material, además de propiedades requeridas para su aplicación como magnetización y estabilidad.

En la literatura se encuentran reportes de nanopartículas de óxido de hierro producidas por ablación láser donde se han analizado los diferentes parámetros para su obtención, como es el caso de Jesica M. J. Santillán et. al. [20], Valery A. Svetlichnyi et. al [21] y Raid A. Ismail, et. al [22] que analizaron las características de las nanopartículas sumergidas en soluciones distintas, donde encontraron que por esta técnica se obtienen

diferentes fases de óxido y nitruro de hierro debido a los fenómenos físicos que allí ocurren.

Z. Yan et al, en el 2012 [23] reportaron la ablación por láser pulsado de materiales típicos en medios líquidos, estableciendo los parámetros a usar (Tipo de láser, longitud de onda, duración del pulso, frecuencia, fluencia, tiempo de ablación) y su posterior producto. Sin embargo, los autores también reportaron la falta de predicción de los productos producidos debido a las interacciones combinatorias que allí aparecen, esto implica un vacío en la información detallada para la reproducibilidad de estas nanopartículas.

Debido a las potenciales aplicaciones en campos terapéuticos o biomédicos y debido al alto impacto sobre la economía y la calidad de vida que avances tecnológicos en estos campos involucran, se ha mostrado interés en la investigación de nanopartículas de óxido de hierro en torno a nuevas técnicas para el tratamiento de cáncer como lo es la terapia térmica, especialmente en la terapia termo-magnética conocida como hipertermia magnética. Este tratamiento intracelular, que tiene como principal atracción la generación controlada y localizada de calor en objetivos biológicos como los tumores, ha encontrado una mayor eficiencia en comparación con los tratamientos estándar o como un tratamiento complementario a estos [24].

Los primeros resultados obtenidos en el campo de la hipertermia magnética con nanopartículas de óxido de hierro fueron investigados por Jordan et al. [25] con nanopartículas de pruebas de contraste de óxido de hierro contra un tumor cerebral. Más recientemente, Yasemian et al. [26] evaluaron el efecto de la temperatura de reacción de las mediciones de hipertermia magnética de nanopartículas de óxido de hierro obtenidas por el método de coprecipitación, donde estudiaron el tamaño, la estructura y como estas influenciaban en este tipo de tratamientos.

A pesar de los reportes nombrados, no se encontró mucha información hasta el alcance de esta investigación, donde se evidencie el efecto de la variación de la energía en la producción de nanopartículas de óxido de hierro en agua por ablación láser y en sus propiedades para posibles aplicaciones biomédicas, más específicamente hipertermia magnética.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es producir nanopartículas de óxido de hierro por el método de ablación láser en líquidos y posteriormente evaluar las propiedades composicionales y morfológicas en función de la energía del láser. Estas propiedades juegan un papel decisivo en el uso práctico de las nanopartículas en aplicaciones biomédicas. Lo que determina la importancia de este estudio.

OBJETIVOS

Objetivo general

Sintetizar nanopartículas de óxido de hierro mediante el método de ablación láser en un medio acuoso para posibles aplicaciones en hipertermia magnética.

Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de óxido de hierro por medio de ablación láser usando agua como solvente.
- Analizar características morfológicas, estructurales y composicionales de nanopartículas de óxido de hierro.
- Evaluar las características de hipertermia magnética de nanopartículas de óxido de hierro para posibles aplicaciones en biomedicina.

1. Marco teórico

La nanotecnología es un campo de investigación conocido desde el siglo pasado. Desde que el premio Nobel Richard P. Feynman presentó la "nanotecnología" durante su famosa conferencia "There's Plenty of Room at the Bottom" en 1959[27] se han realizado varios desarrollos revolucionarios en el campo de la nanotecnología. Dentro de este campo están las nanopartículas (NPs), hay una amplia clase que incluyen sustancias particuladas, que tienen una dimensión al menos de 100 nm [28]. Dependiendo de la forma general, estos materiales pueden ser 0D, 1D, 2D o 3D [29]. La importancia de estos materiales surgió cuando los investigadores descubrieron que el tamaño y forma pueden influir en las propiedades fisicoquímicas de dicha sustancia. Por ejemplo las nanopartículas de oro de tamaño mediano (90 nm) que están suspendidas se ven de color azul y cuanto más pequeñas, más rojizas esto debido a que las propiedades ópticas cambian con la variación del tamaño [30].

Las NPs no son moléculas simples y están compuestas por (a) una capa superficial, que puede funcionalizarse con una variedad de moléculas pequeñas, iones metálicos, tensioactivos y polímeros. (b) La capa de cubierta, que es un material químicamente diferente del núcleo en todos los aspectos, y (c) El núcleo, que es esencialmente la parte central de la NP y generalmente se refiere a la NP en sí[31]. Debido a tales características excepcionales, estos materiales despertaron un gran interés de los investigadores en campos multidisciplinarios[32].

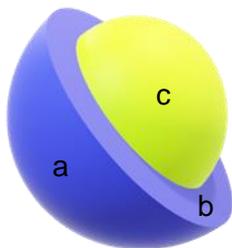


Ilustración 1. Modelo de una nanopartícula 3D. Elaboración fuente propia

En este capítulo se realiza un acercamiento a las nanopartículas, más específicamente a las nanopartículas de óxido de hierro y a los diferentes métodos de síntesis para su posible aplicación en hipertermia magnética.

1.1 Nanopartículas de óxido de hierro

Los óxidos de hierro son compuestos naturales comunes. Hay 16 óxidos de hierro, incluidos los óxidos, hidróxidos y óxidos-hidróxidos. Estos minerales son el resultado de reacciones en diversas condiciones redox y de pH. Tienen la composición básica de Fe, O y OH, pero difieren en la valencia del hierro y la estructura cristalina general. Algunos de los óxidos de hierro importantes son goethita, akaganeita, lepidocrocita, magnetita, maghemita y hematita.

Las nanopartículas de óxido de hierro consisten en partículas de maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) o magnetita (Fe_3O_4) con diámetros que varían de 1 a 100 nanómetros. Estas NPs han recibido una atención valiosa durante varias décadas debido a las importantes y diferentes aplicaciones que este puede tener [33]:

- a. Tales NPs constituyen los materiales clave detrás del reciente desarrollo de medios electrónicos regrabables.
- b. Las mejoras en su producción han llevado a una mayor eficiencia y a un tamaño reducido de componentes en muchos productos electrónicos.
- c. Pueden usarse en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades médicas y en la fabricación de sensores electrónicos.
- d. Representan un catalizador importante utilizado en la formación y rompimiento de los enlaces CC.
- e. Puede ser un reactivo eficaz para el tratamiento de productos químicos tóxicos y peligrosos, en el tratamiento de aguas contaminadas.

La importancia y características importantes para la aplicabilidad de estas nanopartículas se puede enumerar de la siguiente manera:

- a. Relación superficie/volumen, esta hace que las NPs se dispersen con facilidad en las soluciones, entre otras propiedades físicas, químicas y biológicas que difieren de dichas propiedades del material en bulk, esto debido al incremento de la energía interfacial, reactividad de la nanopartícula lo que produce la eficiencia en la absorción y la capacidad de hacerla funcional de forma eficiente con entidades moleculares de interés.
- b. Superparamagnetismo presentado en tamaños entre (2-20)nm, es decir su magnetización es cero, en ausencia de campo magnético externo y pueden ser magnetizados por una fuente magnética externa, esto permite la aplicación en el desarrollo electrónico. Donde podemos explicar el superparamagnetismo como resultado colectivo de tener muchas nanopartículas cuyos momentos magnéticos

están aleatoriamente ordenados en el espacio, los materiales magnéticos se pueden entender microscópicamente como regiones, denominadas dominios (que son aquellas zonas en la que se puede considerar una isotropía magnética y por tanto tienen la misma magnetización), separadas por paredes.

- c. Las nanopartículas tipo Fe_xO_y son biocompatibles y no tóxicas, esto las hace aptas para aplicaciones biomédicas.

1.2 Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro

Dependiendo del tamaño, la forma y composición química de las nanopartículas, se utilizan diferentes técnicas para la síntesis de las NPs de óxido de hierro, entre estas técnicas hay químicas y físicas o una combinación de ambas, donde se busca obtener nanopartículas con monodispersión en el tamaño y también una forma definida. Las técnicas más utilizadas para la obtención de nanopartículas se mencionarán a continuación y se mostrará de manera detallada los mecanismos involucrados en la síntesis de nanopartículas por ablación láser por ser el objeto de este estudio.

1.2.1 Coprecipitación

Este método se basa en el uso de sales de hierro disueltas [34]. Con el procedimiento se puede obtener un tamaño de partícula controlado, ajustando las condiciones experimentales en especial las sales (cloruros, sulfatos, nitratos), el pH y la fuerza iónica del medio. [35] Las desventajas del método son la necesidad de materiales precursores costosos y tóxicos, el tiempo de sintetización y la complejidad de las reacciones que ocurren en el proceso.

Pasos para la obtención nanopartículas de óxido de hierro por coprecipitación:

- a. Se calcula la relación molar designada. Basada en la reacción de reducción de sales de hierro (II) y (III) en presencia de una base fuerte, disuelta en agua desionizada.
- b. La mezcla se agita continuamente durante 45 minutos a 90°C en un baño de agua antes de enfriarse a temperatura ambiente.
- c. La precipitación producida se centrifuga y se lava con agua desionizada y luego con etanol.
- d. Después de secar a 75°C durante 4 horas, el polvo recogido se calcina lentamente a 650°C y se mantiene durante 2 horas. Y se obtiene el polvo de las nanopartículas de Fe_xO_y .

1.2.2 Hidrotermal

La síntesis hidrotérmica es un método relativamente poco explorado para la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro, aunque permite la síntesis de nanopartículas con morfología controlada, distribución estrecha de tamaños de partícula y excelente estequiometría a temperaturas relativamente bajas. El sistema consta de linoleato de metal (sólido), una fase líquida de etanol-ácido linoleico y una solución de agua-etanol a diferentes temperaturas de reacción en condiciones hidrotermales.

Este método se basa en un mecanismo general de transferencia y separación de fases que ocurre en las interfaces de las fases líquida, sólida y de solución presentes durante la síntesis.

El procesamiento hidrotermal es uno de los más prometedores para sintetizar nanopartículas cerámicas pero los precursores involucrados en esta síntesis son costosos.

1.2.3 Sol gel

El proceso sol-gel ofrece ventajas como buena homogeneidad, bajo costo y alta pureza utilizando precursores metalorgánicos. Aunque se pueden producir nanopartículas de óxido de hierro altamente cristalinas y de tamaño uniforme, estos procedimientos mencionados anteriormente no se pueden aplicar a la producción a gran escala y económica, porque requieren reactivos tóxicos con pasos sintéticos complicados.

Jing Xu, et al [36] describió su experimento de la siguiente manera: 0.2mol de nitrato férrico se disolvió primero en 100 ml de etilenglicol con agitación vigorosa durante 2 horas a 40°C, y luego el sol se calentó a 80°C y se mantuvo a la temperatura para obtener un color marrón gel. El gel se envejeció durante 2h y luego se secó a 120°C durante aproximadamente 4h. Después del secado, el xerogel se recoció en el rango de temperatura 200-400°C al vacío. Finalmente, se sintetizaron nanopartículas de magnetita de diferentes tamaños.

1.2.4 Ablación láser en medio líquido

En 1960 se informó por primera vez la irradiación con láser para desprender material de un objetivo. Poco después, se desarrolló la ablación con láser pulsado (PLA) de materiales sólidos, la cual ha atraído atención por su gran potencial en el procesamiento de materiales como la preparación de películas delgadas, crecimiento de nanocristales, limpieza de superficies y fabricación de dispositivos microelectrónicos [19].

El trabajo pionero sobre PLA de sólidos en confinamiento líquido para el procesamiento de materiales fue reportado en 1987 [37] por Patil y sus colaboradores. Sintetizaron la fase metaestable del óxido de hierro con un blanco de hierro en agua.

La diferencia más importante entre la ablación láser de sólidos en vacío o gas y en líquidos, es que la ablación láser en medio líquido se emplea para confinar la pluma de plasma en una pequeña región para dispersar directamente las nanopartículas en la fase líquida. En cualquier caso, el medio debe seleccionarse cuidadosamente porque las partículas generadas por láser reaccionan fácilmente con las moléculas circundantes para crear complejos como los óxidos en el caso de LAL reactivo. Por lo tanto, bajo la condición de confinamiento en líquido se realizan los procesos de generación, transformación y condensación de la pluma de plasma.

Como se mencionaba anteriormente existen dos métodos dentro de la ablación láser en medio líquido (LAL): el método reactivo y el método no reactivo. En el método LAL no reactivo las especies sintetizadas no reaccionan con el medio líquido que las rodea[38], de esta forma las nanoestructuras tienen la misma composición que el blanco utilizado, un ejemplo son las nanopartículas metálicas de Oro, Platino y Plata [39]. Y en el método LAL reactivo las especies sintetizadas a partir de la ablación reaccionan con el medio líquido que las rodea y, por lo tanto, las nanoestructuras formadas tienen una composición diferente a la del blanco utilizado en el proceso de síntesis. De esta forma, la producción de óxidos, hidróxidos, carburos, sulfuros y nitratos puede ser diseñada por medio de la reacción entre el blanco y el medio líquido[40]. Las nanopartículas de óxido de hierro son producidas por LAL reactivo.

Concepto básico

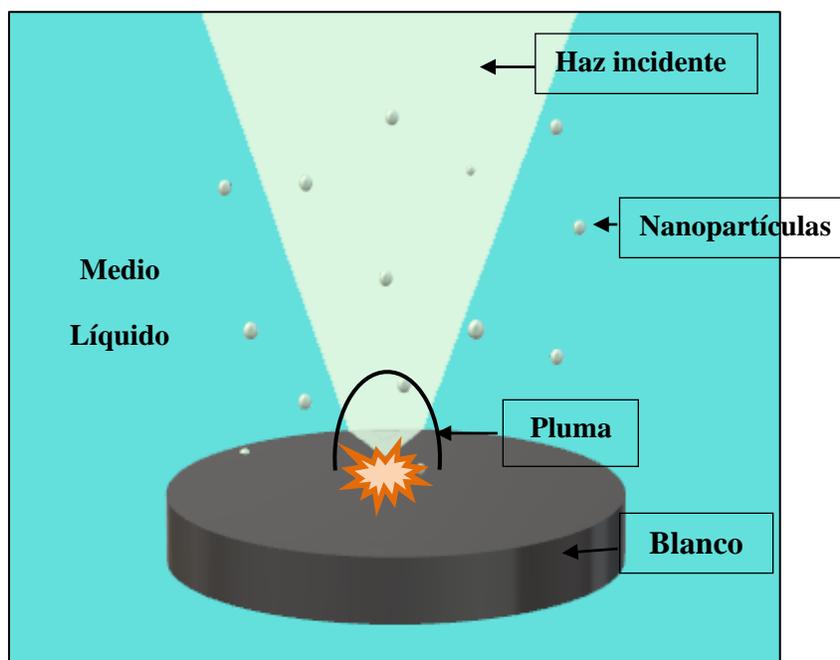


Ilustración 2. Formación de nanopartículas por ablación láser.

Cuando el rayo láser se focaliza en la superficie de un material objetivo sólido en el medio líquido, la temperatura del punto irradiado aumenta rápidamente, evaporando el material objetivo.

Las colisiones entre las especies evaporadas (átomos y grupos) y las moléculas circundantes dan como resultado la excitación del estado electrónico junto con la emisión de luz y la generación de electrones e iones, formando una pluma de plasma inducida por el láser. El plasma inducido por el láser se expande adiabáticamente a una velocidad supersónica para crear una onda de choque bajo el confinamiento del líquido, cuando absorbe la parte posterior del pulso láser y obtiene un suministro continuo de las especies evaporadas del objetivo sólido [19]. Las estructuras de plasma (tamaño de la pluma y su espectro de emisión) dependen del blanco, los medios ambientales (líquido o gas), la presión ambiental y las condiciones del láser.

Para la producción de nanopartículas del tamaño y estructura deseados, la selección de un sistema láser adecuado es fundamental. La velocidad de evaporación del material objetivo generalmente está determinada por los parámetros del láser (fuente láser, longitud de onda, fluencia, ancho de pulso y frecuencia), la eficiencia de absorción de luz del material objetivo y la condición del medio ambiente.

Parámetros del láser

Los parámetros usados durante el proceso de ablación se seleccionan de acuerdo con el blanco o material a usar (cada material tiene una velocidad de evaporación) y a su vez dependen de las características estructurales, composicionales y morfológicas que se desean para las nanopartículas a sintetizar.

a. Tiempo de ablación

Hidayah, A.N [41] mostró que a diferentes tiempos de ablación se presentan diferentes propiedades ópticas y estructurales. Esto debido a que a medida que se aumenta la concentración por el aumento del tiempo se podrían generar procesos de agregación y atenuación del haz. Además, con el aumento del tiempo se empieza a generar la fragmentación de partículas existentes debido al aumento de la temperatura del blanco que a su vez es transferida al medio líquido.

b. Duración del pulso

La duración del pulso depende del tiempo en el cambio del último nivel de energía de los electrones de cada material, para láseres del orden de fs la duración del pulso es más corta que dicho tiempo. Para pulsos de ns es considerado un proceso de ablación térmico, el cual involucra calentamiento y fundición por láser. Para láseres con pulsos de ps pueden producir efectos térmicos o una transición vapor - sólido dependiendo de la duración del pulso. [42][43]

c. Longitud de onda

La longitud de onda determina el umbral de ablación para los metales, la profundidad de la penetración del haz, y a su vez la profundidad de la ablación. La profundidad de penetración de un láser pulsado de 532 nm en un blanco es menor que la de un láser pulsado de 1064 nm, lo cual indica que la cantidad de nanopartículas generadas por pulso puede incrementar con la longitud de onda. [44]

Ventajas de la técnica

- a. Es una solución muy rentable para muchos procesos diferentes, es muy económico obtener nanopartículas con este método.
- b. Es amigable con el medio ambiente por su bajo consumo de energía y porque no se utilizan disolventes.
- c. Proporciona más precisión de síntesis para las características de NPs.
- d. Se puede utilizar para una amplia gama de composiciones.
- e. El tiempo de obtención de las nanopartículas es muy corto, se podría usar para una aplicación inmediata.

1.3 Aplicación en Hipertermia magnética.

El cáncer es una de las enfermedades de no transmisión más agresivas y que más ha cobrado vidas en la actualidad. En nuestro país, Colombia, se requieren estrategias modernas para el tratamiento de cáncer que mejoren la eficiencia del tratamiento o sirvan de tratamiento alternativos a los tradicionales.

Las células malignas son mucho más susceptibles al calentamiento. Por esto, recientemente, la hipertermia dirigida específicamente a células cancerígenas por medio del uso de nanopartículas magnéticas calentadas con campos magnéticos AC, ha sido usada como una nueva terapia contra el cáncer en otros países [45]. Es por esto que se muestra a continuación con detalle esta técnica y la evaluación biológica para su aplicación controlada en este campo.

1.3.1 Pruebas biológicas

Cada vez se están diseñando mayores cantidades de nanopartículas para muy diversas aplicaciones industriales y productos de consumo. A pesar de esto, se sabe que la exposición a ciertos tipos de nanopartículas puede causar graves efectos sobre la salud. Por lo tanto, resulta esencial comprobar si la exposición a ciertas nanopartículas provoca riesgos en la salud. Si estos riesgos no se evalúan y controlan debidamente, pueden tener consecuencias para la salud humana[46].

Los procesos de óxido reducción o REDOX (donde las moléculas aceptan electrones y son agentes oxidantes) son la base fundamental de un sin número de rutas bioquímicas y respuestas celulares. Un antioxidante (o agente reductor) se pueden clasificar como cualquier sustancia que es capaz de prevenir el daño oxidativo biológico. En cualquier organismo hay un mantenimiento continuo del equilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes, que está estrechamente regulado y es crucial para la homeostasis y la función celular.

La homeostasis del hierro, es un mecanismo endógeno ubicuo y evolutivo preservado en células de mamíferos [47]. Cuando las nanopartículas de óxido de hierro se mueven dentro de las microvesículas de las células, se degradan de manera dependiente del tiempo y tal vez se usan como depósito interno de hierro. La existencia de un mecanismo natural de eliminación de nanopartículas de óxido de hierro es crucial para la biodegradabilidad de estas nanopartículas, ofreciendo una ventaja constante sobre otras formas de nanopartículas [48].

A pesar de existir un mecanismo de eliminación natural en el cuerpo de dichas nanopartículas es necesario destacar que la citotoxicidad depende en gran medida de la concentración utilizada de nanopartículas y del nivel de exposición al agente durante el contacto celular. Por tanto, los estudios in vitro son absolutamente necesarios antes de pasar a los estudios in vivo.

El MTT es un método básico para evaluar la biocompatibilidad de los biomateriales cuando se estudia la citotoxicidad. Es una técnica simple, rápida, flexible y repetitiva. El principio es que la deshidrogenasa mitocondrial ámbar reduce el metil tiazolil tetrazolio a cristales de color púrpura. La cantidad de cristales de color púrpura se correlaciona positivamente con la cantidad y la función de las células vivas. Por lo tanto, el valor de absorbancia refleja indirectamente la cantidad y la actividad de las células[49]. Esta prueba se usó en este estudio para evaluar diferentes aspectos biológicos relacionados con la aplicación de las nanopartículas de óxido de hierro en el tratamiento de cáncer con hipertermia magnética, el detalle metodológico se muestra en el capítulo 3.

Los estudios de los efectos de la exposición del cuerpo humano a NPs óxido de hierro están adquiriendo cada vez mayor importancia, ya que éstas pueden ser absorbidas por los tejidos, incorporadas a células y unirse a biomoléculas dentro del cuerpo humano con gran rapidez y efectividad debido a sus dimensiones. Una vez que las NPs son absorbidas por el cuerpo, éste reacciona a través de uno o más de los siguientes posibles procesos: (i) la metabolización de las NPs, (ii) su almacenamiento y (iii) su excreción por algún mecanismo (a través del riñón, vía orina), cualquiera sea de estos procesos puede resultar en efectos agudos o crónicos incluyendo daños de tejidos y órganos.

Por tal motivo es importante conocer los efectos cito y genotóxicos de las NPs óxido de hierro de interés en un rango de concentraciones establecido en aquellas células que

están involucradas en el proceso de osteointegración, como es el caso de las células osteoblásticas.

Los osteoblastos son las células responsables de la formación y remodelación ósea y organización de la matriz extracelular del hueso (o fase orgánica) y de su posterior mineralización. La fase orgánica del tejido óseo está compuesta en un 90 % de colágeno tipo 1 y el restante 10 % por proteínas no colagénicas, tales como osteopontina, osteocalcina, proteína siálica ósea (BSP por sus siglas en inglés), proteína dentina de la matriz-L, etc. Siendo las células osteoblásticas las responsables de su síntesis y secreción hacia el medio extracelular. Todas estas proteínas están implicadas en menor o mayor medida con el proceso de biomineralización.

1.3.2 Hipertermia magnética

La hipertermia de nanopartícula magnéticas (MNH) se basa en inducir un campo magnético alterno con el fin de elevarla temperatura de las nanopartículas al someterlas a un campo de radiofrecuencia alterna (AMF, por sus siglas en inglés) [50]. La hipertermia tiene fines médicos como se mencionó anteriormente, en donde particularmente se calienta una zona del cuerpo humano que haya sido atacada por un tipo de cáncer con el fin de eliminarlo por el calentamiento que se produce[24].

La hipertermia con nanopartículas magnéticas se muestra como una terapia contra tumores efectiva si la concentración de partículas en el tumor es lo suficientemente alta y significativamente más alta que el del tejido normal circundante, y si las partículas poseen una tasa de absorción específica lo suficientemente alta para entregar dosis de calor intratumorales significativas con los AMF que sean tolerados por los tejidos normales [45].

El éxito de la hipertermia magnéticas con nanopartículas depende del desarrollo de nanopartículas magnéticas que tengan propiedades físicas y magnéticas precisamente controladas[51][52]. Para optimizar efectivamente las propiedades de las nanopartículas magnéticas para la hipertermia, es necesario desarrollar un entendimiento de los parámetros primarios que producen calor. Por lo tanto, una evaluación teórica de los mecanismos responsables del calentamiento por nanopartículas magnéticas, es necesaria para encontrar propiedades magnéticas y estructurales óptimas para sintetizar dichas nanopartículas a la medida para condiciones específicas de frecuencia y amplitud de AMF. En consecuencia, calcular el calor disipado por nanopartículas magnéticas que son sometidas a un AMF ha estado bajo investigación intensa recientemente[53].

Evaluación experimental de hipertermia de nanopartículas magnéticas

Los materiales ferromagnéticos sufren una magnetización y desmagnetización en presencia de un campo magnético alterno en un ciclo llamado histéresis. Cuando estos materiales se reducen a escala nanométrica, su magnetización cambia rápidamente en

direcciones aleatorias y también se ve afectada de la misma manera con la temperatura, obteniendo una magnetización de cero cuando no se aplica un campo magnético; este fenómeno se llama supramagnetismo.

Las nanopartículas supramagnéticas tienen un comportamiento paramagnético, pero con una susceptibilidad magnética mayor en presencia de un campo magnético. Por otra parte, cuando un CMA es ejercido sobre las nanopartículas, éstas comienzan a resonar generando calor [54]

La eficiencia de conversión de la energía absorbida por una nanopartícula del campo magnético alterno a calor se conoce como la tasa específica de absorción (SAR, siglas en inglés), la cual es la propiedad fundamental para aplicaciones de hipertermia. Está definida como la eficiencia de calor representada por la pérdida de potencia, la cual es medida en [W/g]. Para aplicaciones médicas, las nanopartículas deben generar un gran SAR. Esta generación depende de factores como la intensidad y frecuencia del campo magnético aplicado, la viscosidad del solvente, el tamaño de las partículas, la magnetización de saturación y la anisotropía magnética de las nanopartículas [55].

Un montaje experimental de hipertermia consta en la generación de un campo magnético RF en una solución acuosa en la cual las nanopartículas están inmersas. Luego se mide la variación de la temperatura en función del tiempo en presencia y ausencia del campo magnético. Debido a que la tasa específica de absorción de nanopartículas magnéticas es una medida de potencia es aconsejable realizar una medida de calorimetría. Sin embargo, esta es una aproximación compleja dando pie a otras alternativas más simples. Un método más práctico se basa en realizar los experimentos en condiciones adiabáticas, es decir, asumir que no existe intercambio de calor con el ambiente circundante. Esto se logra gracias a reducir el tiempo de medida a unos pocos segundos después que se prende el campo magnético [56].

Las instalaciones para medir SAR consisten en un generador de campo magnético alterno, un espacio delimitado por un aislante térmico, una bobina de cobre y un sensor de temperatura tipo fibra óptica o termocupla que no sean afectadas por corrientes parásitas generadas por el campo magnético como se muestra en la Figura 2.

En el protocolo de medición de SAR, se coloca la muestra con una determinada concentración de nanopartículas en el centro de la bobina donde el campo magnético es homogéneo. La temperatura es muestreada en intervalos de un segundo durante todo el experimento. Se coloca un campo magnético alterno con una frecuencia constante y se varía su intensidad p . Para evaluar la eficiencia de conversión energía magnética a térmica de las nanopartículas.

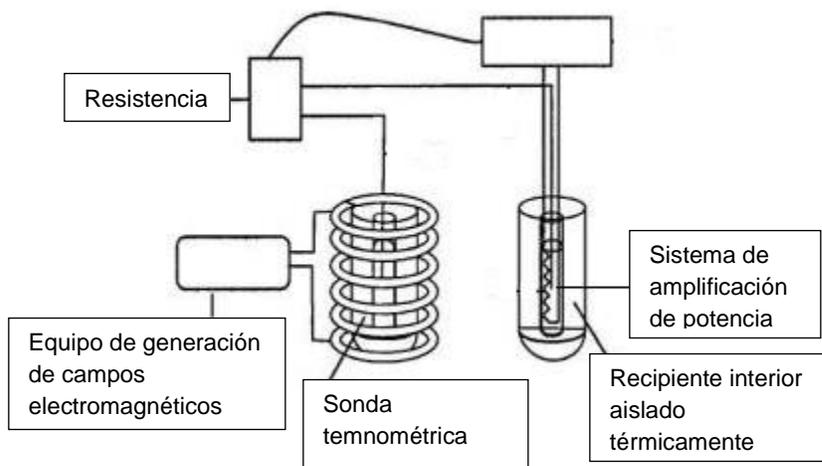


Ilustración 3. Esquema montaje experimental hipertermia magnética

2. Metodología

A continuación, se mostrará de forma detallada la metodología utilizada para la sintetización de las nanopartículas de óxido de hierro mediante la técnica de ablación láser, realizando variaciones en la energía de ablación como 90 mJ, 173 mJ, 279 mJ y 370 mJ y su posterior caracterización con técnicas morfológicas, composicionales, estructurales y de rendimiento.

2.1 Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro por ablación láser

Las nanopartículas de óxido de hierro se sintetizaron por el método de ablación láser, para ello inicialmente se realizó un pulido mecánico de un blanco de hierro de alta pureza (99.99%), se lavó con agua desionizada y posteriormente fue sometida a lavado en una cuba ultrasónica durante 10 minutos en alcohol isopropílico, seguido de un lavado con agua desionizada para iniciar con la síntesis de las nanopartículas.

El blanco fue puesto en un medio líquido en un beaker como se muestra en la figura 4.

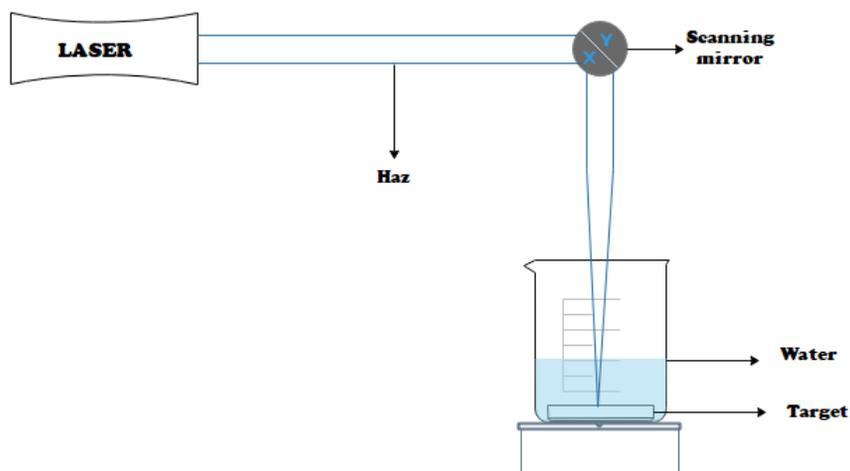


Ilustración 4. Esquema del montaje para la producción de nanopartículas de óxido de hierro.

El rayo láser se enfocó perpendicularmente a la superficie del objetivo. Se empleó un sistema de láser Q-smart 850 Nd: YAG de Quantel que es un cristal de estado sólido utilizado por los láseres, este bombea ópticamente usando un tubo flash para diodos láser, se usó a una longitud de onda de trabajo de 532 nm (duración del pulso de 8ns, tasa de repetición de 10 Hz).

En este método cuando el rayo láser se focaliza en la superficie del material objetivo sólido en el ambiente la temperatura del punto irradiado aumenta rápidamente, evaporando el material objetivo. El tiempo de ablación para cada muestra fue de 5 minutos, todos los coloides se transfirieron después a un recipiente con tapa.

Con el fin de determinar las condiciones óptimas, se realizaron pruebas preliminares, donde las muestras fueron medidas por DLS. Las pruebas fueron definidas de la siguiente manera como se muestra en la tabla.

Tabla 1. Características preliminares para la determinación de los parámetros de trabajo

Armónico	Tiempo de ablación (min)	Material del blanco	Volumen(mL)	Solvente	Pulso
Ultravioleta (3 ω)	5	Fe	25	Etanol	20 μ s
Ultravioleta(3 ω)	5		25	Agua	20 μ s
Ultravioleta(3 ω)	5		25	Etanol	120 μ s
Ultravioleta(3 ω)	5		25	Agua	120 μ s

Después de realizar las pruebas DLS y obtener el tamaño de partícula promedio para cada muestra, se seleccionó como solvente el agua debido a que con solventes diferentes al agua se obtenían tamaños de partícula del orden de los 500nm.

Tabla 2. Pruebas preliminares con diferentes parámetros

Armónico	Tiempo de ablación (min)	Material del blanco	Volumen(mL)	Solvente	Pulso	Tamaño (nm)
Verde(2 ω)	5	Fe	20	Agua	50 μ s	547,00 \pm 13,43
Verde(2 ω)	5		20		60 μ s	104,53 \pm 15,03
Verde(2 ω)	5		20		70 μ s	263,10 \pm 0,61
Verde(2 ω)	5		20		80 μ s	92,55 \pm 2,97

Como se muestra en la tabla 3 se utilizó el segundo armónico para realizar la síntesis de las nanopartículas donde se pudo observar a través de las pruebas con DLS que este armónico producía nanopartículas con tamaños menores a los obtenidos en la prueba anterior, por lo tanto, este fue el armónico seleccionado y se estandarizaron los parámetros de tiempo de ablación y solvente. En la siguiente tabla se muestran los parámetros seleccionados.

Tabla 3. Parámetros de trabajo para sintetización de nanopartículas de óxido de hierro.

Armónico	Tiempo de ablación	Material del blanco	Volumen	Solvente	Energía	Masa de nanopartículas (mg)
Verde(2 ω)	5 minutos	Fe	20 mL	Agua	90 mJ	0,22
					173 mJ	1,32
					279 mJ	1,96
					370 mJ	2,51

Se eligió un valor máximo y un valor mínimo de pulso o tasa de repetición (estos valores son los permitidos por el láser) y valores intermedios entre estos; como la energía de pulso es inversamente proporcional a la tasa de repetición o pulso, se tomó estos valores de energía (tabla 3) como referencia y se trabajó con estos para la producción de todas las muestras.

Se obtuvo la masa de las nanopartículas por medio de la medición de pérdida de peso del blanco de Fe después de la ablación láser realizada.

2.2 Caracterización composicional y estructural

2.2.1 XPS

Para la determinación de la composición de las nanopartículas de óxido de hierro se usó la espectroscopia fotoelectrónica de rayos X con un espectrómetro de rayos X SPECS PHOIBOS 100/150 con un analizador hemisférico y una línea de aluminio K-alfa (Al K α)

de 1486.6 eV operada a 100W en la Universidad Industrial de Santander. Con esta técnica se obtuvieron los espectros de alta y baja resolución. A partir de estos se determinó la estequiometría de dichas nanopartículas, realizando la descomposición de las curvas presentes en los espectros y a partir del área bajo la curva de los espectros, para calcular la relación de los compuestos y el porcentaje en los que ellos se encontraban.

2.2.2 EDS

Para la obtención de los porcentajes en los que se encontraba cada elemento se empleó un equipo SEM a un voltaje de aceleración 25KV, un detector EDAX APOLO X con resolución de 126.1 eV (en. Mn K α) para realizar análisis EDS (Energy-Dispersive Spectroscopy) y un Software EDX Genesis, estas medidas se realizaron en la Universidad Industrial de Santander. Después de obtenidos los espectros se realizó una tabla mostrando los porcentajes de Fe y O para cada muestra.

2.2.3 XRD

Los patrones de XRD se obtuvieron con un difractómetro Rigaku, operando con una fuente de radiación Cu K α . Además, se recopiló en un modo de exploración por pasos, entre $2\theta = 10$ y 80° con un paso de 0.03° y 10 s / paso. Estas medidas fueron realizadas en el Centro Brasileiro de Pesquisas físicas. Los resultados obtenidos se graficaron de la siguiente manera: Intensidad en función de 2θ para observar los picos presentes en el patrón para identificar la estructura y fases presentes en el material.

2.2.4 Espectroscopia RAMAN

Los espectros Raman se obtuvieron con un espectrómetro Raman que fue construido en el Centro brasileiro de Pesquisas físicas, los parámetros usados fueron: una rejilla de roja de 600l/mm, para la calibración se usó Si(520cm^{-1}) y un tiempo de 1 minuto, un láser de 8mW, densidad de filtro de 0,3mW, potencia de muestra de $420\mu\text{W}$ y un tamaño de rendija de $100\mu\text{m}$. Después de obtenidos los datos se graficó intensidad en función de longitud de onda y se identificaron los picos presentes en estas gráficas para determinar las fases presentes en las muestras de las nanopartículas de óxido de hierro a diferentes energías de láser.

2.2.5 UV-vis

Se obtuvieron espectros de absorbancia utilizando un espectrofotómetro UV-Vis UV2600 de Shimadzu con un rango espectral de 200 a 850 nm, equipado con doble haz y una esfera integradora para muestras de nanopartículas de 90mJ, 170mJ, 273mJ y 370mJ, estas medidas fueron realizadas en la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. Los espectros fueron medidos en la región de 200 a 700 nm. Los

espectros obtenidos fueron analizados identificando la relación entre la energía del láser y la pendiente de la curva y la identificación del punto donde se dio el plasmón de resonancia.

2.3 Caracterización morfológica

2.3.1 STEM

Para las medidas de STEM se usó un Microscopio Electrónico de Barrido FEG (Field Emission Gun). Las imágenes fueron tomadas con las siguientes características: alto vacío, voltaje de aceleración 25kV y se utilizó un detector STEM I XT en la Universidad Industrial de Santander después de ser goteadas en la rejilla STEM. A partir de las imágenes obtenidas se hizo un promedio de los tamaños de partícula presentes en la imagen con su respectiva desviación estándar, para cada muestra se tomaron 3 imágenes a una resolución de 300nm, también se relacionaron estos tamaños con los obtenidos por DLS.

2.3.2 DLS

Para determinar el tamaño hidrodinámico del nanocompuesto, se utilizó el analizador de tamaño de partículas por dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering DLS). Los coloides (muestras de las nanopartículas a 90mJ, 170mJ, 273mJ y 370mJ) fueron depositados en una cubeta de poliestireno (RefDTS0012, by Malvern Instrument). Las medidas de DLS se realizaron en un equipo Zetasizer Nano Series marca MALVERN INSTRUMENT en la Universidad Industrial de Santander; entre los parámetros elegidos para la medición del tamaño de los coloides se encuentran el agua como dispersante con un índice de refracción de 1.33 a 25°C y un número de scans de 10-100. Se obtuvo un promedio de los tamaños de partícula con su respectiva desviación estándar.

2.4 Evaluación

2.4.1 Pruebas biológicas

Se realizaron pruebas biológicas con cultivos celulares de osteoblastos durante 72 horas, las pruebas biológicas se dividieron en tres etapas de la siguiente manera:

1. Cultivo de osteoblastos: se emplearon las células osteoblásticas (MC3T3-E1), obtenidas de ATCC, se subcultivaron y sembraron a una densidad de 10.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos. Los cultivos celulares se mantuvieron

en α MEM con FBS al 10% y una mezcla de antibióticos PS a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

2. Viabilidad y proliferación: El ensayo de MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) es el más utilizado para evaluar la proliferación celular y la viabilidad [57]. Las células viables y proliferantes expresan una mayor actividad metabólica, convirtiendo el MTT en un producto de formazán de color púrpura con una absorbancia máxima cercana a 570 nm. Para este ensayo, las células se cultivaron como se describió anteriormente durante un período de 72 horas (n=8/punto de tiempo) a diferentes concentraciones del material. El cultivo de células sin tratamiento adheridas a placa se empleó como control. La densidad óptica se midió a una absorbancia de 570 nm utilizando un espectrofotómetro (SpectraMax5, Molecular Devices, EE. UU.).
3. Confirmación de la Proliferación: La proliferación de osteoblastos se confirmó usando el ensayo de contenido de ADN. Se empleó el kit de ADN Pico Green, técnica puesta a punto brevemente por laboratorio de metabolismo del grupo de investigación CINTROP. Brevemente, las muestras se mezclaron con 1 × tampón TE (Tris HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 7,5) y solución PicoGreen. El contenido de ADN se determinó por medición de fluorescencia a una longitud de onda de 480/530nm. Se utilizó ADN Lambda para la curva estándar para calcular la cantidad de ADN en las muestras (n = 8).

Cada experimento se repitió usando 8 muestras inter experimento y 3 muestras en momentos independientes, los datos se presentaron como la media \pm SEM de 8 réplicas y se evaluaron mediante la prueba Anova. El nivel de significación estadística se definió en $p < 0,05$.

2.4.2 Hipertermia magnética

Se aplicó un campo magnético de 200 Gauss AC a las nanopartículas de óxido de hierro producidas a diferentes energías (90mJ, 170mJ, 273mJ, 370mJ) con una frecuencia de 307kHz con un equipo de hipertermia magnética NanoScale Biomagnetics. A partir de esta medida se obtuvieron gráficas de Temperatura en función del tiempo para determinar la tasa de absorción específica (SAR) de las nanopartículas con los métodos de ajuste lineal y ajuste Box Lucas (BL).

Existen diferentes tipos de ajuste para la obtención de los valores SAR y han sido evaluados ampliamente para diferentes tipos de experimentos y diferentes características de nanopartículas en donde se puede encontrar que los métodos más usados son el

método lineal y el ajuste por Box Lucas los cuales fueron utilizados en este estudio, diferentes autores exponen que cada autor debería analizar por lo menos dos métodos.

Para la obtención de los valores SAR por método lineal se usó la siguiente ecuación:

$$SAR_{linear} = \frac{M_s}{M_n} C \frac{\Delta T}{\Delta t} (1)$$

donde, M_s es la masa de suspensión que incluye el agua destilada y las NPs, M_n es la masa de las NPs, y C es la capacidad calorífica específica del agua desionizada. Los valores $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ se obtienen a partir de la gráfica de ΔT en función del tiempo, donde se obtiene la pendiente lineal de la parte inicial de la gráfica para cada una de las energías (90 mJ, 173 mJ, 279 mJ y 370 mJ)

Los valores SAR por método de ajuste Box Lucas se obtuvieron a partir de la siguiente ecuación:

$$SAR_{B.L} = \frac{M_s}{M_n} C (a \cdot b) (2)$$

Donde los valores a y b se obtienen a partir de la gráfica de ΔT en función del tiempo, para hacer el ajuste Box Lucas, se usó la siguiente ecuación:

$$y = a(1 - e^{-bx}) (3)$$

donde se ajustaron las curvas de cada energía a la ecuación 3 y se obtuvieron los valores a y b para reemplazarlos en la ecuación 2 y obtener los valores SAR por este método.

En la siguiente tabla se presenta un resumen de las técnicas usadas en esta tesis y los resultados esperados a partir de cada técnica.

Tabla 4. Resumen de técnicas usadas para la caracterización de las nanopartículas de óxido de hierro

Método	Resultados
UV-vis	Formación de nanopartículas de óxido de hierro
Raman	Composición química
XPS	Identificación de compuestos
EDS	Componentes presentes en la muestra
XRD	Identificación de fases, estructura cristalina
STEM	Tamaño de partícula

DLS	Tamaño hidrodinámico de partícula
Pruebas biológicas	Viabilidad celular y proliferación
Hipertermia magnética	Gráfica de aumento de temperatura en función del tiempo y tasas de absorción específica

3.Resultados y análisis

3.1 DLS

Con el fin de determinar el tamaño promedio de las nanopartículas, se empleó la técnica DLS e imágenes obtenidas con STEM, en la tabla 7 se presentan los resultados de estas mediciones, incluyendo la desviación estándar del tamaño. Los valores de STEM fueron obtenidos haciendo un promedio de los tamaños medidos en las imágenes, para cada energía se obtuvieron 3 imágenes con la misma resolución en diferentes puntos de la muestra. De acuerdo con estos resultados, se constata que las partículas tienen tamaños nanométricos.

Se puede ver para ambos resultados que el tamaño de las nanopartículas no se vio fuertemente influenciado por la energía del láser, ya que no hubo una relación entre la energía y el tamaño de las nanopartículas, sin embargo la desviación estándar indica que se obtuvieron partículas tanto de tamaños elevados (>60 nm) como partículas de dimensiones <10 nm, una explicación para esto puede ser la competencia de fenómenos que ocurren durante la ablación; la energía y la temperatura producida dentro del proceso pueden generar partículas de diferentes tamaños, ya que por la energía se desprenden partículas de cierto tamaño pero al involucrarse la temperatura estas partículas a su vez pueden ser divididas y tener un tamaño menor, debido a que las partículas que tienen mayor área superficial absorben esta energía térmica y se dividen.[62].

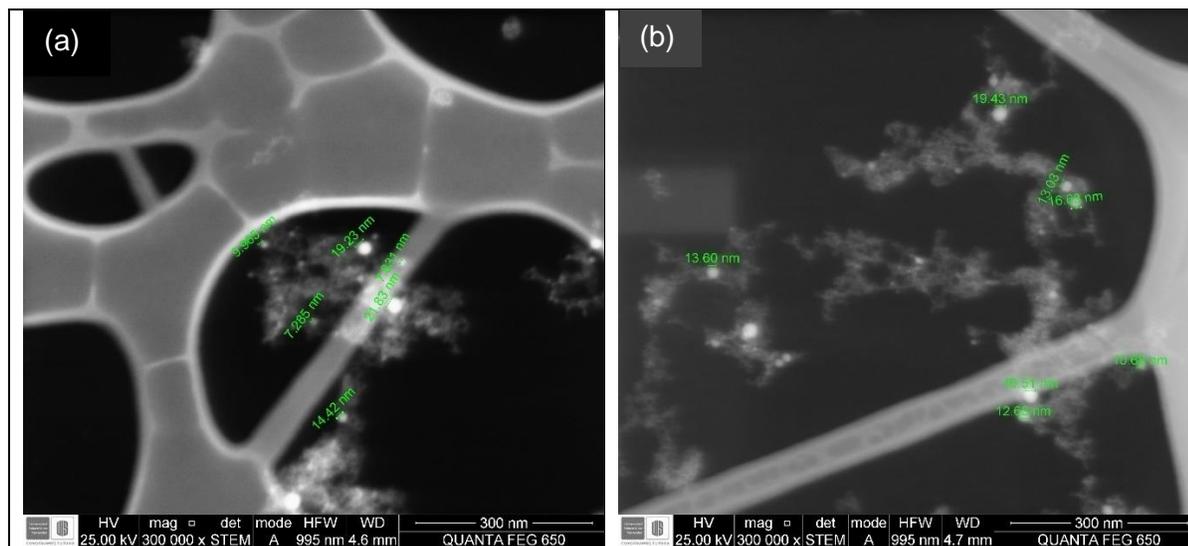
Además, una distribución de tamaños alta se debe a posibles aglomeraciones de nanopartículas en el agua, al aumentar su concentración, en especial en los resultados obtenidos por DLS, ya que el tamaño es medido hidrodinámicamente[63]. Esto se puede observar al hacer una comparación entre los valores obtenidos por las dos técnicas, ya que muestran resultados muy diferentes, aunque indican que sí se obtuvieron partículas en el rango nanométrico.

Tabla 5. Tamaño promedio de partícula para diferentes valores de energía de ablación láser a partir de DLS y STEM.

Energía (mJ)	Mediciones DLS		Mediciones STEM	
	Tamaño Promedio (nm)	Desviación estándar (nm)	Tamaño Promedio (nm)	Desviación estándar (nm)
370	25.868	4.189	16.827	6.044
279	65.363	6.680	15.695	4.854
173	42.176	25.585	14.870	8.347
90	25.900	0.761	18.719	12.825

3.2 STEM

En las imágenes de la figura 9 se muestran las partículas para cada muestra tomada a diferentes energías, se puede observar que se sintetizaron partículas de dimensiones bajas (<20nm), los valores promedios de tamaño de las nanopartículas fueron tomados a partir estas imágenes obtenidas por STEM, se usaron los tamaños de 3 imágenes para cada muestra y un aproximado de 24 tamaños para obtener este promedio, estos valores fueron registrados en la tabla 7.



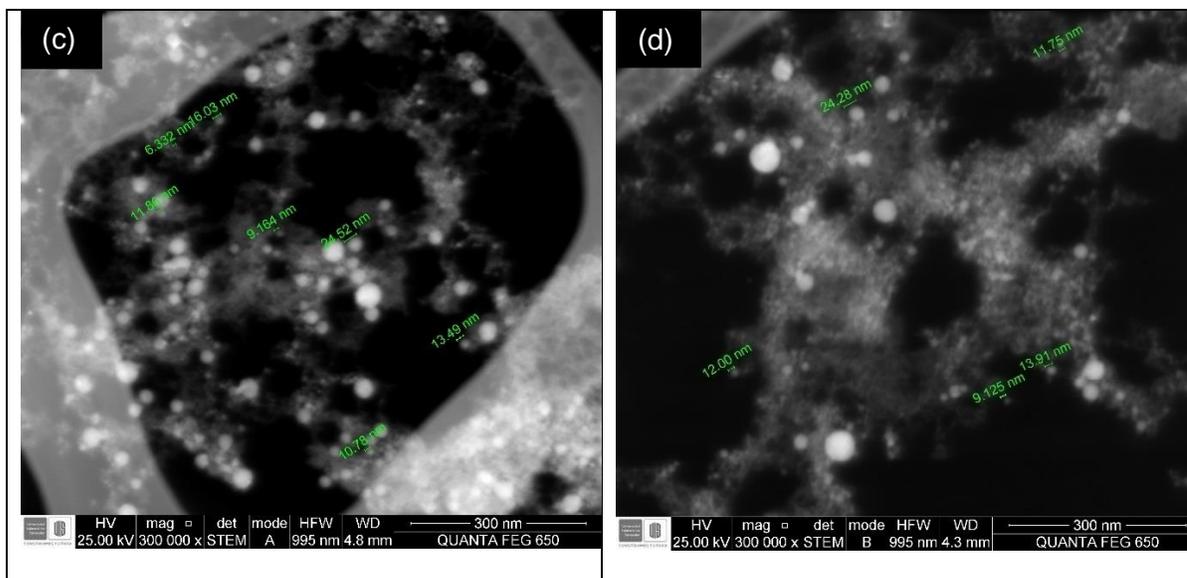


Ilustración 5. Imágenes STEM para nanopartículas sintetizadas usando (a) 370 mJ, (b) 279 mJ, (c) 173 mJ y (d) 90 mJ con ablación láser.

3.3 XPS

En la figura 5 se muestran los espectros XPS de alta resolución del hierro y oxígeno, para la muestra producida a 173 mJ. Estos espectros son representativos de todas las muestras. La figura 5(a) muestra el doblete Fe2p, en el que se presentan dos estados de oxidación, Fe²⁺ y Fe³⁺; el primero coordinado octaédricamente y el último distribuido en los sitios octaédrico y tetraédrico [10]. El espectro se puede ajustar con éxito empleando dos picos principales y un pico satélite en la región 2p_{3/2}, con un patrón repetido. El pico de energía de enlace más bajo a 710.2 eV se atribuye a Fe²⁺, La especie tetraédrica Fe³⁺ tiene una energía de unión de 713.3 eV y el pico satélite fue identificado en 716.0 eV. Estos valores son comparables a otros encontrados en la literatura [58]. La figura 3(b) muestra el espectro de alta resolución O1s, en donde se identifican enlaces correspondientes a la formación de Fe₃O₄ y Fe₂O₃; sin embargo, se identifican picos de mayor intensidad correspondientes a enlaces con hidrógeno y oxígeno. Esta alta cantidad puede deberse a que las nanopartículas fueron producidas en agua, lo que hace que mantengan una alta humedad. Además, la exposición al medio ambiente antes de los análisis hace que se incorpore carbón al coloide.

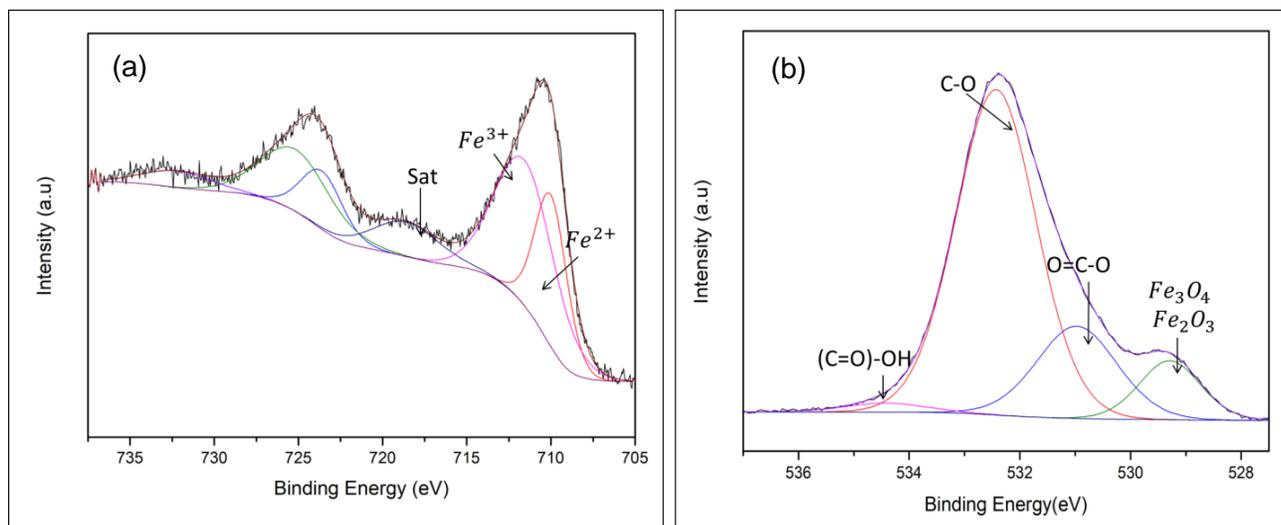


Ilustración 6. Espectros de alta resolución y deconvolución para las nanopartículas producidas a 173mJ. (a) Fe 2p y (b) O 1s.

3.4 EDS

Con el fin de determinar las variaciones en concentraciones de hierro y oxígeno en las muestras, se realizaron análisis empleando EDS. En la tabla 5 se presentan los valores de porcentaje atómico para las diferentes muestras. Se observa una alta concentración de oxígeno; esto está de acuerdo con los resultados XPS, en los que se observa oxígeno no enlazado con hierro, y causado por el medio acuoso en el que se producen las nanopartículas; se observa una variación en la concentración de hierro y de oxígeno, lo que indica el cambio en la presencia de Fe^{2+} y Fe^{3+} en las muestras u oxidación de las nanopartículas.

Tabla 6. Porcentaje atómico de nanopartículas producidas variando la energía del láser, calculado a partir del análisis EDS.

Muestra	At% (EDS)	
	Fe	O
90mJ	5.2	94.8
173mJ	9.3	90.7
279mJ	10	90
370mJ	9.9	90.1

3.5 XRD

Los resultados de difracción de rayos X determinaron la existencia de la estructura atómica de espinela inversa, con lo cual existe la posible presencia de magnetita y de maghemita [14], los difractogramas obtenidos se pueden visualizar en la figura 6.

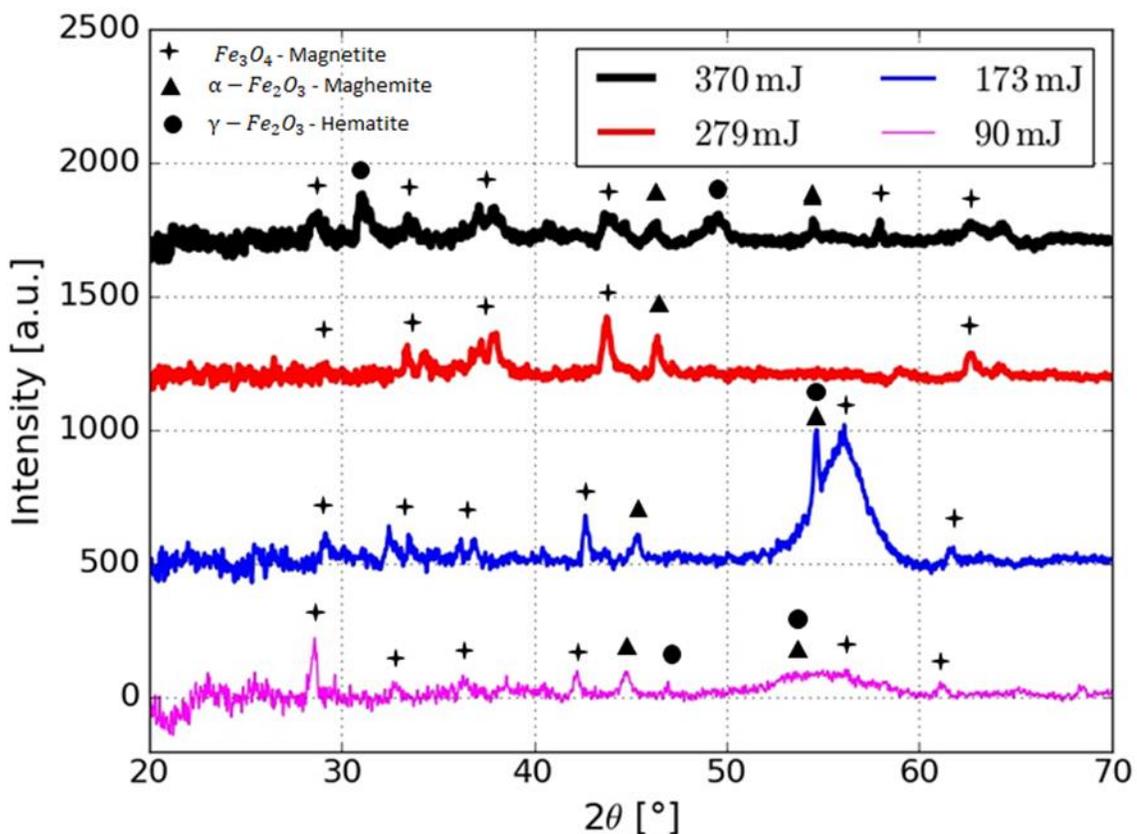


Ilustración 7. Patrón de difracción de nanopartículas de óxido de hierro para diferentes energías

En general, los difractogramas muestran picos anchos y de baja intensidad, lo que es típico de materiales de dimensiones nanométricas, con bajas longitudes de coherencias [59]. Además, se logró identificar picos de los planos cristalográficos (220), (311), (400) y (511), que corresponde a Fe_3O_4 y (024), (116) para Fe_2O_3 . La muestra producida a 173 mJ, presenta un pico alrededor de 55° de mayor intensidad que los demás, lo que puede deberse a que en esta muestra se presentan partículas de gran tamaño y un solape en las fases hematita y maghemita, por ende, mayor cantidad de planos cristalográficos para producir difracción, este resultado es congruente con los valores de tamaño obtenidos en DLS, donde la desviación estándar indica que habían partículas de tamaño por encima del promedio presentes en la muestra o una aglomeración de estas.

3.6 UV-VIS

En la figura 7 se presenta el espectro UV-vis para las muestras de nanopartículas de óxido de hierro producidas a diferentes valores de energía (90 mJ, 173 mJ, 279mJ y 370 mJ). Los espectros de las nanopartículas no muestran picos de absorción definidos. Sin

embargo, sus bordes de absorción a longitudes de onda más cortas son compatibles con los espectros ópticos de la mayoría de las fases de óxido de hierro[60]. La identificación de la morfología de óxido de hierro no puede confirmarse por los espectros UV-vis[61].

La Figura 7 muestra claramente que existe una relación directa entre la respuesta espectral de absorbancia de las nanopartículas y la energía de producción. Donde se identifica una disminución en la pendiente entre 200 nm y 400 nm a medida que se disminuye la energía; esto significa una disminución en la absorbancia a medida que disminuye la energía del pulso utilizada para su fabricación; esto se puede relacionar directamente con la disminución de las concentraciones de las nanopartículas [20]. Este hecho es apoyado cualitativamente por la disminución de la coloración de cada muestra observada a la hora de sintetizarlas.

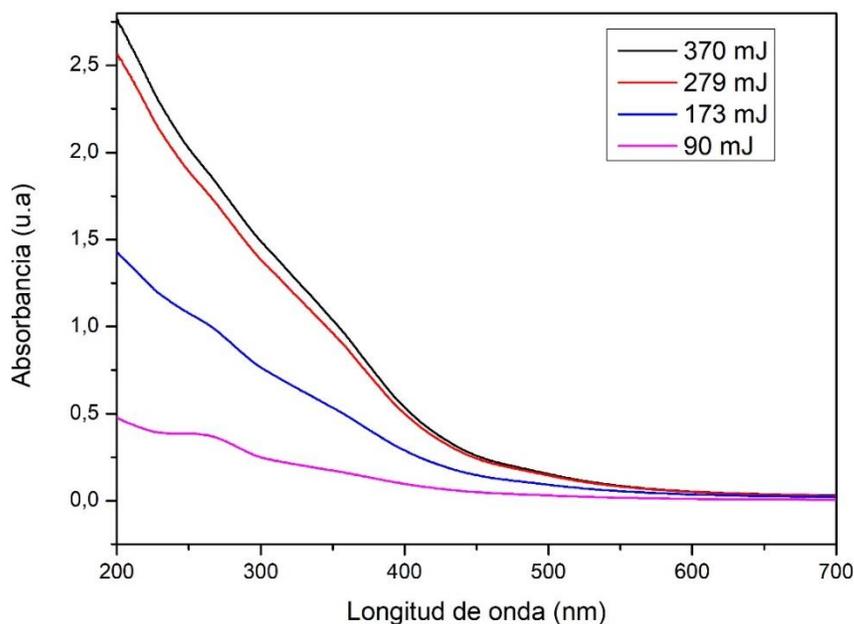


Ilustración 8. Espectros de absorción UV-visible para nanopartículas producidas con energías de láser de 90mJ, 173mJ, 279mJ y 370mJ.

3.7 RAMAN

Se obtuvieron los espectros Raman de nanopartículas producidas a diferentes energías del láser, como se muestra en la figura 8, donde se observan los espectros generales y la toma de diferentes regiones de estos espectros. Aunque la espectroscopía Raman es una técnica para estudiar los enlaces atómicos y moleculares en la química y la física de la materia condensada, se debe tener cuidado cuando se aplica al estudio de los óxidos de hierro. Se ha demostrado que la exposición excesiva de una muestra de óxido de hierro a la radiación láser produce hematita, lo que indica que algunos picos con fase Fe_2O_3 podrían atribuirse a este fenómeno [20]. Los valores de umbral de potencia del

láser informados para la formación de hematita difieren ampliamente, ya que dependen de condiciones experimentales como la longitud de onda, el tiempo de exposición y las características de la superficie de la muestra. En los espectros presentados en la figura 5 se identificaron los mismos picos para todas las muestras en la región de la huella dactilar y fueron relacionados en la tabla 6. En esta tabla se observa que las intensidades no tienen variaciones apreciables dependiendo de la energía del láser.

Tabla 7. Identificación de picos obtenidos en análisis Raman

Pico	Asignación	Area bajo la curva(cm ⁻¹)			
		90 mJ	173 mJ	279 mJ	370 mJ
224.83	Hematite	1.6	2.47	1.72	1.85
410.90	Hematite	0.47	3.87	0.67	1.04
626.73	Hematite	1.13	1.85	1.05	1.19
797.91	Maghemite	2.27	4.01	2.49	2.33
1004.82	Maghemite	12.99	14.19	12.53	11.56
1190.88	Hematite	8.17	9.18	7.87	8.16
1317.40	Hematite	1.71	3.14	1.32	1.12
1451.38	Hematite	1.29	1.84	1.46	1.17

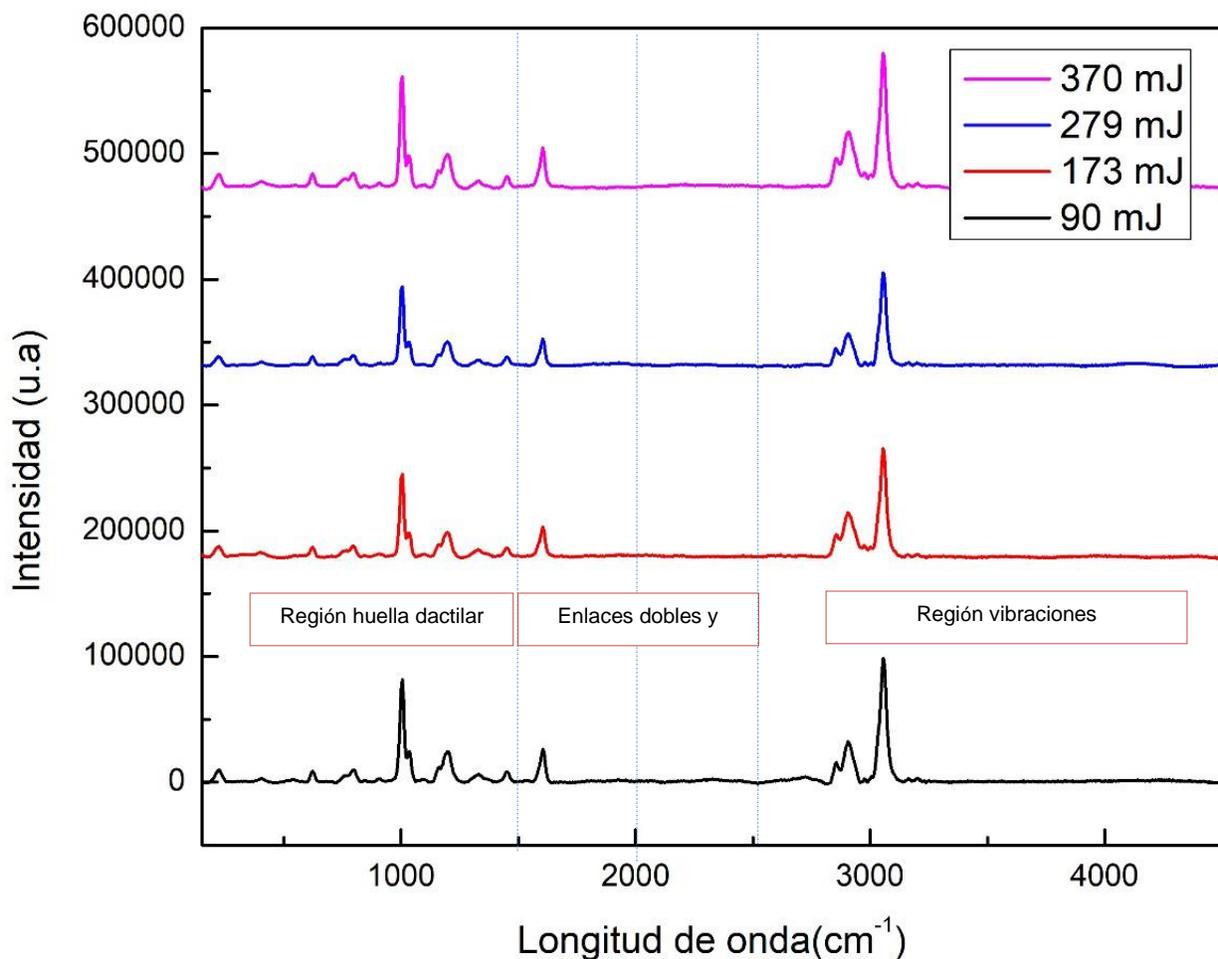


Ilustración 9. Espectros Raman de nanopartículas de óxido de hierro en agua sintetizadas a diferentes energías de pulso.

3.8 Pruebas biológicas

Teniendo en cuenta la importancia del grado de acumulación de las NPs de óxido de hierro para su posible aplicación en hipertermia magnética y a pesar de existir un mecanismo natural de degradación de nanopartículas de óxido de hierro en el cuerpo, es importante realizar una cuantificación del hierro acumulado en el interior de los cultivos celulares de osteoblastos y su actividad. Como se muestra en la figura 10, hubo un incremento en la viabilidad respecto a la concentración de las nanopartículas y a la energía, que están directamente relacionadas. Esto se puede explicar con el aumento en la proliferación de los osteoblastos. Lo que indica que los cultivos tienen una alta viabilidad.

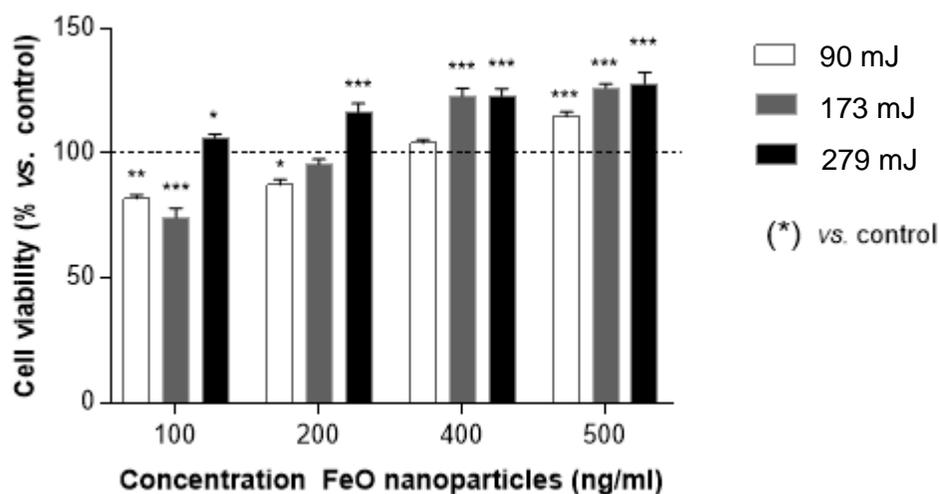


Ilustración 10. Viabilidad celular para las muestras de las nanopartículas tomadas a 90 mJ, 173 mJ y 279 mJ.

En la figura 10 se muestra la gráfica de la proliferación celular respecto al control, donde se observa que incrementa la proliferación celular al aumentar la energía y a su vez aumentar la concentración de las nanopartículas para un tratamiento de 72h.

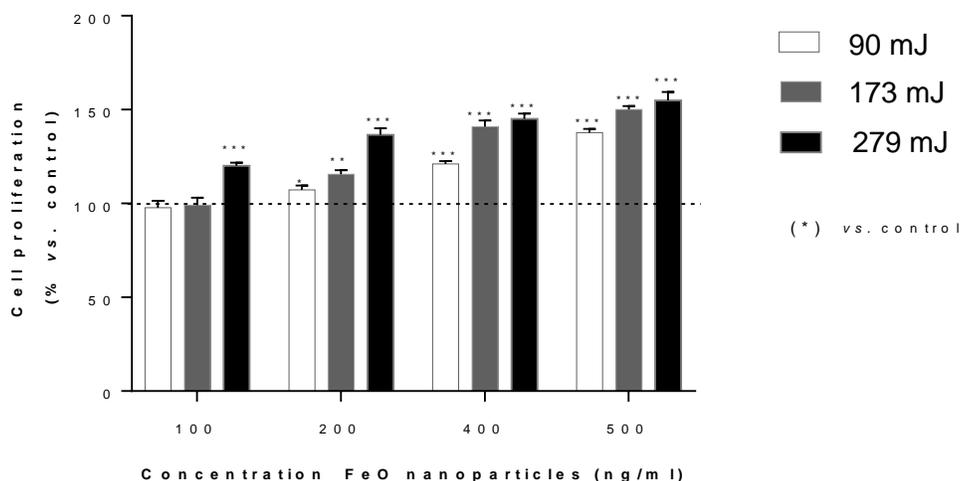


Ilustración 11. Proliferación celular para las muestras de las nanopartículas tomadas a diferentes valores de energía, 90 mJ, 173 mJ y 279 mJ.

En general las concentraciones superiores a 200ng/ml de óxido de hierro favorece la proliferación y viabilidad de los osteoblastos, para energías altas se ven mayormente influenciadas estas variables. Con lo que se puede concluir que las nanopartículas de óxido de hierro producidas a diferentes energías no son tóxicas y aptas para la aplicación en biomedicina. Esto de acuerdo con Luminita Labusca y Daozhen Chen, et al [49][13]

que aseguran que las nanopartículas de óxido de hierro tienen una particularidad, con respecto a su interacción con la materia viva y es que se degradan por medio de vías de homeostasis del hierro.

3.9 Hipertermia magnética

Las nanopartículas de óxido de hierro se usan comúnmente como mediadores de calentamiento para el tratamiento del cáncer de hipertermia magnética debido a su capacidad de liberación de calor cuando se aplican a un campo magnético de CA de suficiente intensidad y frecuencia. En este caso se utilizaron valores de 200 Gauss CA y 307 kHz.

En la Fig. 12 se presentan las curvas de cambio de temperatura frente a tiempo en las muestras de las nanopartículas de óxido de hierro para diferentes energías de láser. En esta, se muestra que la temperatura aumenta para todas las muestras, el aumento de la temperatura de las NPs de óxido de hierro no se vio muy influenciado por el cambio de la energía, esto puede ser porque no hay una gran diferencia entre las concentraciones de las muestras o hay muy poca concentración en cada muestra. Además, se pueden observar en la gráfica unos valores negativos esto indica pequeñas pérdidas de calor a la hora de realizarse la prueba, esto es acorde con la literatura que indica que no solo se presentan aumentos lineales en la temperatura [50].

Para comprender mejor la influencia de la energía del láser en el comportamiento de hipertermia magnética de las nanopartículas de óxido de hierro, se debe calcular la tasa de absorción específica (SAR).

La disipación de energía magnética en una muestra de ferrofluido se mide en términos de SAR. Estos valores se pueden obtener a partir de dos métodos gráficos de ajuste, descritos con mayor especificidad en el capítulo de la metodología. El primer método de ajuste es lineal, se extrajo la pendiente lineal inicial de las curvas ΔT -tiempo, y estos valores fueron sustituidos en $\Delta T/\Delta t$. En el segundo método de ajuste, se obtuvieron los valores a y b con el método de ajuste Box Lucas para las curvas ΔT -tiempo, estos valores fueron sustituidos en la ecuación del ajuste Box Lucas.

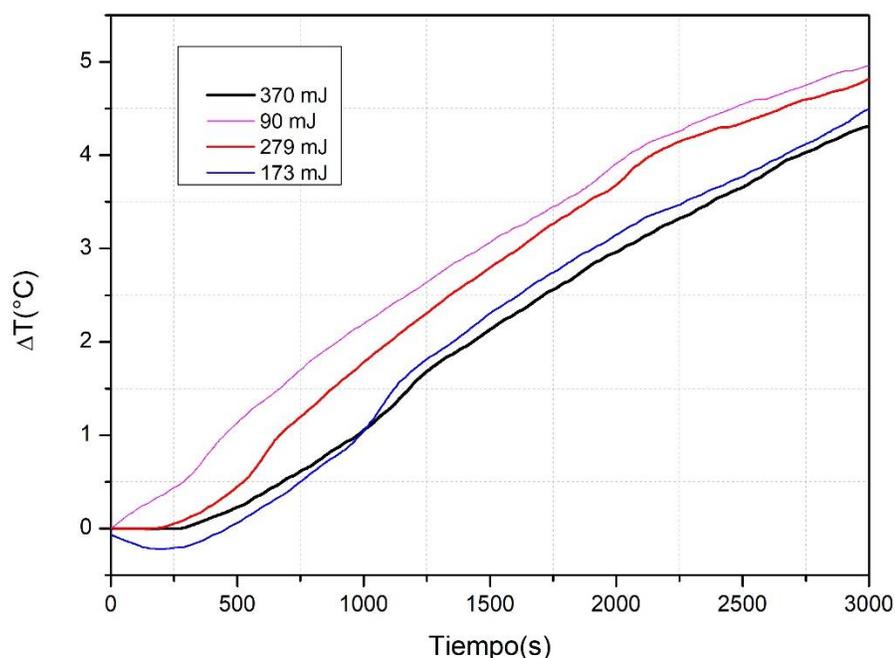


Ilustración 12. Medidas de hipertermia magnética para diferentes valores de energía de ablación.

Los valores SAR obtenidos de las muestras con ajuste lineal y ajuste Box Lucas (BL) se muestran en la Figura 13. Los valores SAR disminuyeron con el aumento de la energía, lo que podría indicar una dependencia de estos valores en la concentración, por tanto, en la energía del láser. A medida que aumenta la energía del láser, la concentración de nanopartículas en el coloide también aumenta, ya que se extrae más cantidad de material, por lo que se obtiene una mayor cantidad de nanopartículas para convertir el campo magnético en calor. La tasa específica de absorción depende de parámetros del campo, como la amplitud y la frecuencia y de los parámetros del medio como la viscosidad y de las propiedades de las partículas como su tamaño y propiedades magnéticas, se podría afirmar que la morfología y las propiedades magnéticas está siendo influenciadas por la energía del láser lo que estaría influyendo en el valor del SAR. Como se pudo observar la morfología y tamaño de las nanopartículas fue influenciada por la energía de obtención de las nanopartículas lo que indica una correlación entre todos los resultados involucrados en este estudio, donde a mayor energía de láser para la obtención de las nanopartículas

Entre los tres métodos (lineal y BL) utilizados para el cálculo de SAR, el BL proporciona la estimación de SAR más precisa para el sistema no adiabático en función de los resultados del análisis gráfico. El lineal asume solo aumentos lineales en la temperatura de la muestra e ignora las pérdidas de calor, mientras que el BL incluye pérdidas lineales debido a una configuración experimental no adiabática. El ajuste lineal sería preciso para mediciones adiabáticas sin cambios químicos o físicos dentro de las muestras. Por lo tanto, se afirma que el método de ajuste Box Lucas para la obtención de los valores SAR

en este caso en el que se obtienen pérdidas de calor durante el experimento es el adecuado.

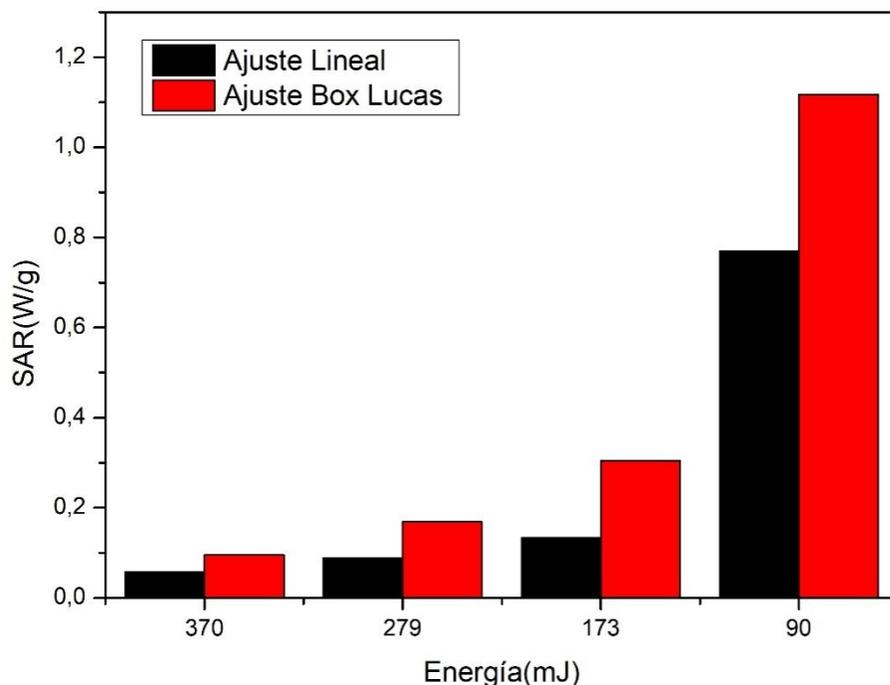


Ilustración 13. Valores SAR para nanopartículas de óxido de hierro en función de la energía láser, utilizando un ajuste lineal y un ajuste Box Lucas.

4. Conclusiones

Las nanopartículas de óxido de hierro se obtuvieron utilizando el método de ablación por láser variando la energía del láser. La morfología se determinó mediante técnicas DLS y STEM. A partir de este análisis, se observó que existe una fuerte competencia entre la energía del láser y la temperatura, para desprender partículas de diferentes tamaños, ya que, a medida que aumenta la energía, se desprende más cantidad de material

aumentando así la concentración, mientras que la temperatura produce divisiones de las partículas de gran tamaño. Por otro lado, la composición se determinó usando XRD que mostró picos amplios con pequeñas intensidades, lo que indica dominios nanométricos. La muestra que exhibió los mayores tamaños de partículas mostró un pico con mayor intensidad, posiblemente porque hay una mayor cantidad de planos cristalográficos. Los picos de Fe₃O₄ y O₁ se identificaron en todas las muestras confirmando la formación de óxido de hierro. La espectroscopía Raman permitió la identificación de picos pertenecientes a hematita y maghemita. Las muestras exhibieron una diferencia en el cambio de temperatura de 1°C por esto se realizaron aproximaciones gráficas para obtener valores SAR donde se ve una relación entre la energía y la tasa de absorción específica. La viabilidad celular de las nanopartículas y la proliferación fue analizada con pruebas biológicas en cultivos celulares de osteoblastos, donde se determinó que concentraciones mayores a 200ng/ml favorece la viabilidad y la proliferación celular.

5. Trabajos futuros

5.1 Contribuciones

La importancia de este estudio se centró en que hasta el alcance de esta investigación no se encontró información donde se evaluaran las propiedades de las nanopartículas de hierro a energías de ablación láser de 90, 173, 279 y 370 mJ y la correlación de estas características con el rendimiento en pruebas biológicas y en la tasa de absorción específica (SAR) por dos tipos de aproximaciones, valor importante para evaluar la eficiencia de dichas nanopartículas en el uso de hipertermia magnética como tratamiento alternativo de cáncer.

5.2 Trabajos futuros

- Estudio profundo de la concentración óptima para las medidas de hipertermia magnética.
- Estudio de las propiedades magnéticas de las nanopartículas con diferentes fases de óxido de hierro.
- Funcionalización de las nanopartículas.
- Realizar medidas biológicas in vivo en ratas wistar.
- Comparación de células osteoblásticas y osteoclasticas.

A. Anexo: Caracterización de nanopartículas de óxido de hierro, técnicas más usadas

XPS

La espectroscopía de electrones fotoemitidos conocida XPS por sus siglas en inglés (X-Ray photoelectron spectrometry) es una técnica sensible para el análisis químico superficial; básicamente consiste en la interacción mediante un haz de rayos-X de los niveles más internos de los átomos, provocando la emisión de fotoelectrones (efecto fotoeléctrico) que dan información acerca de la energía de cada nivel y a su vez de la naturaleza de cada muestra.

Ya que la energía del haz es $h\nu$ si el fotoelectrón sale con una energía EK la diferencia entre dichas energías nos da como resultado BE que es la energía de enlace del electrón. Donde h es la constante de Planck $h = 6.63 \times 10^{-34}$ Js.

Debido a que el camino libre medio de los electrones en los sólidos es muy pequeño, los electrones detectados en los picos de fotoemisión de XPS se originan solamente en las últimas capas atómicas, que son los que constituyen la superficie, se considera que es aproximadamente 10 nm. Por eso se dice que es un análisis superficial, el cual resulta ser muy eficiente para partículas de tamaños nanométricos. [64]

Los espectros XPS se forman cuantificando los fotoelectrones detectados en función de la energía cinética; la distribución de esta energía cinética que se da por la cuantización de la energía consiste en una serie de bandas discretas que muestran la estructura electrónica de los átomos de la muestra medida.

XRD

La difracción de rayos X o XRD por sus siglas en inglés (X-Ray Diffraction) es una técnica de caracterización para la identificación de los planos cristalográficos de un material periódico estructuralmente. Esta técnica está regida por la ley de Bragg que puede expresarse de la siguiente manera $n\lambda = 2d \sin \theta$ en donde n es un número entero, λ es la longitud de onda de los rayos X, d es la distancia entre los planos cristalinos y θ es el ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión. [65]

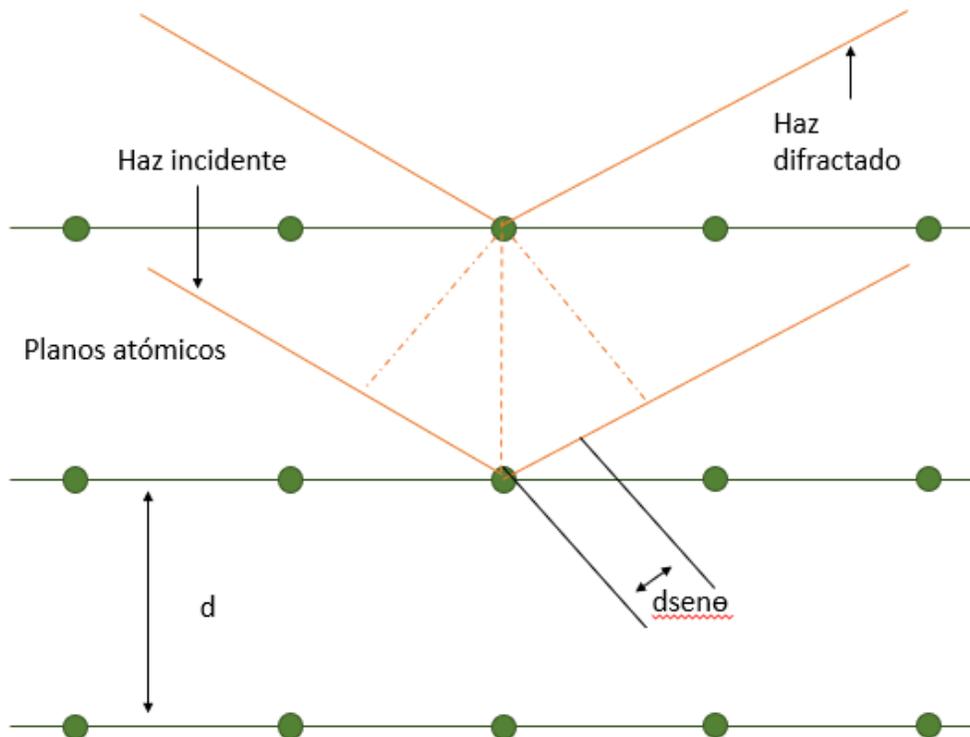


Ilustración 14. Difracción de Rayos X por Ley de Bragg

UV-VIS

Una de las técnicas más utilizadas para caracterizar nanopartículas es la espectrofotometría UV-Visible que nos permite conocer la banda de absorción o el plasmón de absorbanza, la concentración, forma, tamaño y homogeneidad de tamaño de las partículas.

La espectroscopia describe la interacción entre la radiación, principalmente la electromagnética, y la materia. Toda radiación electromagnética viene caracterizada por una longitud de onda (λ), una frecuencia (ν) o una energía (E), relacionadas mediante la ecuación de Planck.

$$E = h\nu$$

La luz visible o ultravioleta incide sobre la muestra, una parte del haz la atraviesa y la otra es absorbida por los electrones de valencia, siendo éstos promovidos a estados excitados.

Al aplicar esta técnica se puede obtener un espectro UV-visible obtenido por el espectrofotómetro UV-Visible que representa la absorbancia en función de la longitud de onda. A partir de este espectro se pueden obtener las características mencionadas. [66]

RAMAN

Raman es una técnica espectroscópica vibracional que utiliza la interacción entre la radiación electromagnética y la materia para estudiar la composición de la misma. Se basa en los fenómenos de dispersión inelástica de los fotones a una determinada frecuencia diferente para cada molécula del material. Debido a las diferentes frecuencias

a las que están asociadas cada molécula en particular, que podemos identificar materiales y distinguirlos.

El efecto Raman se produce cuando un haz de luz monocromática (láser) incide sobre una molécula e interacciona con la nube electrónica de sus enlaces, excitando la molécula a un estado virtual no permitido. Debido a que este nuevo estado no es estable, la molécula se relaja hasta uno de sus estados permitidos mediante el desprendimiento de un fotón. La mayor parte de este haz de luz se dispersa y presenta la misma frecuencia que la onda incidente, se conoce como radiación elástica y no aporta ningún tipo de información molecular. Otra pequeña parte de la luz es dispersada de forma inelástica y devuelve frecuencias propias de cada molécula que compone el material, lo que se conoce como efecto Raman.

Después de la medición con un equipo Raman, se obtiene un espectro Raman, donde en el eje de las abscisas se representa el número de onda en cm^{-1} , relativo a la frecuencia de la luz incidente, y en el eje de ordenadas la intensidad en unidades arbitrarias [u.a]. Cada uno de los picos de este espectro se puede asociar a un modo de vibración[67].

DLS

La dispersión de Luz dinámica o DLS por sus siglas en inglés (Dynamic light scattering), es una técnica óptica no invasiva para medir la distribución estimada de nanopartículas en suspensiones. Se incide una luz láser con cierta energía, alcanzando numerosas partículas coloidales, dispersándola en diferentes intensidades. Si las partículas son pequeñas se moverán rápidamente, también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas más grandes se dispersarán lento llevando variaciones más altas.[68]

Para llevarse a cabo la medición se requieren un mayor número de partículas (varios ordenes de magnitud) en comparación con el TEM que involucra una muestra estadísticamente pequeña, donde los valores obtenidos por lo general serán superiores a los proporcionados por la microscopía, esto debido a que cuando un medio líquido mueve una partícula dispersa, la mayoría de las veces se adhiere una capa eléctrica dipolar a su superficie, por lo tanto influye en el movimiento de esta, ocasionando la medición del radio hidrodinámico.

STEM

Las imágenes STEM se forman a partir de la relación de la señal elástica que es colectada por el detector anular y la señal inelástica que es colectada por el espectrómetro. La relación de la sección transversal es aproximadamente proporcional al número atómico Z , a esta relación se denomina imagen de “contraste Z ”.

Albert Crewe y J. Wall introdujeron el uso del cañón de emisión de campo, para alcanzar una corriente del haz de electrones mediante una punta de barrido (“probe”) lo suficientemente pequeña, el primer microscopio con STEM alcanza una resolución de aproximadamente 30\AA [69]. Las primeras imágenes mostraban átomos individuales pesados. A partir de este momento la técnica STEM se ha desarrollado como una alternativa importante con ventajas especiales para muchos propósitos como las nanoestructuras y los nanomateriales.

Bibliografía

- [1] N. A. Frey, S. Peng, K. Cheng, and S. Sun, “Magnetic nanoparticles: Synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 9, pp. 2532–2542, 2009.
- [2] A. M. Schrand, M. F. Rahman, S. M. Hussain, J. J. Schlager, D. A. Smith, and A. F. Syed, “Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment,” *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 2, no. 5, pp. 544–568, 2010.
- [3] S. H. Huang and R. S. Juang, “Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles: A review,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 13, no. 10, pp. 4411–4430, 2011.
- [4] M. Benz, “Superparamagnetism : Theory and Applications,” *Superparamagnetism Theory Appl.*, pp. 1–27, 2012.
- [5] A. Akbarzadeh, M. Samiei, and S. Davaran, “Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 7, pp. 1–13, 2012.
- [6] G. Simonsen, M. Strand, and G. Øye, “Potential applications of magnetic nanoparticles within separation in the petroleum industry,” *J. Pet. Sci. Eng.*, vol. 165, pp. 488–495, 2018.

- [7] J. Chomoucka, J. Drbohlavova, D. Huska, V. Adam, R. Kizek, and J. Hubalek, "Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering," *Pharmacol. Res.*, vol. 62, no. 2, pp. 144–149, 2010.
- [8] V. C. Karade *et al.*, "Effect of reaction time on structural and magnetic properties of green-synthesized magnetic nanoparticles," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 120, no. July 2017, pp. 161–166, 2018.
- [9] D. Levy, R. Giustetto, and A. Hoser, "Structure of magnetite (Fe₃O₄) above the Curie temperature: A cation ordering study," *Phys. Chem. Miner.*, vol. 39, no. 2, pp. 169–176, 2012.
- [10] D. Wilson and M. A. Langell, "XPS analysis of oleylamine/oleic acid capped Fe₃O₄ nanoparticles as a function of temperature," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 303, pp. 6–13, 2014.
- [11] C. Bárcena, A. K. Sra, and J. Gao, "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine," *Nanoscale Magn. Mater. Appl.*, vol. 167, pp. 591–626, 2009.
- [12] K. M. Gregorio-Jáuregui, J. E. Rivera-Salinas, H. Saade-Caballero, R. G. López-Campos, J. L. Martínez-Hernández, and A. Ilina, "C.4 Las nanopartículas magnéticas y sus múltiples aplicaciones," pp. 397–411, 2012.
- [13] L. Labusca *et al.*, "The effect of magnetic field exposure on differentiation of magnetite nanoparticle-loaded adipose-derived stem cells," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 109, no. August 2019, 2020.
- [14] K. Marathe and P. Doshi, "Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine," *IEEE Int. Conf. Intell. Robot. Syst.*, vol. 2015- Decem, pp. 2550–2555, 2015.
- [15] C. Bantz *et al.*, "The surface properties of nanoparticles determine the agglomeration state and the size of the particles under physiological conditions," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1774–1786, 2014.
- [16] J. Wan, Y. Yao, and G. Tang, "Controlled-synthesis, characterization, and magnetic properties of Fe₃O₄ nanostructures," *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, vol. 89, no. 2, pp. 529–532, 2007.
- [17] S. Zolghadr, S. Kimiagar, and A. M. Davarpanah, "Magnetic property of α-Fe₂O₃-GO nanocomposite," *IEEE Trans. Magn.*, vol. 53, no. 12, 2017.
- [18] R. Nagarjuna, S. Challagulla, R. Ganesan, and S. Roy, "High rates of Cr(VI) photoreduction with magnetically recoverable nano-Fe₃O₄@Fe₂O₃/Al₂O₃ catalyst under visible light," *Chem. Eng. J.*, vol. 308, no. Vi, pp. 59–66, 2017.
- [19] G. W. Yang, "Laser ablation in liquids: Applications in the synthesis of nanocrystals," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 52, no. 4, pp. 648–698, 2007.
- [20] J. M. J. Santillán *et al.*, "Optical and Magnetic Properties of Fe Nanoparticles

- Fabricated by Femtosecond Laser Ablation in Organic and Inorganic Solvents,” *ChemPhysChem*, vol. 18, no. 9, pp. 1192–1209, 2017.
- [21] V. A. Svetlichnyi, A. V. Shabalina, I. N. Lapin, D. A. Goncharova, T. S. Kharlamova, and A. I. Stadnichenko, “Comparative study of magnetite nanoparticles obtained by pulsed laser ablation in water and air,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 467–468, no. August 2018, pp. 402–410, 2019.
- [22] R. A. Ismail, G. M. Sulaiman, S. A. Abdulrahman, and T. R. Marzoog, “Antibacterial activity of magnetic iron oxide nanoparticles synthesized by laser ablation in liquid,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 53, pp. 286–297, 2015.
- [23] Z. Yan and D. B. Chrisey, “Pulsed laser ablation in liquid for micro-/nanostructure generation,” *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, vol. 13, no. 3, pp. 204–223, 2012.
- [24] A. B. Salunkhe, V. M. Khot, and S. H. Pawar, “Magnetic Hyperthermia with Magnetic Nanoparticles: A Status Review,” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 14, no. 5, pp. 572–594, 2014.
- [25] A. Jordan and K. Maier-Hauff, “Magnetic nanoparticles for intracranial thermotherapy,” *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 12, pp. 4604–4606, 2007.
- [26] A. R. Yasemian, M. Almasi Kashi, and A. Ramazani, “Surfactant-free synthesis and magnetic hyperthermia investigation of iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticles at different reaction temperatures,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 230, no. November 2018, pp. 9–16, 2019.
- [27] R. Feynman, “There’s plenty of room at the bottom,” *Feynman and Computation*. pp. 63–76, 2018.
- [28] N. W. Ockwig *et al.*, “Additions and corrections,” vol. 110, no. 4, pp. 2573–2574, 2010.
- [29] J. N. Tiwari, R. N. Tiwari, and K. S. Kim, “Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 57, no. 4, pp. 724–803, 2012.
- [30] P. N. Njoki *et al.*, “Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 40, pp. 14664–14669, 2007.
- [31] W. K. Shin, J. Cho, A. G. Kannan, Y. S. Lee, and D. W. Kim, “Cross-linked Composite Gel Polymer Electrolyte using Mesoporous Methacrylate-Functionalized SiO_2 Nanoparticles for Lithium-Ion Polymer Batteries,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. May, pp. 1–10, 2016.
- [32] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, “Nanoparticles: Properties, applications and toxicities,” *Arab. J. Chem.*, vol. 12, no. 7, pp. 908–931, 2019.
- [33] D. Q. Yang and E. Sacher, “Characterization and oxidation of Fe nanoparticles

- deposited onto highly oriented pyrolytic graphite, using x-ray photoelectron spectroscopy," *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, no. 16, pp. 6418–6425, 2009.
- [34] D. Primc and D. Makovec, "Composite nanoplatelets combining soft-magnetic iron oxide with hard-magnetic barium hexaferrite," *Nanoscale*, vol. 7, no. 6, pp. 2688–2697, 2015.
- [35] Z. Cheng, A. L. K. Tan, Y. Tao, D. Shan, K. E. Ting, and X. J. Yin, "Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles and applications in the removal of heavy metals from industrial wastewater," *Int. J. Photoenergy*, vol. 2012, 2012.
- [36] J. Xu *et al.*, "Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles by sol-gel method," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 309, no. 2, pp. 307–311, 2007.
- [37] P. P. Patil *et al.*, "Pulsed-laser induced reactive quenching at liquid-solid interface: Aqueous oxidation of iron," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 58, no. 3, pp. 238–241, 1987.
- [38] K. Maximova, A. Aristov, M. Sentis, and A. V. Kabashin, "Size-controllable synthesis of bare gold nanoparticles by femtosecond laser fragmentation in water," *Nanotechnology*, vol. 26, no. 6, p. 65601, 2015.
- [39] K. Šišková, B. Vlčková, P. Y. Turpin, A. Thorel, and M. Procházka, "Laser ablation of silver in aqueous solutions of organic species: Probing ag nanoparticle-Adsorbate systems evolution by surface-enhanced raman and surface plasmon extinction spectra," *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, no. 13, pp. 5404–5412, 2011.
- [40] S. C. Singh, "Effect of oxygen injection on the size and compositional evolution of ZnO/Zn(OH)₂ nanocomposite synthesized by pulsed laser ablation in distilled water," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 13, no. 9, pp. 4143–4152, 2011.
- [41] A. N. Hidayah, D. Triyono, Y. Herhani, Isnaeni, and M. M. Suliyanti, "Effect of ablation time on femtosecond laser synthesis of Au- Ag colloidal nanoalloys," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 985, no. 1, 2018.
- [42] K. Sugioka and Y. Cheng, "Ultrafast lasers-reliable tools for advanced materials processing," *Light Sci. Appl.*, vol. 3, no. 390, pp. 1–12, 2014.
- [43] D. Tan, S. Zhou, J. Qiu, and N. Khusro, "Preparation of functional nanomaterials with femtosecond laser ablation in solution," *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, vol. 17, pp. 50–68, 2013.
- [44] V. Londoño-Calderón and Viviana, "Síntesis de nanopartículas de Níquel y Molibdeno mediante ablación láser para aplicación en catálisis heterogénea Síntesis de nanopartículas de Níquel y Molibdeno mediante ablación láser para aplicación en catálisis heterogénea," 2020.
- [45] A. J. GIUSTINI, A. A. PETRYK, S. M. CASSIM, J. A. TATE, I. BAKER, and P. J. HOOPES, "Magnetic Nanoparticle Hyperthermia in Cancer Treatment," *Nano Life*, vol. 01, no. 01n02, pp. 17–32, 2010.
- [46] M. C. Calero, "Caracterización De Nanopartículas Magnéticas En Cultivos

- Celulares Para Sus Aplicaciones Biomédicas Cellular Studies of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications Tesis Doctoral,” 2015.
- [47] J. Volatron *et al.*, “Ferritin Protein Regulates the Degradation of Iron Oxide Nanoparticles,” *Small*, vol. 13, no. 2, pp. 1–13, 2017.
- [48] W. Li, Y. Liu, Z. Qian, and Y. Yang, “Evaluation of Tumor Treatment of Magnetic Nanoparticles Driven by Extremely Low Frequency Magnetic Field,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. March, pp. 1–9, 2017.
- [49] D. Chen *et al.*, “Biocompatibility of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and their cytotoxic effect on MCF-7 cells,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 4973–4982, 2012.
- [50] R. K. Gilchrist, W. D. Shorey, R. C. Hanselman, J. C. Parrott, and C. B. Taylor, “Gilchrist.Pdf,” *Ann. Surg.*, vol. 146, pp. 596–606, 1957.
- [51] P. Wust *et al.*, “Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy - Feasibility, tolerance and achieved temperatures,” *Int. J. Hyperth.*, vol. 22, no. 8, pp. 673–685, 2006.
- [52] Q. A. Pankhurst, N. K. T. Thanh, S. K. Jones, and J. Dobson, “Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 42, no. 22, 2009.
- [53] I. Andreu and E. Natividad, “Accuracy of available methods for quantifying the heat power generation of nanoparticles for magnetic hyperthermia,” *Int. J. Hyperth.*, vol. 29, no. 8, pp. 739–751, 2013.
- [54] P. Kaur, M. L. Aliru, A. S. Chadha, A. Asea, and S. Krishnan, “Hyperthermia using nanoparticles - Promises and pitfalls,” *Int. J. Hyperth.*, vol. 32, no. 1, pp. 76–88, 2016.
- [55] M. Bañobre-López, A. Teijeiro, and J. Rivas, “Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment,” *Reports Pract. Oncol. Radiother.*, vol. 18, no. 6, pp. 397–400, 2013.
- [56] M. Coisson *et al.*, “Hysteresis losses and specific absorption rate measurements in magnetic nanoparticles for hyperthermia applications,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1861, no. 6, pp. 1545–1558, 2017.
- [57] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, H. A. Benink, T. J. Worzella, and L. Minor, “Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1],” *Assay Guid. Man.*, no. Md, pp. 1–25, 2004.
- [58] S. Poulin, R. França, L. Moreau-Bélanger, and E. Sacher, “Confirmation of X-ray photoelectron spectroscopy peak attributions of nanoparticulate iron oxides, using symmetric peak component line shapes,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, no. 24, pp. 10711–10718, 2010.
- [59] M. L. García-Benjume, M. I. Espitia-Cabrera, and M. E. Contreras-García, “Hierarchical macro-mesoporous structures in the system TiO₂-Al₂O₃, obtained by

- hydrothermal synthesis using Tween-20® as a directing agent,” *Mater. Charact.*, vol. 60, no. 12, pp. 1482–1488, 2009.
- [60] V. Amendola, P. Riello, and M. Meneghetti, “Magnetic nanoparticles of iron carbide, iron oxide, iron@iron oxide, and metal iron synthesized by laser ablation in organic solvents,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, no. 12, pp. 5140–5146, 2011.
- [61] P. Maneeratanasarn, T. Van Khai, S. Y. Kim, B. G. Choi, and K. B. Shim, “Synthesis of phase-controlled iron oxide nanoparticles by pulsed laser ablation in different liquid media,” *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.*, vol. 210, no. 3, pp. 563–569, 2013.
- [62] V. Amendola and M. Meneghetti, “What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution?,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 9, pp. 3027–3046, 2013.
- [63] D. Riabinina, M. Chaker, and J. Margot, “Dependence of gold nanoparticle production on pulse duration by laser ablation in liquid media,” *Nanotechnology*, vol. 23, no. 13, 2012.
- [64] D. R. Baer, “Guide to making XPS measurements on nanoparticles,” *J. Vac. Sci. Technol. A*, vol. 38, no. 3, p. 031201, 2020.
- [65] M. G. Lagally, “5. Diffraction Techniques,” *Methods Exp. Phys.*, vol. 22, no. C, pp. 237–298, 1985.
- [66] S. Mourdikoudis, R. M. Pallares, and N. T. K. Thanh, “Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 27, pp. 12871–12934, 2018.
- [67] Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. U. Rehman, “Raman spectroscopy of biological tissues,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 42, no. 5, pp. 493–541, 2007.
- [68] A. Cuadros-Moreno, R. Casañas Pimentel, E. San Martín Martínez, and J. Yañes Fernández, “Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas,” *Latin-American J. Phys. Educ.*, vol. 8, no. 4, p. 14, 2014.
- [69] A. V. Crewe, “Albert V. Crewe 1927-2009,” vol. 159, p. 2010, 2010.