

NANOFERROGELES CON APLICACIONES BIOMÉDICAS

**SARA MARÍA LEAL MARÍN - JULIÁN DAVID VERGARA
ROJAS**



ESCUELA DE INGENIERÍA DE ANTIOQUIA

UNIVERSIDAD CES

INGENIERÍA BIOMÉDICA

ENVIGADO

2013

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA

NANOFERROGELES CON APLICACIONES BIOMÉDICAS

SARA MARÍA LEAL MARÍN

JULIÁN DAVID VERGARA ROJAS

**Trabajo de grado para optar al título de
INGENIERO BIOMÉDICO**

Ph.D Martha Elena Londoño López



ESCUELA DE INGENIERÍA DE ANTIOQUIA

UNIVERSIDAD CES

INGENIERÍA BIOMÉDICA

ENVIGADO

2013

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA

“A mi madre, por los pedazos de corazón que ha puesto en mi vida y todas sus locuras”

Sara María Leal Marín

“A mi familia por todo su apoyo y a todas las personas que han estado junto a mí contribuyendo a mi felicidad en el curso de esta carrera”

Julián David Vergara Rojas

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al asesor Pedronel Araque por las bases para el desarrollo de este proyecto, a la directora Martha Elena Londoño por su acompañamiento a lo largo del trabajo, a Lukas Cardeño por su dedicación y tiempo, a Claudia Echeverri por todas las ideas locas para la discusión, a Ana María Almonacid por su ayuda y su buena energía con las células y al resto de personas del laboratorio de biomateriales de la EIA-CES que de una u otra forma contribuyeron al desarrollo del trabajo.

Y por su apoyo incondicional de toda una vida a Dios, por la voluntad que nos dio de escribir y trabajar en cada una de estas líneas. A nuestras familias por acompañarnos en tantas travesías y a nuestros amigos que siempre estuvieron ahí para darnos ánimo, compañía y sobre todo por todas las sonrisas ganadas en este proyecto.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN.....	17
1. PRELIMINARES.....	18
1.1 Planteamiento del problema	18
1.1.1 Contexto y caracterización del problema	18
1.1.2 Formulación del problema	18
1.2 Objetivos del proyecto	19
1.2.1 Objetivo General.....	19
1.2.2 Objetivos Específicos	19
1.3 MARCO DE REFERENCIA	19
1.3.1 Nanotecnología, Nanopartículas y Nanomagnetismo	19
1.3.2 Magnetismo.....	19
1.3.2.1 Diamagnetismo	20
1.3.2.2 Paramagnetismo.....	20
1.3.2.3 Ferromagnetismo.....	20
1.3.2.4 Ferrimagnetismo	20
1.3.2.5 Antiferromagnetismo	20
1.3.2.6 Superparamagnetismo.....	20
1.3.3 Hidrogeles	21
1.3.4 Nanoferrofluidos	21
1.3.5 Técnicas de obtención de nanopartículas magnéticas, hidrogeles y ferrogeles	22

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA

1.3.5.1	Técnicas de obtención de Nanopartículas magnéticas.....	22
1.3.5.2	Técnicas de obtención de Hidrogeles	25
1.3.5.3	Técnicas de obtención de Nanoferrogeles	25
1.3.6	Técnicas de caracterización	25
1.3.6.1	Espectroscopía de infrarrojo	25
1.3.6.2	Difracción de rayos X	26
1.3.6.3	Método de dispersión dinámica de luz (DLS)	27
1.3.6.4	Microscopía	27
1.3.6.4.1	Microscopía óptica	27
1.3.6.3.3	Microscopía electrónica de transmisión.....	28
1.3.6.4.2	Microscopía de fuerza atómica	28
1.3.7	Pruebas de actividad metabólica celular.....	29
1.3.7.1	MTT	29
1.3.8	Aplicaciones biomédicas	30
1.3.8.1	Transporte de medicamentos.....	30
1.3.8.2	Hipertermia	30
1.3.8.3	Terapia génica	31
1.3.8.4	Terapias en sustitución celular	31
1.3.9	Estado actual de desarrollo de nanoferrogeles.....	31
2	SÍNTESIS E INCORPORACIÓN DE LAS PARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	36
2.1	Síntesis por medio de co-precipitación	36
2.2	Preparación de PVA e incorporación de las MNPs	38
2.3	Incorporación de las MNPs a matrices de PVA –quitosano	39

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA

3	CARACTERIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS MAGNÉTICAS	40
3.1	Propiedades magnéticas	40
3.2	Microscopías	40
3.2.1	Microscopía óptica.....	40
3.2.2	Microscopía de fuerza atómica	40
3.2.3	Microscopía electrónica de transmisión	40
3.3	Método de dispersión dinámica de luz	41
3.4	Espectroscopía de infrarrojo	41
3.5	Difracción de rayos X.....	41
3.6	Otras caracterizaciones	41
3.6.1	MTT	42
3.6.1.1	Preparación de las muestras.....	42
3.6.1.2	Prueba MTT	42
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1	Síntesis por medio de co-precipitación	43
4.2	Preparación de PVA e incorporación de las MNPs	44
4.3	Incorporación de las MNPs a matrices de PVA – quitosano	45
4.4	Propiedades magnéticas	47
4.5	Método de dispersión de luz (tamaño de partícula)	49
4.6	Microscopías	50
4.6.1	Microscopía óptica.....	50
4.6.2	Microscopía de fuerza atómica	52
4.6.3	Microscopía electrónica de transmisión	53

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA

4.7	Espectroscopía de infrarrojo	55
4.8	Difracción de rayos x	57
4.9	MTT	61
5	CONCLUSIONES	65
6	RECOMENDACIONES	66
7	BIBLIOGRAFÍA	67

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Bandas de absorción para el FTIR de las diferentes muestras.	56
Tabla 2. Picos principales de la difracción de rayos x para las diferentes muestras.....	58
Tabla 3. Absorbancia de cada pozo de cultivo con el número de células contendrían según la curva de calibración	63

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Ecuación de Scherrer.....	27
Ecuación 2. Curva de calibración células CHO.....	62

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Esquema de funcionamiento de un AFM (“Microscopio de Fuerzas Atómicas”, www.galileog.com/ciencia/fisica/microscopio/microscopio_fuerzas.htm).....	29
Figura 2. Proceso de síntesis por co-precipitación.....	37
Figura 3. Proceso de preparación de PVAe incorporación de las MNPs.	38
Figura 4. Proceso de entrecruzamiento del PVA con la incorporación de las MNPs.	39
Figura 5. Resultados síntesis por co-precipitación.	44
Figura 6. Resultados de preparación de PVA e incorporación de las MNPs.	45
Figura 7. Incorporación de las MNPs en una matriz de PVA-Quitano 46	46
Figura 8. Prueba de propiedades magnéticas en las diferentes muestras.	48
Figura 9. Resultados tamaño de partícula método de dispersión de luz.	49
Figura 10. Microscopía óptica MNPs filtradas, sintetizadas sin surfactante. Escala 1 mm aumento 20X.	50
Figura 11. Microscopía óptica MNPs filtradas, sintetizadas con surfactante. Escala 1 mm aumento 20X.	51
Figura 12. Microscopía óptica MNPs filtradas en PVA, sintetizadas con surfactante. Escala 1 mm aumento 20X.	52
Figura 13. Resultado AFM, solución de MNPs.....	53
Figura 14. Imágenes TEM solución de MNPs	54
Figura 15. Área promedio de las MNPs	54
Figura 16. FTIR Polvo de MNPs.	55
Figura 17. FTIR PVA+ MNPs en xerogel.	56
Figura 18. DRX, Picos característicos de la muestra polvo MNPs.	58
Figura 19. DRX, Picos característicos del xerogel PVA+ MNPs.....	58

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA

Figura 20. Proceso de preparación de las muestras para cultivo celular y prueba de MTT	61
Figura 21. Histograma % de viabilidad.....	64
Figura 22. Montaje para agregar el amonio en la co-precipitación.	77

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO 1 PROTOCOLO SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS POR MEDIO DE CO-PRECIPITACIÓN	76
ANEXO 2 PROTOCOLO PREPARACIÓN DE PVAE INCORPORACIÓN DE LAS MNPS80	
ANEXO 3 PROTOCOLO SÍNTESIS DE MATRICES DE PVA Y QUITOSANO	82
ANEXO 4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIAS	84
ANEXO 5 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO	86
ANEXO 6 DIFRACCIÓN DE RAYOS X	87

GLOSARIO Y ABREVIATURAS

(ac): Acuoso.

Flóculo: Es una aglomeración de partículas, que puede ser reversible si se separan por algún método físico o irreversible si no se pueden separar mediante técnicas físicas.

Hierro (II): Componente de las sales de hierro identificado como ferroso (Fe^{2+}), en este caso cloruro ferroso.

Hierro (III): Componente de las sales de hierro identificado como férrico (Fe^{3+}), en este caso cloruro férrico.

Liofilizado: Proceso de congelamiento de una muestra y posterior introducción en una cámara de vacío, con el fin de sublimar los componentes líquidos, pasando del estado sólido al gaseoso. Sin alterar la composición de la muestra.

(l): Líquido.

MNPs: Nanopartículas magnéticas.

NPs: Nanopartículas.

PVA: Polivinil alcohol.

(s): Sólido

Xerogel: Es el estado sólido de un hidrogel, después que se ha llevado a un proceso de secado para evaporar su disolvente.

RESUMEN

Las nanopartículas magnéticas son de sumo interés en biomedicina por sus diversas e importantes aplicaciones en transporte de medicamentos o de radioisótopos, como separadores magnéticos de células marcadas, como agentes catabólicos o de tumores vía hipertermia, y como agentes de contraste en aplicaciones de resonancia magnética (Grande A, 2007).

En el presente trabajo se sintetizaron nanopartículas magnéticas (MNPs) por coprecipitación de cloruro férrico (FeCl_3) y cloruro ferroso (FeCl_2) en ácido clorhídrico (HCl), usando hidróxido de amonio (NH_4OH) como agente de coprecipitación y tetrametilamonio ($(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$) como surfactante para evitar la formación de agregados. Se obtuvieron ferrogeles incorporando las MNPs en hidrogel de alcohol polivinílico (PVA) entrecruzando el sistema por un método químico a 35°C , usando como entrecruzante una solución de metanol, ácido acético y glutaraldehído.

Se comprobó la existencia de propiedades magnéticas en las muestras usando un imán y se observó que las partículas se magnetizan al estimularlas con el campo magnético de un imán. Tanto las MNPs como los ferrogeles se caracterizaron por difracción de rayos x (DRX), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de fuerza atómica (AFM) y MTT; encontrando que la fase obtenida en la síntesis es magnetita, que el tamaño de las partículas es de 15.7 ± 5.76 nm y que los productos obtenidos no presentan efectos de citotoxicidad a bajas concentraciones.

Palabras clave: nanopartículas magnéticas, PVA, co-precipitación, ferrogeles, DRX, FTIR, TEM, AFM, MTT, aplicaciones biomédicas.

ABSTRACT

Magnetic nanoparticles represent a great interest in biomedicine for its diverse and important applications in drug or radioisotopes delivery, as magnetic separators of labeled cells, as catabolic agents of tumors via hyperthermia, and as contrast agents in magnetic resonance applications (Grande A, 2007).

Magnetic nanoparticles (MNPs) were synthesized by co-precipitation of ferric chloride (FeCl_3) and ferrous chloride (FeCl_2) in chloride acid (HCl), using ammonium hydroxide (NH_4OH) as co-precipitation agent and tetramethylammonium ($(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$) as a surfactant to prevent aggregates formation. Ferrogels were obtained by incorporating MNPs in polyvinyl alcohol (PVA) hydrogel through chemical crosslinking at 35°C , using methanol, acetic acid and glutaraldehyde as crosslinking solution.

Magnetic properties in the samples were confirming using a magnet, and it was observed that the particles were magnetized by stimulating them with the magnetic field. MNPs and ferrogels were characterized by x - ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy Fourier transform (FTIR), transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscopy (AFM) and MTT, finding that the iron phase obtained in the synthesis is magnetite, the particle size is 15.7 ± 5.76 nm and the products obtained don't have cytotoxic effects at low concentrations.

Keywords: magnetic nanoparticles, PVA, co-precipitation, ferrogel, DRX, FTIR, TEM, AFM, biomedical applications.

INTRODUCCIÓN

El estudio en nanotecnología ha crecido exponencialmente en las últimas décadas, y no se puede desconocer que sus aplicaciones en el campo de la biomédica se presentan como una alternativa con mucho potencial para mejorar la calidad de vida de los pacientes en algún tratamiento, y como parte de la evolución de la medicina desde que ésta se puso al servicio de la comunidad. Siendo las nanopartículas semejantes en escala a las estructuras presentes en la célula, surge entonces este interés creciente de buscar alternativas para que ingresen en el cuerpo y puedan modificar sus estructuras celulares de una manera directa; con las nanopartículas magnéticas se logra este fin al controlar su ingreso y desplazamiento en el cuerpo con un direccionamiento magnético externo y de esta forma garantizar que lleguen a las estructuras celulares para ser usadas en aplicaciones como: liberación controlada de medicamentos, agentes de contraste, terapia génica y tratamientos térmicos.

En este trabajo de nanoferrogels con aplicaciones biomédicas, se busca la síntesis de nanopartículas magnéticas y su recubrimiento con un polímero para poder otorgarles mejores características, ya que las partículas por sí solas no presentan buena capacidad para transportar dosis de medicamentos y al ingresar en el organismo pueden oxidarse accionando una respuesta del sistema inmunitario.

Primero se encontrará una descripción detallada del contexto en el que nace la idea de la síntesis de MNPs como una herramienta potencial en el campo de la salud, cual es el problema y la solución propuesta. Luego se presenta un marco teórico para comprender algunas herramientas que permiten el trabajo en el campo de la nanotecnología. Segundo se describe la metodología empleada en el proceso de síntesis y caracterización del sistema de ferrogels, el uso de técnicas como la co-precipitación, la microscopía electrónica de transmisión, la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier y la difracción de rayos x. Para terminar se encontrará una sección de resultados y discusión donde se muestran los logros alcanzados mediante las técnicas propuestas para síntesis y se compara esta información con otros resultados publicados por diferentes grupos de investigación, de esta sección salen las conclusiones del proyecto y las recomendaciones para trabajos futuros.

1. PRELIMINARES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.1 Contexto y caracterización del problema

En la cotidianidad se encuentra en el sector de la salud un vacío en cuanto a tratamientos médicos se refiere, debido a que muchos de ellos en lugar de convertirse en una cura oportuna para la enfermedad, se convierten en un padecimiento para los pacientes que están siendo tratados, ya que los medicamentos en la mayoría de los casos actúan esparciéndose por todo el cuerpo y no de manera local en donde se encuentra la enfermedad, de allí surgen efectos secundarios ocasionados por las altas dosis de medicinas, que hacen que los pacientes deban permanecer en casa más tiempo del deseado y afectan además de las células que estén alteradas por la enfermedad, aquellas que están sanas debilitando al paciente en el tratamiento (Pedrós & Tognoni, 1993).

Un claro ejemplo de esto son los tratamientos contra el cáncer, como en el caso de la quimioterapia, los medicamentos utilizados tienen el fin de destruir las células que se están dividiendo rápidamente por lo que las células normales, aunque más lentamente, se encuentran en división también y se ven afectadas por el tratamiento (Nuñez, 2011), adicional a esto los medicamentos no se inyectan sólo en la parte afectada por el cáncer sino que se ponen en el torrente sanguíneo teniendo un efecto global; sumado a la quimioterapia, se aplican tratamientos de radioterapia que por medio de radiación eliminan las células tumorales, en ese caso se tiene como ventaja que el tratamiento es localizado pero tampoco está exento de eliminar células sanas (Hendry, Jeremić, & Zubizarreta, 2006)

Debido a esas falencias en el direccionamiento de las terapias, se busca trabajar con sistemas de liberación controlada de medicamentos de escala nanométrica, ya que presentan muchas ventajas a la hora de acceder a los entornos celulares por el tamaño y la liberación continua de dosis adecuadas que pueden proporcionar, permitiendo el tratamiento local por lo que se eliminan una cantidad considerable de efectos secundarios. Retomando el caso específico del cáncer hay un tratamiento que se está implementando denominado termoterapia, éste consiste en utilizar nanopartículas magnéticas inmersas en un gel que se inyecta directamente en la zona que se requiere tratar, una vez allí las partículas ingresan en las células anormales. De manera externa se estimulan las partículas con un campo electromagnético que produce interacciones entre ellas, por medio de colisiones se genera calor y las células anormales mueren dejando intactas las células sanas (Johannsen M, 2007) .

1.1.2 Formulación del problema

En la búsqueda de reducir los efectos secundarios en el tratamiento de enfermedades, se requieren tratamientos localizados, de ahí que surja la necesidad de desarrollar nanoferrogeles para aplicaciones en ingeniería biomédica.

1.2 OBJETIVOS DEL PROYECTO

1.2.1 Objetivo General

Sintetizar y caracterizar nanoferrogeles para aplicaciones biomédicas.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas magnéticas (MNPs) a partir de óxido de hierro.
- Sintetizar hidrogel de alcohol polivinílico (PVA) incorporándole las nanopartículas magnéticas.
- Caracterizar el sistema de nanopartículas magnéticas más PVA morfológica y estructuralmente.

1.3 MARCO DE REFERENCIA

1.3.1 Nanotecnología, Nanopartículas y Nanomagnetismo

La nanotecnología representa un puente entre la química, la física y la biología, a escala molecular permitiendo analizar campos científicos de diverso interés. Se destacan el nanomagnetismo y la nanomedicina. El nanomagnetismo se refiere a los fenómenos que nacen al estimular con campos magnéticos nanopartículas magnéticas y la nanomedicina pretende aumentar las aplicaciones de estas nanopartículas en medicina; ambos se usan a escalas micro y nanométricas. Es necesario aclarar que el termino nano se refiere a partículas en el rango de 1-100 nm, tamaños biológicamente similares al ADN, virus y proteínas. En la escala micro estarían en el rango 1 - 500 μm , similar a las células en general.

Estableciendo estas comparaciones biológicas, se puede entender la posible aplicación de las partículas en relación con el tamaño. De las propiedades magnéticas de las partículas surge el interés por usarlas en aplicaciones biomédicas, ya que las hacen poco invasivas a la hora del tratamiento, sumándole el hecho que el cuerpo humano soporta campos magnéticos de hasta 7 teslas sin efectos colaterales. Por lo que soluciones tecnológicas con aplicaciones de campos magnéticos alternos o estables son una puerta a la investigación para tratamiento de enfermedades como Cáncer, Alzheimer, mal de Parkinson, entre otras (García et al.,2010).

1.3.2 Magnetismo

El comportamiento magnético de un material depende de su estructura interna, de la configuración electrónica y particularmente de fenómenos de mecánica cuántica (Stöhr & Siegmann, 2007). Hay dos causas que generan campos magnéticos: el momento angular de los orbitales y el espín de los electrones (García Mendoza, Mina Rosales, Felix González, Serrano Olmedo, & Pozo Guerrero, 2010). Los electrones por sí mismos son magnéticos pero normalmente sus momentos magnéticos (tanto orbital como intrínseco) están dispuestos de manera aleatoria, en diferentes direcciones, anulando sus efectos unos

con otros. Sin embargo, a veces, ya sea espontáneamente, o debido a la acción de estímulos externos que producen magnetización espontánea, como: tratamientos térmicos, radiación láser, fricción y campo eléctrico. Los momentos magnéticos de la mayoría de electrones se alinean, haciendo que se produzca un campo magnético neto en el material cuya magnitud depende de la cantidad de electrones alineados (Stöhr & Siegmann, 2007). Los materiales magnéticos suelen presentar algunas de las características descritas a continuación, a la hora de aplicar un campo externo.

1.3.2.1 Diamagnetismo

Los electrones de las capas externas de cada átomo se encuentran apareados y sus momentos magnéticos de los electrones son opuestos por lo que el momento total magnético asociado con el par es cero. Su campo se opone al campo magnético externo (García, et al.,2010).

1.3.2.2 Paramagnetismo

Los átomos tienen electrones desapareados en sus órbitas de giro externas. Su momento magnético es diferente de cero y adquieren una magnetización cuando se les localiza en un campo magnético. Su magnetización es nula en ausencia de campo magnético (García Mendoza et al.,2010).

1.3.2.3 Ferromagnetismo

Los espines se encuentran alineados en la misma dirección del campo magnético externo. La alineación de los espines persiste tras remover el campo externo, resultando en una magnetización permanente (García Mendoza et al.,2010).

1.3.2.4 Ferrimagnetismo

Los espines se encuentran alineados, algunos en dirección al campo (posición S1) y otros en oposición a este (posición S2). Existe una magnetización neta debido a que la diferencia entre la cantidad de espines en las posiciones S1 y S2 no es igual. El acoplamiento de espines no es muy fuerte, por lo que al retirar el campo externo, los espines regresan a un estado de orientación aleatoria, presentando una magnetización no permanente (García Mendoza et al.,2010).

1.3.2.5 Antiferromagnetismo

Los espines están alineados, en igual proporción unos en dirección y otros en oposición a un campo magnético externo, no existe magnetización al retirar el campo (García Mendoza et al.,2010).

1.3.2.6 Superparamagnetismo

Cuando el tamaño de una partícula compuesta por átomos magnéticos es tan pequeña que la energía necesaria para dividirse en dominios magnéticos es mayor que la necesitada para permanecer como un único dominio magnético (M. Knobel et al.,2008).

Todos los espines tratan de alinearse en dirección a un campo magnético. Los espines de un cristal superparamagnético no pueden apuntar arbitrariamente hacia cualquier dirección, debido a que su estructura cristalina favorece algunos ejes con respecto de otros, denominados ejes fáciles. Estos cristales están caracterizados por la inestabilidad de la magnetización debido a la agitación térmica. Debido a esto, la magnetización es casi saturada en todo instante, aún en la ausencia de un campo magnético. Sin embargo, el momento magnético gira de una dirección fácil a otra muy rápidamente, lo que cancela la magnetización promediada en el tiempo (García Mendoza et al.,2010).

Además de tener en cuenta los conceptos básicos que explican el comportamiento de las partículas magnéticas, se debe tener presente también las características que exhiben los materiales planteados para realizar el recubrimiento que en este trabajo son los hidrogeles.

1.3.3 Hidrogeles

Se define un gel como una red tridimensional de cadenas flexibles, constituida por segmentos conectados de una determinada manera e hinchada por un líquido (Katime, Katime, & Katime, 2004). Los geles, constan de una red sólida tridimensional por la que se extiende un medio líquido atrapado por efectos de tensión superficial. Esta estructura de la red interna puede resultar de enlaces físicos o enlaces químicos, así como otras uniones que permanecen intactas en el fluido que se extiende. Prácticamente cualquier fluido se puede utilizar como un extensor incluyendo el agua (hidrogel), aceite (oleogel), y el aire (aerogel). Tanto por peso como por volumen, los geles son fluidos en la mayor parte de su composición y por lo tanto exhiben densidades similares a las de sus constituyentes líquidos (Ferry, 1980). Los hidrogeles son geles que contienen agua y cumplen con ciertas características, como su hidrofilia, que son insolubles en agua, blandos, elásticos y se hinchan en presencia de agua manteniendo su forma; cuando se sintetizan hidrogeles, pueden elegirse una gran variedad de polímeros, como ejemplos pueden citarse metacrilato, estireno sulfónico, vinil sulfónico, alcohol polivinílico, etc. Una vez sintetizados los hidrogeles se someten a un proceso de entrecruzamiento ya sea físico, por medio de ciclos de congelamiento y descongelamiento; o químico por medio de sustancias como el glutaraldehído o el trimetafosfato de sodio, dependiendo del tipo de hidrogel que se utiliza, se define a su vez el tipo de catalizador para el entrecruzamiento. Tras el entrecruzamiento es común para su almacenamiento realizar un proceso de secado transformando el hidrogel en una matriz con poca hidratación, que recibe el nombre de xerogel (Katime et al.,2004).

1.3.4 Nanoferrofluidos

Un ferrofluido es básicamente una suspensión líquida o coloidal que posee propiedades magnéticas y de fluido. Es necesaria esta mezcla ya que por sí mismas las partículas magnéticas no son idóneas para transportar medicamentos, por su incapacidad para controlar la tasa de liberación y la cantidad de medicamento o biomoléculas que transportarán. Como solución a esto las nanopartículas magnéticas se recubren con un polímero biodegradable que es cargador de medicamentos o compuestos biológicamente activos. Un campo magnético externo al tejido objetivo es el encargado de dirigir los ferrofluidos, donde los medicamentos se van liberando a una tasa controlada mientras se va degradando el polímero. Es necesario que el ferrofluido posea ciertas propiedades para ser empleado en el transporte de medicamentos a sitios específicos, entre ellas están: tener partículas superparamagnéticas en suspensión de un tamaño pequeño ($<1.4\ \mu\text{m}$, con

núcleo magnético menor de 20 nm) para permitir la distribución uniforme al tejido objetivo, y apropiadas respuestas magnéticas a campos externos locales y gradientes a tasas de flujo presentes en sistemas biológicos. Igualmente los materiales del recubrimiento de las partículas deben exhibir propiedades como: la capacidad para transportar sustancias terapéuticas en adecuadas dosis, ser biodegradables, tener biocompatibilidad, mínima toxicidad y compatibilidad con los medicamentos a liberar. Adicionalmente el medio portador líquido donde están inmersas las nanopartículas debe ser adecuado para sistemas biológicos y ser muy estable para evitar la aglomeración de las partículas (Urquijo Morales J, 2007).

1.3.5 Técnicas de obtención de nanopartículas magnéticas, hidrogeles y ferrogels

1.3.5.1 Técnicas de obtención de Nanopartículas magnéticas

La preparación de nanopartículas puede ser clasificada en dos categorías por métodos físicos que consisten en la subdivisión de los materiales en volumen, o en métodos químicos que generan el crecimiento de nanopartículas a partir de precursores moleculares. Dependiendo del método que se utilice para su obtención, las propiedades magnéticas varían, ya que éstas son dependientes del tamaño nanométrico, además de la modificación cristalina, y la presencia de defectos estructurales. Mediante los métodos físicos se producen nanopartículas de mayor tamaño que por los químicos (Buendía Aceves S, 2009).

1.3.5.1.1 Métodos físicos

Las nanopartículas magnéticas de hierro (Fe), Cobalto (Co) y Níquel (Ni) se pueden obtener por una técnica de condensación de gas inerte, en la que el metal es evaporado aproximadamente a 1500 °C hacia un gas de alta pureza como lo es el Helio (Prados et al., 1999). Al colisionar con el gas los átomos metálicos se condensan formando un polvo ultrafino. También se pueden obtener nanopartículas por medio de la evaporación de metales por descarga de arco sobre una corriente de una mezcla de gases de hidrógeno y argón, con la cual se obtienen partículas de 20 nm a 30 nm de Fe, Ni y aleaciones de Fe-Ni. Usualmente las nanopartículas sintetizadas por estas formas son amorfas y presentan cierta cantidad de óxido en su superficie (Prados et al., 1999).

1.3.5.1.2 Métodos químicos

1.3.5.1.2.1 Pirólisis láser de compuestos organometálicos

La pirolisis láser es una técnica basada en el calentamiento, con un haz láser de un vapor organometálico. Los vapores de reactante rápidamente se descomponen liberando los átomos, los cuales forman clúster debido a las colisiones con las moléculas de gas inerte. Se han preparado nanopartículas de hierro y carburos de hierro de esta forma (Buendía Aceves S, 2009).

1.3.5.1.2.2 Método por micelas inversas

Las síntesis químicas en solución se utilizan comúnmente para la preparación de coloides de nanopartículas metálicas magnéticas. Existen diversas técnicas utilizadas para controlar

el tamaño y forma de las nanopartículas sintetizadas en solución. La técnica de microemulsiones agua - aceite (micelas inversas) se basa en la utilización de gotas de agua sostenidas en una fase orgánica mediante un surfactante. Dentro de estos reactores de tamaño nanométrico, pueden reducirse sales metálicas disueltas en estas nano-gotas hasta la obtención de las nanopartículas metálicas. La cantidad de precursor metálico disponible para el crecimiento de la partícula se encuentra limitado por el volumen de la micela, la cual puede ser variada mediante la modificación de la relación agua-surfactante. Esta técnica ha sido empleada para la preparación de nanopartículas de metales magnéticos, aleaciones metálicas, estructuras núcleo-coraza y óxidos. La síntesis de micelas inversas es un método bastante simple y no requiere ningún equipo costoso; sin embargo, deben mencionarse algunas desventajas: la distribución de tamaños de nanopartículas es ancha (cerca de 21 %), de aquí que la obtención de coloides monodispersos solo es posible mediante procedimientos costosos de fraccionamiento y selección de tamaños. Otra desventaja importante es que las nanopartículas de metales magnéticos no cristalizan bien a temperatura ambiente, y se requiere el recocido a 200 -300 °C para poder obtener nanocristales casi libres de defectos (Buendía Aceves S, 2009).

1.3.5.1.2.3 Síntesis organometálica

Entre los métodos en solución, la recientemente desarrollada síntesis organometálica coloidal parece ser una de las rutas más promisorias para la preparación de nanocristales magnéticos de alta calidad. Estos métodos están basados en la reducción de sales metálicas o en la termólisis de precursores organometálicos cero valentes en un solvente de alto punto de ebullición en presencia de agentes estabilizadores especiales los cuales se absorben reversiblemente sobre la superficie de la nanopartícula, controlando la velocidad de crecimiento. La elección adecuada del surfactante, precursor y régimen de temperatura permite la preparación exitosa de coloides monodispersos de nanopartículas magnéticas de alta cristalinidad.

La mayor parte de las nanopartículas magnéticas coloidales de alta calidad son sintetizadas mediante rutas organometálicas basadas ya sea en la termólisis o en la reducción de un precursor organometálico en presencia de moléculas ligantes. La elección adecuada del agente estabilizador es de gran importancia, dado que las interacciones magnéticas atractivas entre nanocristales tienden a disminuir la estabilidad general de los coloides magnéticos. Una temperatura de reacción elevada (150 - 300 °C) permiten el recocido de los defectos cristalinos y, en consecuencia, es importante para la preparación de nanopartículas altamente cristalinas.

Pueden obtenerse nanopartículas de hierro con un alto grado de monodispersidad y control de tamaño por la descomposición a altas temperaturas de precursores orgánicos de hierro, tales como $\text{Fe}(\text{CO})_5$ o tris(acetilacetionato) de hierro III, usando solventes orgánicos y surfactantes. El tamaño y la morfología de las nanopartículas pueden ser controlados mediante el tiempo de reacción y la temperatura, pero también por la concentración y proporciones de los reactivos, naturaleza de los solventes, precursores y adición de nucleantes. La adsorción de un surfactante sobre la superficie de las nanopartículas de hierro estabiliza la solución coloidal (Buendía Aceves S, 2009).

1.3.5.1.2.4 Proceso electroquímico

El proceso electroquímico es un método de preparación en donde la fuente de nanopartículas magnéticas es un metal que se encuentra en forma sólida.

El método consiste en colocar la lámina metálica del metal deseado en una celda electroquímica actuando como ánodo. En la celda, se generan cationes metálicos en el ánodo que se mueven hacia el cátodo formándose átomos metálicos cero valentes. En muchos casos los átomos metálicos cero valentes se depositan sobre la lámina metálica del cátodo o se precipitan, generando nanopartículas metálicas coloidales que se dispersan en el electrolito. Pueden prepararse también nanopartículas bimetálicas utilizando dos tipos de cátodos. En este proceso el tamaño de partícula puede ser fácilmente controlado al variar la densidad de corriente. La densidad de corriente influye directamente sobre el potencial de reducción en el cátodo. En el caso de partículas bimetálicas la composición está determinada por las densidades de corriente de los dos cátodos, las cuales pueden ser controladas independientemente (Buendía Aceves S, 2009).

1.3.5.1.2.5 Descomposición por hidrógeno

Este método está basado en la reducción de sales metálicas o precursores organometálicos con hidrógeno en presencia de agentes estabilizadores, los cuales se absorben reversiblemente sobre la superficie de la nanopartícula, controlando la velocidad de crecimiento.

Al variar los ligantes (que brindan los agentes estabilizadores) presentes en la reacción de descomposición se puede variar la morfología de las nanopartículas magnéticas resultantes (Buendía Aceves S, 2009).

1.3.5.1.2.6 Co-precipitación

La co-precipitación se basa en la precipitación simultánea de un componente normalmente soluble con un macrocomponente de la misma solución por la formación de cristales mixtos, bi-adsorción, oclusión o atrapamiento mecánico (Nič, Jirát, Košata, Jenkins, & McNaught, n.d.).

1.3.5.1.2.8 Nucleación

La nucleación es el proceso inicial que ocurre en la formación de un cristal a partir de una solución, un líquido, o un vapor, en el cual un pequeño número de iones, átomos o moléculas se disponen en un patrón característico de un sólido cristalino, formando un sitio sobre el que se depositan las partículas adicionales a medida que el cristal crece ("nucleation (crystallography)," n.d.). En la síntesis de nanopartículas deben implementarse mecanismos para que tras la nucleación de cada partícula se inhiba la formación de partículas adicionales sobre ella, conservando su tamaño en la escala nanométrica, esto puede lograrse con el uso de surfactantes, sustancias anfipáticas que formarían membranas micelares alrededor de las nanopartículas (Rosen & Kunjappu, 2012).

1.3.5.2 Técnicas de obtención de Hidrogeles

Según la naturaleza de sus uniones, los hidrogeles pueden ser de tipo físico o químico; en su síntesis por medio químico, se necesita un sistema iniciador, que es el responsable de la formación de radicales libres monoméricos que conforman las cadenas macromoleculares y un agente entrecruzante que ayuda a formar la estructura tridimensional característica del hidrogel, en general, se distinguen dos métodos de obtención: polimerización en bloque, en este método se añaden el iniciador y el entrecruzante a los monómeros obteniendo el polímero sólido en fase cristalina; y polimerización en disolución, el proceso se realiza en presencia de un disolvente, si no se utiliza agente entrecruzante, se obtiene una dilución del polímero que más tarde puede precipitarse y entrecruzarse (Katime et al.,2004); cuando se hace por medios físicos, la obtención del hidrogel se hace por cambios sucesivos de temperatura, calentando y enfriando la solución de manera sucesiva sin necesidad de agregar reactivos adicionales.

1.3.5.3 Técnicas de obtención de Nanoferrogeles

El compuesto mineral - polímero, puede ser formado a través de dos métodos. El primero es incorporar al polímero las partículas previamente formadas; el segundo método es la síntesis de las nanopartículas in-situ dentro de la matriz polimérica. Para lo cual es necesario que la matriz tenga grupos funcionales útiles para la formación de quelatos con iones metálicos. Los polímeros que pueden formar quelatos son el alcohol polivinílico hidrolizado, éste se caracteriza por su procesabilidad sencilla y la capacidad de quelar iones (García, Escareño, & Salazar, 2006).

1.3.6 Técnicas de caracterización

1.3.6.1 Espectroscopía de infrarrojo

El principio físico de absorción cuantizada de radiación electromagnética por un material de estudio se denomina espectroscopia de infrarrojo (Urquijo Morales J, 2007). Se divide en tres regiones; el infrarrojo cercano, medio y lejano; el infrarrojo lejano (aproximadamente $400 - 10 \text{ cm}^{-1}$) se encuentra adyacente a la región de microondas, posee una baja energía y puede ser usado en espectroscopia rotacional. El infrarrojo medio (aproximadamente $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) puede ser usado para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional vibracional, mientras que el infrarrojo cercano ($14000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) puede excitar sobretonos o vibraciones armónicas (Atkins & Paula, 2009). El cambio de la energía vibracional de las moléculas que se da con los cambios en la energía rotacional, genera un espectro de vibración que se puede ver como bandas y no como líneas discretas. Estas bandas se observan entre $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ y son las más empleadas para la caracterización de las sustancias. La ubicación de las bandas en el espectro infrarrojo está designada como números de onda (ν) en cm^{-1} o como longitudes de onda (λ), en micrómetros. El arreglo espacial de los átomos y la constante de fuerza de los enlaces en relación con la masa relativa de los átomos se denomina como frecuencia, a pesar de no ser el termino más adecuado (Urquijo Morales J, 2007). En este trabajo el uso de FTIR permitira determinar la composición estructural de las muestras que se sintetizaron.

1.3.6.2 Difracción de rayos X

La difracción de rayos X (DRX) es una poderosa herramienta en la investigación de la estructura interna de los materiales cristalinos (Martínez, 2013), que permite la identificación estructural de sustancias por medio de sus patrones de difracción característicos para cada una según la forma de los cristales y átomos constituyentes en tres dimensiones. Esta técnica puede usarse para comparaciones de patrones de una muestra problema con sustancias ya conocidas. La ubicación de los haces difractados por un sólido de estructura cristalina dependerá del tamaño, la simetría del cristal y la longitud de onda (λ) de la radiación incidente; la intensidad de los haces depende por su parte de la disposición de celda unitaria de los átomos constituyentes del cristal. Por lo cual no hay dos sustancias que tengan el mismo patrón de difracción (Martínez, 2013) y es posible usar los patrones como método de identificación en comparación con espectros de referencia. Entre sus aplicaciones se encuentran: reconocer los componentes de una mezcla de sólidos, su concentración, determinación precisa de parámetros de red (Willard, Dean, & Merritt, 1981), determinación de las propiedades microestructurales (tamaño del cristal, microdeformaciones, determinación de las orientaciones cristalográficas, identificación y cuantificación de las fases presentes en los materiales sintéticos y naturales) (Martínez, 2013). Los valores específicos de ensanchamiento presentes en los perfiles de difracción, se deben principalmente al tamaño del cristal, a las microtensiones residuales internas y las dislocaciones, entre otras más (Martínez, 2013).

Con esta técnica se da un acercamiento a la composición estructural de las muestras sintetizadas y por medio de los resultados de los espectros es posible la identificación del tamaño del cristal que compone la muestra. La difracción de rayos X se basa en la ley de Bragg.

1.3.6.2.1 Ley de Bragg

Los sólidos cristalinos producen patrones de rayos X reflejados; a ciertas longitudes de onda y ángulos de incidencia específicos, producen picos intensos de radiación reflejada (Cowley, 1995)

Según la ley de Bragg, al hacer incidir un haz de rayos X sobre un cristal, éstos se difractan a un cierto ángulo equivalente al ángulo de incidencia del haz de rayos X (Martínez, 2013).

1.3.6.2.2 Ecuación de Scherrer

El tamaño de cristal generalmente se determina empleando la ecuación de Scherrer, en el cual se debe tener en cuenta que el ensanchamiento del pico de difracción es originado por el tamaño del cristal de la muestra y por la óptica del instrumento de rayos-X. Con la ecuación de Scherrer se calcula el tamaño promedio de cristal presente en la muestra (Ramón, 2007). Si la red cristalina está libre de deformación y los cristales predominan de manera general en la muestra entonces se puede estimar el tamaño promedio de cristal empleando la fórmula de Scherrer:

Ecuación 1. Ecuación de Scherrer

$$\beta = \frac{k * \lambda}{\tau * \cos(\theta)}$$

Donde:

β : Es el tamaño promedio de cristal

k : Es el factor de forma del cristal y su valor es de 0.9

λ : Es la Longitud de onda de la radiación utilizada

θ : Es la posición del pico de difracción en radianes

τ : es el ancho a la altura media del pico de difracción de la muestra (Ramón, 2007).

1.3.6.3 Método de dispersión dinámica de luz (DLS)

Es una técnica que se usa para determinar el perfil de distribución del tamaño de pequeñas partículas en solución, cuando la luz choca contra estas, siguiendo el patrón de dispersión de Rayleigh; siempre y cuando las partículas sean de un tamaño pequeño comparado con la longitud de onda. Si la fuente de luz es un láser y por lo tanto es monocromática y coherente, se observa una fluctuación que depende del tiempo en la intensidad de dispersión. La luz dispersada a continuación se somete a interferencia con las partículas circundantes y el tamaño de partícula se relaciona por la escala de tiempo de movimiento entre el choque y la identificación de la luz por un receptor. En este tipo de técnicas la preparación de la muestra es crítica para los resultados (Berne & Pecora, 2000). Por medio de DLS se puede determinar el tamaño de las partículas magnéticas que se sintetizaran en este trabajo.

1.3.6.4 Microscopía

Existen principalmente dos tipos de microscopios. El primero y más amplio, comprende microscopios que operan en el campo lejano. Estos microscopios usan luz, o electrones en el caso de las microscopías electrónicas, para iluminar la muestra y detectar reflexión, refracción o fluorescencia. Como se usan ondas para iluminar la muestra, estos microscopios se encuentran sujetos al límite de difracción descrito por Ernst Abbe y que vincula la resolución del microscopio a la longitud de onda de la radiación usada para iluminar la muestra (Happel P, Thatenhorst D, & Dietzel I.D, 2012).

El segundo grupo de microscopios comprende los microscopios de sonda. Estos microscopios usan una pequeña sonda para medir una variable física que depende de la distancia entre la sonda y la superficie de la muestra (Happel P et al, 2012).

1.3.6.4.1 Microscopía óptica

La microscopía óptica puede ser de luz transmitida o reflejada. La luz transmitida es usada para aquellos materiales cortados en capas muy finas que dejan pasar la luz visible; y la luz reflejada cuando se tienen materiales muy opacos (Mur, alt, & Planella, 2005).

La microscopía de reflexión consiste en hacer incidir un haz de rayos paralelos, través del objetivo hasta que alcance la muestra. Una fracción de la luz incidente sobre la superficie de la muestra es reflejada por ella, y vuelve a pasar a través del objeto dando una imagen ampliada del área iluminada. La luz continúa hacia arriba a través de un reflector de vidrio plano y se amplifica una vez más al pasar por el sistema superior de lentes, denominado ocular. En los microscopios ópticos de transmisión, la luz se dirige a través de una lente condensadora a la muestra. La luz transmitida es ampliada por el objetivo y el sistema ocular (Mur et al.,2005). La microscopía óptica no ha sido reportada como una técnica para la caracterización de nanopartículas debido a su resolución, en este trabajo se utilizó como una técnica de acercamiento al contenido de la solución de partículas magnéticas, que permitiera determinar la presencia de partículas en esta.

1.3.6.3.3 Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una técnica que utiliza como fuente de iluminación un haz de electrones que son generados por un filamento de tungsteno cuando este por efecto termiónico se pone incandescente. Estos electrones son acelerados y dirigidos hacia la muestra mediante lentes electromagnéticas en condiciones de alto vacío (Nin, 2000).

Con el fin de observar la muestra en el microscopio electrónico de transmisión hay que prepararla previamente según métodos específicos de fijación, incluyendo ultramicrotomía, o crioultramicrotomía. La imagen que se obtiene es bidimensional y monocromática (en blanco y negro) y se puede llegar a un límite de resolución de 0.3 nm (Nin, 2000). Es la técnica con la resolución adecuada para la identificación de la morfología y tamaño de las partículas presentes en las muestras que se sintetizaron en este trabajo.

1.3.6.4.2 Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM) (Figura 1), es una técnica de medida de relieve topográfico superficial a escala molecular y atómica, la cual se basa en la interacción de una punta con la superficie de la muestra. Esta técnica permite el análisis superficial de muestras con resolución nanométrica o incluso atómica. Como principal ventaja tiene la posibilidad de hacer medidas sin ningún tratamiento previo de la muestra a medir, y sin la necesidad de emplear vacío (Lang et al.,2004).

El AFM utiliza la deflexión de un cantiléver blando que termina en una punta afilada en forma de cono la cual se desplaza lentamente sobre la muestra y mide su estructura superficial (Happel P et al.,2012). Con el AFM se sigue la superficie generando una fuerza, principalmente un movimiento vertical que es localizado y convertido en imágenes de profundidad, adjudicando una escala de negros y blancos, del punto más bajo al más alto. Las imágenes reflejan las alturas donde se mueve la punta para seguir la forma de la superficie, con esta técnica se pueden ver los átomos y sus clases (Lang et al.,2004). Para fines de este trabajo esta técnica se utilizara como acercamiento a la morfología y tamaño de las muestras de nanopartículas magnéticas sintetizadas.

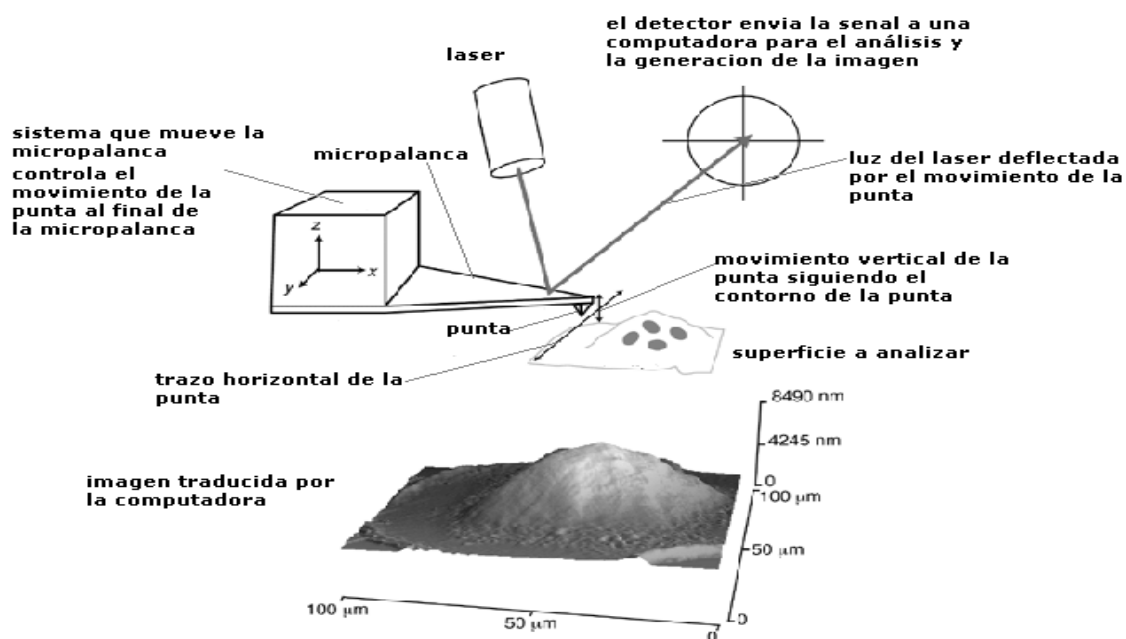


Figura 1. Esquema de funcionamiento de un AFM (“Microscopio de Fuerzas Atómicas”, www.galileog.com/ciencia/fisica/microscopio/microscopio_fuerzas.htm)

1.3.7 Pruebas de actividad metabólica celular

1.3.7.1 MTT

El ensayo MTT mide sólo células vivas *in vitro* y los resultados se relacionan directamente con la cantidad de células viables en el cultivo (Ciapetti, Cenni, Pratelli, & Pizzoferrato, 1993) y con su grado de activación (Mosmann, 1983). La cantidad de formazán producida, indicador de la cantidad de células vivas presentes en la muestra, se mide por espectrofotometría, leyendo la absorbancia entre 550 y 570 nm (Castro, 2006). La técnica ha sido usada en investigaciones inmunológicas, investigación contra el cáncer y evaluación de biocompatibilidad (Ciapetti et al., 1993).

En eucariotas, la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa puede reducir el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) soluble y amarillo, convirtiéndolo en un producto azul intenso (formazán), insoluble en agua pero soluble en dimetil sulfóxido (DMSO), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas (Rodríguez, Vicente, & Canteras, 1997). En este trabajo de grado la técnica MTT se utilizó para determinar el porcentaje de viabilidad celular de un cultivo en contacto con muestras de ferrogel y sus componentes por menos de 24 horas, evaluando la actividad enzimática descrita.

1.3.8 Aplicaciones biomédicas

1.3.8.1 Transporte de medicamentos

Desde los inicios de la medicina, una gran desventaja de los tratamientos en los cuales es necesario el transporte de medicamentos o radioisótopos, es la distribución de estos en el cuerpo. Hay medicamentos que se inyectan de forma intravenosa y se distribuyen por todo el torrente sanguíneo, por lo cual presentan efectos indeseados de atacar a las células presentes en éste incluidas aquellas que no necesitan tratamiento. De esta manera surgen efectos colaterales a la administración de los medicamentos, por ejemplo en el caso de la administración de anti-inflamatorios en pacientes con artritis crónica, llevan a la interrupción de su uso; aunque si el uso se localizará en la parte afectada, sería posible la administración de un anti-inflamatorio potente de forma continua.

En los últimos años de la década de los 70, algunos investigadores plantearon el uso de portadores magnéticos con el fin de localizar blancos en el cuerpo humano, como tumores cancerígenos. La finalidad era alcanzar una localización del medicamento para reducir los efectos colaterales y las dosis aplicadas. En este tratamiento guiado magnéticamente, una droga citotóxica se une a una partícula magnética y biocompatible que tiene el papel de portadora. El complejo droga-portador se inyecta al sistema sanguíneo del paciente, normalmente en forma de ferrofluido biocompatible. Una vez que las partículas entran en el torrente sanguíneo se aplica un campo magnético externo para concentrar el ferrofluido en algún sitio específico del cuerpo; y al localizar el blanco, la droga se puede liberar por medio de cambios en las condiciones fisiológicas, una actividad enzimática, la variación de la temperatura, y ser absorbida por las células del tejido afectado (Grande A, 2007).

Tras los ensayos iniciales en la década de los 70's han surgido sucesivos desarrollos de varios tipos de portadores magnéticos, pero incluso en la época actual la optimización de los portadores es un tema de investigación. Las nanopartículas están compuestas por un núcleo magnético que usualmente es magnetita (Fe_3O_4) recubierto con un material biocompatible. El cubrimiento de la nanopartícula magnética se encarga de aislarla del medio evitando que cambie de estado de oxidación en los fluidos con los que está en contacto o se disuelva, a su vez puede contribuir con la funcionalización de grupos carboxilos, avidin, biotín u otras moléculas. Como recubrimientos es común el uso de polímeros como el dextrán o el polivinil alcohol, a su vez compuestos inorgánicos como la sílica. Recientemente se están investigando metales nobles como el oro para recubrimiento y la transformación de níquel y cobalto en biocompatibles ya que su naturaleza es ser tóxicos y susceptibles a la oxidación (Grande A, 2007).

1.3.8.2 Hipertermia

La hipertermia es usada como una terapia con base en el aumento de la temperatura de una región específica del cuerpo perjudicada por un proceso maligno, con la intención de eliminarlo. Los estudios de la hipertermia solo se han usado en tumores superficiales, en complemento a otros tratamientos en oncología. Pero han ido en aumento las comunicaciones y publicaciones, en la literatura física y médica, que ponen a la hipertermia como una opción de tratamiento importante. Ha sido detallado el uso de la hipertermia en tratamiento de tumores prostáticos, pélvicos, cerebrales, carcinomas escamosos de cabeza, cuello y cáncer de mama, entre otros. A su vez se ha hecho una descripción de

avances en la dispersión de partículas magnéticas, su administración y sus aplicaciones en medicina usando liposomas catiónicos magnéticos y su rol como coadyuvante con la radioterapia y la quimioterapia en el tratamiento de tumores malignos, aumentando la facultad para matar células a temperaturas superiores 41 - 42 °C. Los últimos estudios acerca de hipertermia buscan homogenizar la temperatura cerca de 42 - 43 °C en el tumor, también existe una variante denominada termoablación magnética, en la cual se usan temperaturas de hasta 55 °C. A pesar de que se busca reducir los efectos colaterales restringiendo la ubicación de las partículas al interior del tumor, son notables algunos efectos colaterales sobre las células sanas relacionados con la temperatura. Las nanopartículas utilizadas para aumentar la temperatura en la masa tumoral han sido de óxido de hierro (magnetita o maghemita), compuestos metálicos (Fe C, Sm Co) y metales (Fe, Au, etc.), con diámetros entre 10 y 500 nm. Estas nanopartículas pueden ser bien toleradas por el organismo (dextrán-magnetita, Fe) o precisar un recubrimiento para ser biocompatibles. La idea no es nueva: el uso de óxidos de hierro para calentar y destruir tumores ya fue propuesto por Gilchrist en 1957. Aun así, actualmente se siguen presentando problemas por resolver que impiden la implementación clínica de la terapia, ya que la solución a ciertos problemas usualmente afecta negativamente otros aspectos. Las nanopartículas funcionan en ensayos *in vitro* pero aún presentan resultados negativos *in vivo* (Grande A, 2007).

1.3.8.3 Terapia génica

Es una técnica que muestra un futuro promisorio tanto *in vitro* como *in vivo* involucrando nanopartículas magnéticas biocompatibles para la liberación de genes. En estos sistemas terapéuticos los genes son unidos a nanopartículas las cuales son enfocadas a células blanco vía imanes de alto-campo magnético y alto-gradiente. La técnica promueve excelentes niveles de transfección (Dobson, 2006).

1.3.8.4 Terapias en sustitución celular

En los estudios de sustitución o remplazo celular es muy importante poder hacer seguimiento a las células trasplantadas con el fin de averiguar su localización final y evaluar las mejoras funcionales del trasplante. Para ello antes de ser trasplantadas las células progenitoras son marcadas con nanopartículas magnéticas que sirven como agentes de contraste para localizar la zona del trasplante. El marcaje de estas células no altera la viabilidad celular, su capacidad de diferenciación y migración, ni sus características electrofisiológicas. Este marcaje permite que tras su inyección al torrente sanguíneo, las células se dirijan a órganos determinados mediante la aplicación de gradientes magnéticos. Permitiendo concentrar las células trasplantadas en sitios específicos del organismo (Castillo & Ramos, 2011).

1.3.9 Estado actual de desarrollo de nanoferrogeles

En el departamento de química aplicada, de la facultad de ciencia y tecnología de la universidad Keio, en Yokohaku, Japón en 1995 Lee et al., prepararon partículas de magnetita ultrafinas por precipitación en una solución acuosa de PVA, obteniendo nanopartículas de entre 4 y 7 nm. El estudio se hizo a diferentes concentraciones de PVA y se encontró que la cristalinidad de las partículas disminuía con el incremento de la

concentración de PVA, mientras la morfología y el tamaño de partícula permanecía casi invariable. La dispersión de las partículas de magnetita preparadas en PVA 1% fue particularmente estable (Lee, Isobe, & Senna, 1996).

En 2006, Maaz et al. sintetizaron nanopartículas magnéticas de cobalto-ferrita por métodos químicos húmedos, usando sales férricas y de cobalto estables con ácido oleico como surfactante. Para la caracterización usaron difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de transmisión (TEM), confirmando la formación de nanopartículas de cobalto-ferrita con una sola fase, con un diámetro de 15 - 48 nm dependiendo de la temperatura y el tiempo del proceso de síntesis (Maaz, Mumtaz, Hasanain, & Ceylan, 2006).

En el centro de Investigación de química aplicada en Saltillo, México, se desarrolló en 2006 el estudio "Preparación de compósitos magnéticos mediante la síntesis *in situ* de nanopartículas magnéticas dentro de una matriz polimérica", en este estudio se prepararon partículas magnéticas mediante la precipitación y oxidación *in situ* de Fe^{+3} y Co^{+2} en alcohol polivinílico hidrolizado. El resultado de ésta preparación, es decir, el nanocompósito magnético fue caracterizado por difracción de rayos X y magnetometría de muestra vibrante. Mediante estas pruebas se identificaron nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4) con una estructura cristalina bien definida y las mediciones magnéticas revelan que el nanocompósito magnético es ferromagnético, observándose que la combinación de diferente contenido de ferrita y temperatura de obtención permitió preparar muestras con valores de magnetización entre 0.568 emu/g y 2.9126 emu/g. El método de síntesis utilizado en este trabajo fue eficiente para la obtención *in situ* de partículas magnéticas de CoFe_2O_4 dentro de una matriz de alcohol polivinílico hidrolizado. De las propiedades estructurales y magnéticas de los materiales, se determinó que éstas dependen de la carga magnética, la muestra que dio los mejores resultados fue la obtenida a 80 °C, la cual mostró un material con buen grado de cristalinidad, así como una magnetización máxima de 2.9126 emu/g. Este valor es muy similar a los obtenidos para este tipo de materiales pero en una matriz de copolímeros en bloque. Entre las posibles aplicaciones de estos materiales está su uso en sistemas de liberación de medicamentos y biosensores (García et al., 2006).

Este último estudio es de interés para trabajos futuros, ya que los resultados de la caracterización que se obtuvieron pueden ser de utilidad para realizar comparaciones con el sistema de nanopartículas que se desea sintetizar, además sirve como referencia para establecer que estos sistemas de nanopartículas embebidas en biopolímeros, se pueden obtener incorporando al polímero partículas inorgánicas previamente formadas, moliéndolas y mezclándolas con el polímero. El otro método es la síntesis *in-situ* de las nanopartículas dentro de una matriz polimérica. Para esto es necesario que la matriz posea grupos funcionales que sirvan para formar quelatos con iones metálicos. Entre los polímeros que pueden formar quelatos está el alcohol polivinílico hidrolizado (PVA), éste tiene la capacidad de quelatar iones, además de una procesabilidad sencilla (García et al., 2006).

En 2006, en el Instituto de ciencia y tecnología de polímeros de Madrid, España, se prepararon ferrogeles basados en alcohol polivinílico (PVA) y polihidroxietil metacrilato (pHEMA) con nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4), los ferrogeles de PVA se sintetizaron mediante la solución acuosa del polímero produciendo el gel por un proceso de ciclos de congelación - descongelación (FET) para obtener un gel físico. Se prepararon varias mezclas variando: (i) la concentración de PVA, (ii) la concentración de magnetita y (iii) el

número de ciclos de FET. Los ferrogeles de pHEMA se obtuvieron por medio de una reacción de entrecruzamiento en presencia de la magnetita obteniendo un gel químico. Se prepararon varias mezclas variando la concentración de pHEMA y de nanopartículas de magnetita. Todos los ferrogeles se secaron y se analizaron por medio de un análisis termogravimétrico, los resultados mostraron que la concentración de nanopartículas de magnetita afecta la estabilidad de ambos sistemas de ferrogeles observándose un mejor comportamiento de los ferrogeles de PVA. Los valores de degradación térmica aumentan de acuerdo al contenido de magnetita en la muestra del ferrogel (Goiti et al.,2007). Este trabajo sirve para tomar como referencia la concentración de nanopartículas magnéticas que debe tener el ferrogel para presentar una estabilidad deseada en todas sus propiedades. Es de gran utilidad que sea uno de los pocos antecedentes donde se trabaja y se encuentran resultados del uso de PVA.

En 2007, en el departamento de ciencias e Ingeniería de la Universidad Nacional de Chiao Tung en Taiwan, se fabricó un ferrogel mediante un entrecruzamiento físico y un método de congelación - descongelación, constituido por Fe_3O_4 y PVA. Este ferrogel se constituyó con el fin de evaluar su sensibilidad magnética, el comportamiento de los términos de coeficiente de permeabilidad (P), coeficiente de partición (H), espacio de restricción y magnetización. Los resultados muestran que el valor de P decrece y muestra una sensibilidad magnética cuando es sometido a un campo magnético, que está correlacionado con el valor de H. Además se encontró que el factor de magnetización ejerce un efecto opuesto al comportamiento de la sensibilidad magnética, la mayor sensibilidad magnética fue observada para los ferrogeles con una composición óptima de 17 - 34 % de Fe_3O_4 y 10 - 12.5 % PVA. Se construyó un mapa del comportamiento de la sensibilidad magnética donde se observa una región relativamente estable y con una alta respuesta ante el estímulo, encima o debajo de la región de saturación (17 - 34 % de Fe_3O_4), acá también se detectó una reducción en la sensibilidad magnética. Al final se pudo concluir que los ferrogeles pueden ser diseñados con una configuración precisa que permite un control de apertura y cerramiento de los poros para que la liberación de agentes terapéuticos pueda ser controlada externa y magnéticamente. Lo que permite considerar este tipo de ferrogel como un nuevo sistema sintonizador magnético de entrega de medicamentos (Liu et al.,2008). Esta investigación es de gran importancia para reconocer las concentraciones indicadas que proporcionan un comportamiento ideal en este tipo de ferrogel.

En 2007, Amirfazl et al. sintetizaron nanopartículas de Fe_3O_4 por hidrólisis de una solución acuosa que contenía sales de hierro (Sulfato Ferroso, Sulfato Férrico, Cloruro Ferroso y Cloruro Férrico) y una base (1,6-hexanediamina) a temperatura ambiente, evaluando diferentes mezclas i) Sulfato Ferroso, ii) Sulfato Ferroso y Sulfato Férrico, iii) Cloruro Ferroso y iv) Cloruro Ferroso y Cloruro Férrico; todas ellas con el 1,6-hexanediamina. Las partículas obtenidas fueron caracterizadas por DRX y TEM, observándose que las partículas obtenidas por mezcla de iones férricos y ferrosos, producía nanopartículas de alrededor de 9 nm de diámetro, mientras que las obtenidas únicamente con iones ferrosos tenían aproximadamente 37 nm de diámetro, siendo posible por este método la obtención de nanopartículas de Fe_3O_4 con diámetros entre 9 nm y 40 nm según se varíe la concentración de los reactivos (Amirfazli, 2007).

En 2008, Álvarez et al. obtuvieron un sistema de nanopartículas superparamagnéticas con diámetros de 5.9 nm, basado en MnFe_2O_4 tipo espinela, mediante el método de microemulsión, usando dodecilmecenosulfonato de sodio (NaDBS) para formar micelas

inversas en el sistema de disolventes agua/tolueno, éste se caracterizó mediante DRX, TEM, y magnetometría vibracional, encontrándose claras correlaciones entre el modo de preparación, los tamaños promedios de las nanopartículas obtenidas y sus propiedades magnéticas (Alvarez et al.,2008).

En 2009, Han Wen et al. Sintetizaron Nanopartículas de Fe_3O_4 por el método de coprecipitación, luego se mezclaron con una solución de polietilen glicol metacrilato (PEGMA) y se dejaron expuestos a luz ultravioleta por 20 minutos y luego recolectados usando un magneto, obteniendo nanogeles magnéticos. Para su caracterización se usó microscopía electrónica de barrido (SEM) y TEM. Estos nanogeles presentan excelente hidrofiliidad, biocompatibilidad y propiedades de hinchamiento, alta estabilidad *in vitro* y comportamiento superparamagnético, con magnetización saturada de 58.6 emu/g (Han et al.,2009).

En la Universidad Autónoma de Nuevo León en México, en el año 2009 se desarrollaron nanopartículas magnéticas en templates biopolimericos, este trabajo consistió en el desarrollo de compósitos con aplicaciones biomédicas preparados utilizando biopolímero quitosán como matriz, para la coprecipitación in situ de nanopartículas magnéticas de magnetita y ferrita cobalto con una razón de nanopartículas/quitosán de 3. Los compósitos fueron caracterizados mediante DRX, TEM y magnetometría; encontrando que las nanopartículas presentan tamaños de 5 nm y características magnéticas de un solo dominio siendo su respuesta de magnetización dependiente de la dimensión, la temperatura, y las interacciones intrapartículas. Este trabajo se presenta como un método de síntesis no reportado en trabajos previos de la literatura y puede contribuir con el estudio de sistemas de nanopartículas incorporadas en biopolímeros validando las pruebas que deben realizarse para su caracterización y dando más indicios de que una buena manera de síntesis es la que se da in situ ya que permite obtener nanopartículas con mejores características que por otros medios como mezcla (Garza, González, Hinojosa, Reyes, & Torres, 2009)

En 2011 se desarrolló por parte de Maria Alejandra Gonzalez y Laura Restrepo Uribe estudiantes de la Escuela de Ingenieria de Antioquia el trabajo de grado: Sintesis y Caracterización de nanopartículas de plata, en éste, sintetizaron nanopartículas de plata por fotoreducción bajo luz visible a temperatura ambiente variando la concentración de nitrato de plata, cloruro de sodio y cetuximab; y las caracterizaron usando espectrofotometría UV-Vis para monitorear su estabilidad y microscopía electrónica de transmisión para determinar el tamaño promedio y la forma de las nanopartículas. Llevaron a cabo estudios de citotoxicidad con MTT encontrando que a bajas concentraciones de nanopartículas, la proliferación aumenta. Lograron reconocer la presencia de nanopartículas por medio del color de la solución que al ser café, indicaba nanopartículas más pequeñas, más adheridas y amorfas, mientras que un color azul denotaba nanopartículas más grandes y no adheridas (González et al, 2011).

En el año 2011, González et al.,prepararon ferrogeles disolviendo PVA en una solución que contenía cloruro férrico, sulfato ferroso y ácido clorhídrico a 85 °C por 4 horas en agitación magnética. Tras llevar a temperatura ambiente, se agregó amonio a la solución para producir coprecipitación básica de nanopartículas de magnetita. Llevaron a cabo entrecruzamiento de las muestras por métodos físicos usando cambios de temperatura y por métodos químicos usando una mezcla de ácido acético, metanol y glutaraldehído; por

ambos métodos obtuvieron hidrogeles con propiedades magnéticas (Gonzalez, Hoppe, Muraca, Sánchez, & Alvarez, 2011).

En el año 2013, Wang et al., utilizaron dos tensoactivos aniónicos comunes, oleato de sodio (SO) y sodio dodecil benceno sulfonato (DBSS) para resuspender nanopartículas de óxido de hierro en solución acuosa. A ciertas concentraciones de SO, las formulaciones SO produjeron suspensiones altamente estables. Por el contrario, las nanopartículas estabilizadas con DBSS exhibieron pobre estabilidad en todas las concentraciones. Encontraron que las suspensiones estables fueron obtenidas cuando la concentración de equilibrio del SO (después de adsorción) llegó a su concentración micelar crítica (CMC); en esta condición “óptima”, Se alcanzó la máxima adsorción de SO, y el potencial zeta de las partículas fue muy negativo (~ -50 mV). Por otro lado, encontraron que el DBSS no es adsorbido fuertemente en la superficie de las nanopartículas de óxido de hierro y que es probable la formación de una bicapa irregular mal empacada en la superficie de las nanopartículas de óxido de hierro cuando la concentración de equilibrio del DBSS alcanza su CMC (Wang, Lam, & Acosta, 2013).

En 2013, Zélis et al., reportaron un estudio del comportamiento magnético de las nanopartículas de maghemita (NPs) en matrices de poliméricas de alcohol polivinílico (PVA) preparados por reticulación física. Obtuvieron nanocompuestos magnéticos (ferrogeles) mediante coprecipitación *in situ* de sales de hierro en la presencia de PVA, y las sometieron posteriormente a ciclos de congelación-descongelación. El comportamiento magnético de estos ferrogeles se comparó con el de sistemas similares sintetizados usando glutaraldehído, encontrando que sus propiedades son muy similares. Este tipo de agentes de reticulación química, presentan varias desventajas debido a la presencia de moléculas tóxicas residuales en el gel, que son indeseables para aplicaciones biológicas. El tamaño de partícula característico, determinado por varias técnicas, se encuentra en el rango de 7.9 - 9.3 nm. Por mediciones Mössbauer mostraron que los momentos magnéticos de las NPs presentan excitaciones magnéticas colectivas y relajaciones superparamagnéticas. Obtuvieron las temperaturas de bloqueo y de irreversibilidad de las nanopartículas en los ferrogeles, y la constante de anisotropía magnética a partir de mediciones magnéticas. Obtuvieron también propiedades magnéticas y estructurales pertinentes, tales como el orden de magnitud de la energía de interacción dipolar, el momento magnético de las NPs, y el número de NPs por unidad de masa de Ferrogel (Zélis et al.,2013).

Analizando el estado de avance de la técnica se observa que el trabajo de investigación con ferrogeles, a pesar de llevar casi dos décadas de haber iniciado, aún es vigente por las necesidades que aún están pendientes por solucionar como: evitar la aglomeración de las MNPs, obtener respuestas adecuadas a la estimulación magnética, evitar la oxidación y degradación de los ferrogeles y se abren nuevos interrogantes relativos a cómo éstas influyen en procesos de degradación del organismo, procesos de adhesión celular y de proliferación en ingeniería de tejidos, entre otras.

2 SÍNTESIS E INCORPORACIÓN DE LAS PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

2.1 Síntesis por medio de co-precipitación

Siguiendo un proceso de síntesis por coprecipitación como se presenta en la Figura 2 se obtuvieron nanopartículas magnéticas, en una solución compuesta por cloruro ferroso ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), como iones precursores en una relación molar de 2:1, disueltos cada uno en 10 mL de HCl 2 M y posteriormente mezclados en una proporción 1:4 mL respectivamente en un beaker. Las sales de hierro se pusieron en agitación magnética vigorosa (~ 450 rpm) a temperatura ambiente y se añadió hidróxido de amonio (NH_4OH) a una concentración 0.7 M gota a gota hasta agregar completamente 50 mL con el fin de evitar que la reacción se revierta. Tras terminar de agregar el NH_4OH , se dejó decantar la solución de 5 a 10 minutos y se tomó el sobrenadante, aproximadamente entre 10 - 15 mL para centrifugar a 1000 rpm por 2 minutos.

Una vez centrifugada la solución, se retiró el sobrenadante y se añadió 3 mL de tetrametilamonio al 25 %, se agitó por 1 minuto en el vórtex y se llevó a ultrasonido por 20 minutos a una temperatura de 37 °C. Una vez se termina el proceso se centrifugó la muestra a 1000 rpm por 2 minutos.

A la muestra centrifugada se le retiró el sobrenadante, observándose en las paredes del tubo o en el fondo un producto negro correspondiente a las partículas magnéticas, una vez retirado este sobrenadante se agregaron entre 2 - 4 mL de una solución de agua destilada con HCl de pH 2 para evitar la oxidación, se llevó nuevamente a centrifugación y se repite el lavado 3 veces.

La muestra final se resuspendió por medio de agitación en el vórtex por aproximadamente 2 minutos y luego se llevó a un proceso de ultrasonido por otros 2 minutos con el fin de disociar los agregados de partículas antes de las pruebas de microscopía.

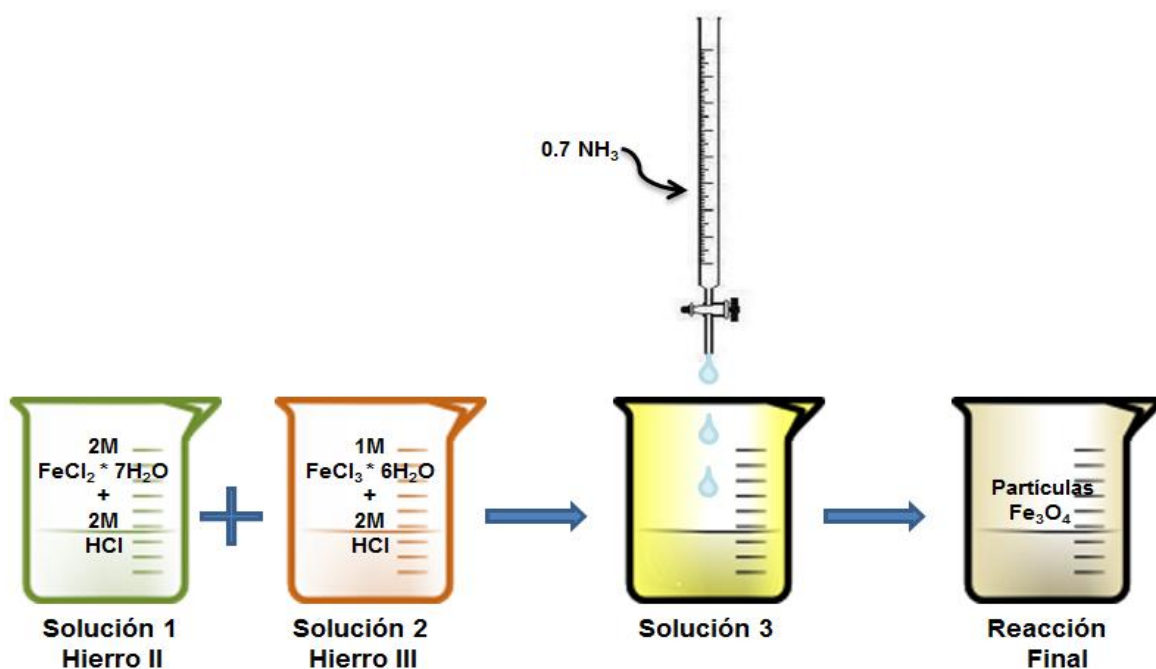
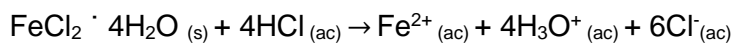


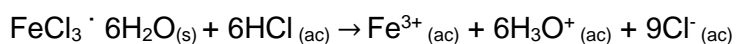
Figura 2. Proceso de síntesis por co-precipitación.

Como se observa durante los procesos en la Figura 2, tras la mezcla de las diferentes soluciones, se dieron las siguientes reacciones químicas:

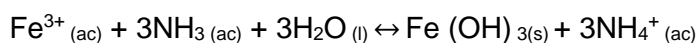
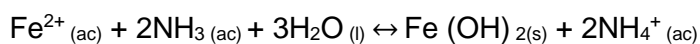
Solución 1



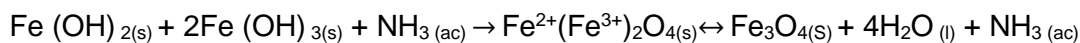
Solución 2



Solución 3



Reacción final



Más detalles del proceso se pueden consultar en el protocolo de síntesis en el anexo 1.

2.2 Preparación de PVA e incorporación de las MNPs

Un método alternativo para asegurar la disociación de las partículas magnéticas una vez realizado el proceso de síntesis es aprovecharse de las interacciones de entrecruzamiento en la síntesis de hidrogeles de PVA. Mediante este método se obtienen partículas magnéticas de aproximadamente 50 nm y se garantiza la protección de éstas contra la aglomeración y la oxidación (Gonzalez et al.,2011).

Tal como se observa en la Figura 3, se realizó una mezcla de 2 g de PVA de peso molecular 93000 g/mol con 20 mL de agua destilada (dH_2O) con el fin de obtener PVA con un concentración de 10 %, se agitó en una plancha magnética lentamente (~ 200 rpm) entre $80 - 90^\circ \text{C}$ por una hora, hasta que se observó una solución transparente sin grumos ni burbujas. Aparte se siguió el proceso de síntesis de partículas por medio de co-precipitación. Se dejó enfriar la solución de PVA hasta alcanzar la temperatura ambiente ($\sim 27 - 30^\circ \text{C}$), una vez alcanzada, se agregaron 6 mL de la solución de MNPs y se agitó en la plancha magnética (~ 500 rpm) durante 15 minutos. La cantidad de MNPs que se agregó a la solución de PVA depende del magnetismo que se quiera lograr, entre mayor sea la concentración de MNPs, se tendrá más atracción.

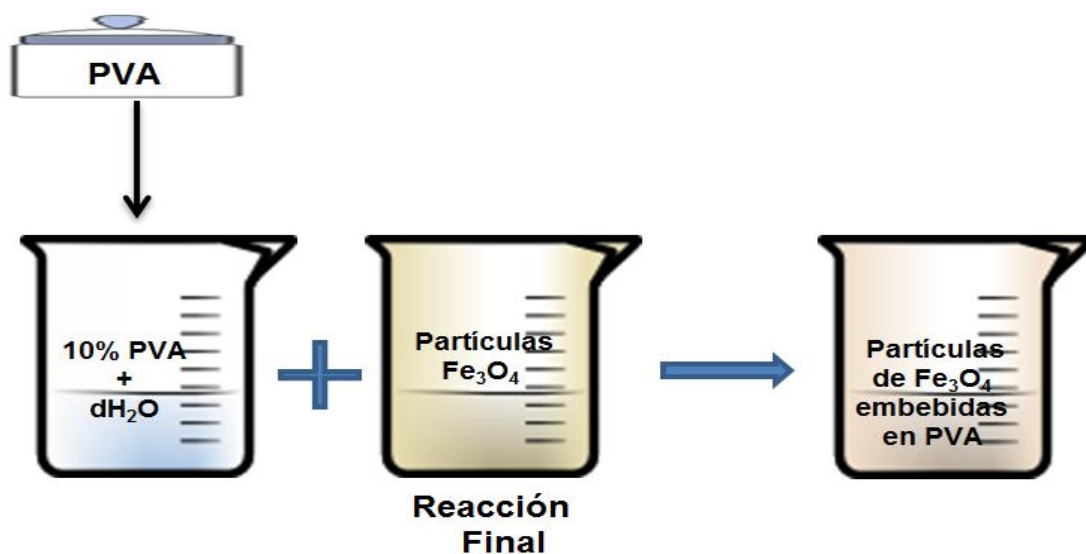


Figura 3. Proceso de preparación de PVAe incorporación de las MNPs.

Para el entrecruzamiento químico se preparó una solución de 3 mL de metanol al 50 %, 2 mL de ácido acético al 10 % y 1 mL de glutaraldehído al 5 % como se observa en la Figura 4, se toma 1 mL de esta solución y se mezcla con 3 mL de la solución de PVA y las partículas magnéticas, se colocó la mezcla en una caja Petri y se puso a secar a 35°C por 24 horas hasta alcanzar un peso constante. Al finalizar el tiempo de secado se obtuvo un xerogel de PVA + MNPs.

Adicional a esta película de PVA con partículas magnéticas se preparó una mezcla sólo de PVA con agua destilada siguiendo el mismo proceso descrito y el proceso de

entrecruzamiento con el objetivo de usarlo para realizar comparaciones entre las muestras.



Figura 4. Proceso de entrecruzamiento del PVA con la incorporación de las MNPs.

Más detalles del proceso se pueden consultar en el protocolo de síntesis en el anexo 2.

2.3 Incorporación de las MNPs a matrices de PVA –quitosano

Adicional a los ferrogel que se había planteado sintetizar, se quiso comprobar el efecto de las MNPs en matrices de PVA-quitosano previamente fabricadas en el laboratorio.

Para este fin se tomaron muestras de 1 x 1 cm de matrices de PVA – quitosano en una relación 80 % - 20 % que habían sido previamente liofilizadas y fabricadas siguiendo los protocolos establecidos en el laboratorio de Biomateriales del programa de Ingeniería Biomédica EIA-CES, estas se sumergieron en 5 mL de la solución de MNPs preparada por co-precipitación, el tiempo de inmersión fue de 20 minutos. Tras este periodo se dejaron secar por 24 horas a temperatura ambiente. Al finalizar se comprobaron sus propiedades magnéticas.

Más detalles acerca de la síntesis de la matriz se pueden consultar en el anexo 3.

3 CARACTERIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

3.1 Propiedades magnéticas

Para comprobar el magnetismo de las MNPs se ubicó un imán de neodimio de 0.08 Teslas en la pared del recipiente donde está la solución con MNPs y se observó si había desplazamiento de éstas hacia él; en el caso de las muestras solidas también se comprobó el magnetismo de las muestras.

3.2 Microscopías

3.2.1 Microscopía óptica

Para identificar la presencia de MNPs en las muestras, se buscó realizar un filtrado de éstas utilizando membranas de filtro con tamaño de poro 0.45 μm . Las membranas se sumergieron en el sobrenadante obtenido tras la centrifugación de las muestras, mientras se atraían las MNPs a una pared del recipiente, con el fin de atrapar las que pasan por la línea del campo magnético al crear movimiento en la solución. Se observó el papel de filtro en un microscopio óptico Nikon LV100 en modo de luz transmitida, con un aumento de 20X, realizando una comparación del papel limpio y posteriormente sumergido en el sobrenadante por menos de 1s.

Los protocolos de la preparación de las muestras para la observación microscópica se pueden consultar en el anexo 4.

3.2.2 Microscopía de fuerza atómica

Sobre un sustrato de silicio se depositó una gota de la muestra de MNPs previamente preparada tras la síntesis por co-precipitación, el volumen de la gota es de 0.5 μL y se dejó secar preferiblemente en un ambiente libre de polvo para ubicarla en el soporte del AFM. Se trabajó en el equipo Easyscan 2 flex AFM de Nanosurf bajo el modo tapping con una punta de silicio recubierta de aluminio, una constante de resorte de 48 N/m, una frecuencia de resonancia de 190 kHz, con 256 puntos por línea, un tiempo de 2 s aproximadamente para cada línea, y un set point para el software del controlador del 50%.

Los protocolos de la preparación de las muestras para la observación microscópica se pueden consultar en el anexo 4.

3.2.3 Microscopía electrónica de transmisión

Se tomaron 0.5 μL de la solución decantada y previamente almacenada en HCl con pH 2, los cuales se disolvieron en 2 mL de agua destilada, se llevaron a ultrasonido por 15 minutos a 35°C y luego se agitó en vórtex por 2 minutos. De esta muestra se depositaron 20 μL en una rejilla de cobre, suministrada por el personal encargado de realizar el TEM (Laboratorio de microscopía electrónica, Universidad del Cauca). La rejilla de cobre se puso sobre papel parafilm, se dejó la solución depositada alrededor de 20 segundos, se retiró el líquido sobrante, y se volvió a repetir el procedimiento de depositar 20 μL . Luego se dejó evaporar

el líquido bajo condiciones limpias y se colocó la rejilla en el portarejillas. El equipo utilizado fue un Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL1200EX con energía de transmisión de 114kv y un aumento de X120k, las imágenes obtenidas tienen una resolución de 50 nm.

Los protocolos de la preparación de las muestras para la observación microscópica se pueden consultar en el anexo 4.

3.3 Método de dispersión dinámica de luz

Se realizó una prueba del tamaño de partícula mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) con el equipo Mastersizer 2000, se tomó una gota de la solución de MNPs decantada y se introdujo al sistema del mastersizer, éste se encarga automáticamente de generar una obscuración para encontrar el volumen de concentración de las partículas en la solución, de disolver la muestra y aplicar procesos de agitación y ultrasonido para tratar de dispersar las partículas.

3.4 Espectroscopía de infrarrojo

La caracterización estructural de los sistemas sintetizados implica identificar los componentes presentes en la muestra. Se utilizó un espectrómetro Nicolet 6700 de la marca THERMO, se leyó en el rango de longitud de onda entre $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Realizando 64 escaneos por muestra. Las muestras analizadas fueron polvo de MNPs que se obtuvo mediante liofilizado de la solución preparada por co-precipitación y el xerogel de PVA + MNPs.

Los protocolos de la preparación de las muestras para FTIR se pueden consultar en el anexo 5.

3.5 Difracción de rayos X

Como confirmación cualitativa de los componentes presentes la muestra liofilizada de MNPs y el xerogel de PVA + MNPs. Se realizó una prueba de difracción de rayos x con el fin de identificar las fases de óxido de hierro presentes. Utilizando un difractómetro de rayos X PANalytical X'Pert PRO MPD, con radiación de cobre en una longitud de onda $1,5406 \text{ \AA}$. Una potencia de 45 kv y 40 mA, en un rango de 20° a 80° en condiciones ambientales normales (presión atmosférica y temperatura ambiente) con un ángulo de paso de 0.013° . Para el xerogel el ángulo de barrido debe ser entre 0° a 80° .

Los protocolos de la preparación de las muestras para DRX se pueden consultar en el anexo 6.

3.6 Otras caracterizaciones

Adicional a la preparación y caracterización de las MNPs para cumplir el objetivo principal propuesto, se evaluó el efecto de la presencia de las diferentes muestras sintetizadas al

entrar en contacto con células, mediante la medición de la actividad metabólica, como expresión de la viabilidad por medio de MTT.

3.6.1 MTT

3.6.1.1 Preparación de las muestras

Con el fin de evitar la contaminación de los cultivos, se llevó a cabo una esterilización de las muestras a evaluar, se dejaron sumergidas en etanol al 70% por 24 horas, y 1.5 horas antes de ponerse en contacto con las células se lavaron y almacenaron en EMEM (Medio de cultivo celular) para minimizar los residuos de etanol. En cuanto a las MNPs, se pusieron 3 mg de muestra liofilizada en 2 mL de etanol, se llevaron a centrifugación 1000 rpm por 2 minutos y se pusieron en ultrasonido por 50 minutos, 1,5 horas antes de ponerse en contacto con las células, se centrifugaron por 5 minutos a 1200 rpm para precipitar un botón de MNPs, se extrajo el etanol y se resuspendieron en 2 mL de EMEM, repitiendo el proceso de reemplazo de EMEM para garantizar la salida del etanol de la muestra. Todas las muestras se almacenaron en la incubadora por alrededor de 1,5 horas para que adoptaran las condiciones de temperatura y de gases a las que permanecen las células en cultivo.

3.5.1.2 Prueba MTT

Se cultivaron células derivadas de ovario de hámster chino (CHO) en 20 pozos de cultivo de 500 μ L, 150000 células en cada pozo, utilizando medio EMEM, suero bovino fetal 10% y penicilina estreptomycin al 1% en un volumen total de 500 μ L puestos en cultivo por 24 horas. Transcurridas las 24 horas, se cambió el medio de cultivo y se pusieron las células en contacto con las muestras previamente preparadas para hacer un análisis por triplicados.

- Matrices de PVA-quitosano 80%-20% sin MNPs.
- Matrices de PVA-quitosano 80%-20% con MNPs.
- Hidrogeles de PVA al 10% sin MNPs.
- Hidrogeles de PVA al 10% con MNPs.
- MNPs en una concentración de 200 μ g/mL.
- MNPs en una concentración de 100 μ g/mL.

Las muestras en contacto con las células se dejaron en cultivo por 24 horas más, adicional se dejó un pozo sin ningún tratamiento, del que se espera actividad celular normal, que actuaría como control negativo (C-); y un pozo con etanol al 70%, que sería el control positivo (C+). Al cumplirse las 24 horas, se cambió nuevamente el medio, adicionando esta vez sólo 225 μ L de EMEM y se agregaron 25 μ L de MTT. Se incubaron las células por 3 horas. Luego se procedió a reemplazar el medio de cultivo por 900 μ L de DMSO para disolver los cristales de formazán. Finalmente Se realizó espectrofotometría con una longitud de onda de 556 nm para obtener la absorbancia de cada solución y se comparó con una curva de calibración obtenida previamente en el laboratorio de biotecnología en salud de la EIA – CES para conocer la cantidad de células presentes en cada pozo.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Síntesis por medio de co-precipitación

En la Figura 5, puede verse que la solución de cloruro ferroso en HCl presenta una tonalidad verde azul y el cloruro férrico, también en HCl un amarillo fuerte. La mezcla de ambas soluciones presenta un color amarillo. En el proceso de síntesis por co-precipitación, mientras se añade el amonio y ocurre la nucleación de las partículas, como indicador de la reacción, se va cambiando de tonalidad gradualmente, desde un naranja-marrón, pasando por un café claro, y otros tonos más oscuros, hasta llegar a negro. Este cambio de tonalidad indica la formación de partículas, dependiendo de ésta se puede tener un indicio de la fase del óxido de hierro presente en la solución. Cuando el precipitado es negro se sabe que hay presencia de magnetita, cuando es un café rojizo hay presencia de maghemita y cuando es rojo hay presencia de hematita (Bruce et al.,2004).

Observar un precipitado negro es la primera prueba que se pueda tener de la presencia de magnetita en la solución. Durante la etapa de adición del hidróxido de amonio también se generaron vapores por la evaporación del amonio y el HCl que se tiene en la muestra. Al finalizar el proceso, en la reacción final, tras la decantación, se observa un precipitado que corresponde a las MNPs y un sobrenadante de otros componentes generados en la reacción que se puede descartar, ya que el interés es centrifugar el precipitado de las MNPs.

Este precipitado se trata con tetrametilamonio para asegurar una protección de las partículas de la aglomeración después del proceso de síntesis. Se ha demostrado que un buen proceso de protección se da con el tetrametilamonio (Berger et al.,1999) como surfactante, pero se puede probar el proceso con otros surfactantes aniónicos como: tween 80 u oleato de sodio.

En lugar de adición de amonio como base, se podría utilizar y se ha reportado el uso de NaOH 3M (Ma, Qi, Maitani, & Nagai, 2007), pero el hidróxido de sodio es una base fuerte y al reaccionar con el HCl, en el cual están disueltas las sales férricas, ocasiona una reacción exotérmica que podría oxidar las MNPs reduciendo sus propiedades magnéticas.

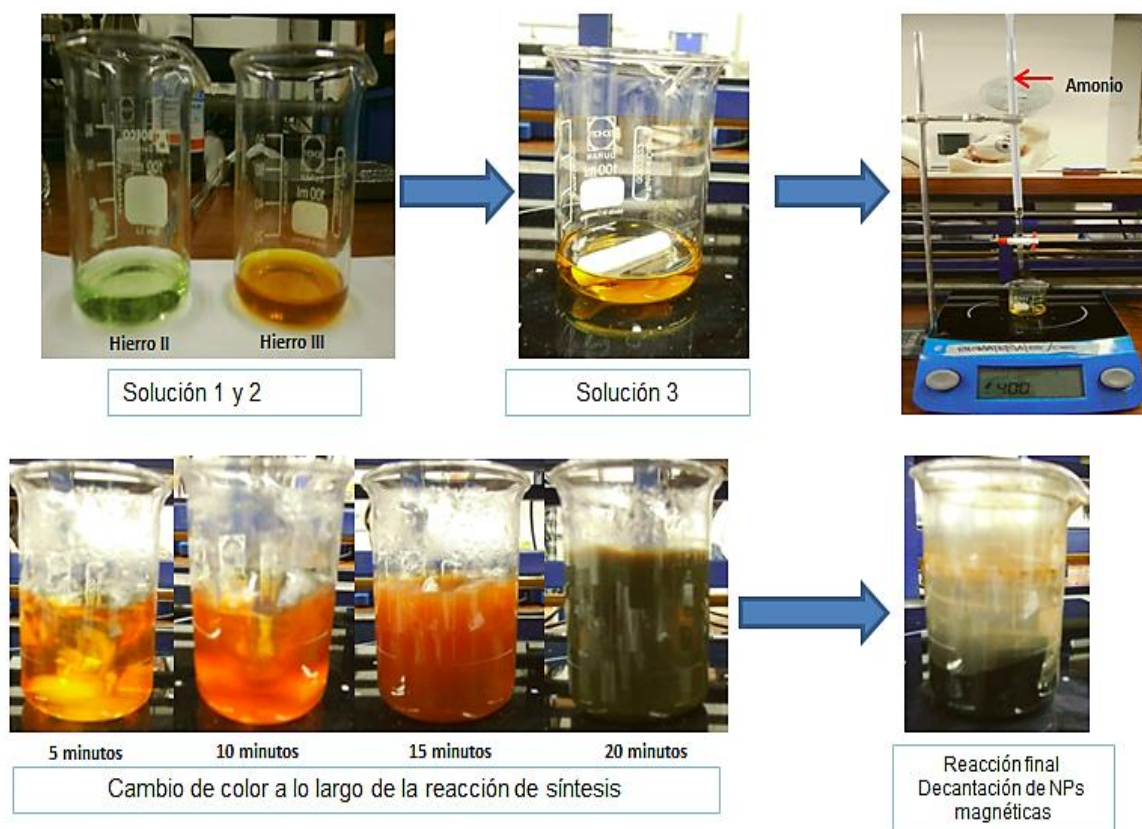


Figura 5. Resultados síntesis por co-precipitación.

4.2 Preparación de PVA e incorporación de las MNPs

En la preparación de PVAe incorporación de las MNPs como se observa en la Figura 6, se mezcla la solución de PVA al 10% con las MNPs sintetizadas por co-precipitación, una vez se unen estas dos soluciones no hay cambio de color en las MNPs sintetizadas lo cual es un indicativo que el PVA no reacciona con las partículas. Esto es debido a que no hay una interacción molecular entre las soluciones sino que la estructura química del PVA va a ejercer un efecto de separación física entre los aglomerados de partículas. Posterior a la mezcla de las soluciones se añade la solución de entrecruzamiento mostrada en la Figura 4 y se colocan alícuotas de 3 mL de la solución PVA+ NPs con 1 mL de la solución entrecruzante. Retornando a la Figura 6 se puede observar que tras el proceso de secado las muestras de xerogel siguen teniendo la coloración negra característica de las MNPs sintetizadas.

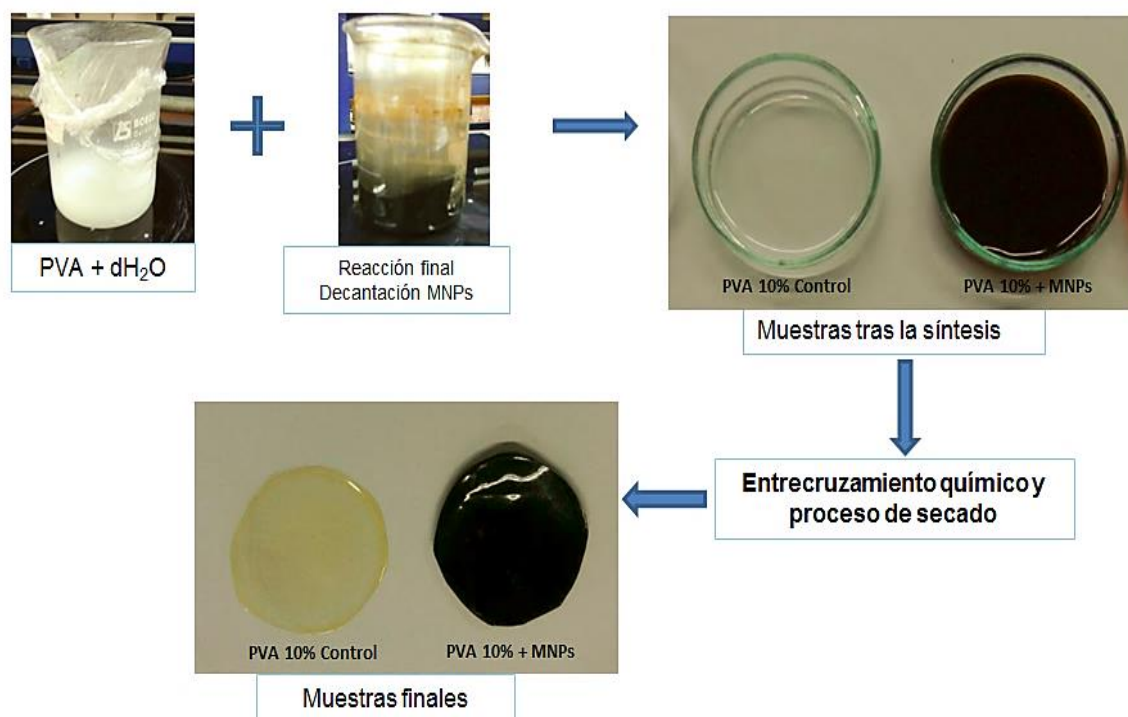


Figura 6. Resultados de preparación de PVA e incorporación de las MNPs.

Se incorporan las MNPs en el PVA debido a que en procesos biológicos se ha mostrado que las MNPs sin recubrimiento se oxidan dentro del organismo e ingresan al ADN de las células ocasionando su oxidación y posterior degradación, afectando principalmente tejidos como el pulmonar (Singh et al., 2012). Por esta razón se busca un polímero como el PVA que las recubre y proteja de los efectos mencionados, en trabajos realizados por Lee y sus colaboradores se ha mostrado por medio de caracterización con DRX y FTIR que el PVA recubre las MNPs y este recubrimiento depende del % de PVA utilizado en la síntesis (Lee et al., 1996). En este caso se trabaja con una concentración del 10% que crea un xerogel con una microestructura que podría aplicarse a liberación controlada de medicamentos en tratamientos cutáneos o procedimientos de hipertermia, también en cáncer de piel, se debe especificar que para estas aplicaciones se necesita tras el proceso de síntesis pruebas *in vitro* e *in vivo* que validen el modelo.

4.3 Incorporación de las MNPs a matrices de PVA – quitosano

En la Figura 7 se observa el procedimiento seguido para la incorporación de las MNPs previamente sintetizadas a la matriz de PVA-quitosano. Mediante la inmersión de las muestras de matriz en la solución de MNPs previamente sintetizada por 20 minutos, lo que se busca es que las MNPs ingresen a los poros de la matriz con el fin de adherirse a su estructura y otorgarle propiedades magnéticas útiles para complementar las propiedades de la matriz.

Las matrices de PVA- quitosano al ser una unión de un polímero sintético con uno natural, presentan mejores propiedades para la adhesión celular y las características mecánicas que estos dos precursores por separado. Se quizá comprobar que los componentes presentes en ellas, no ocasionaban pérdida del magnetismo de las MNPs, esta mezcla de componentes puede tener aplicaciones prometedoras en la ingeniería de tejidos como un material que presenta buena resistencia mecánica, donde las MNPs le otorgan la capacidad de generar estímulos mecánicos inducidos por un campo magnético externo con el fin de promover el crecimiento celular funcional.

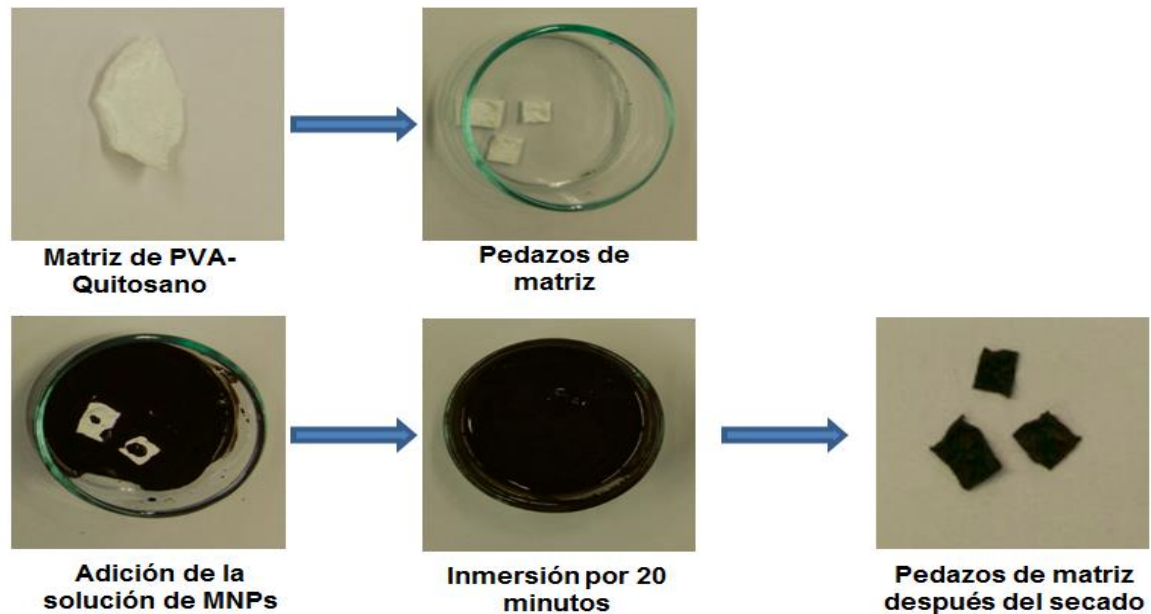


Figura 7. Incorporación de las MNPs en una matriz de PVA-Quitano

En el campo de la ingeniería de tejidos, no se ha explorado demasiado este tipo de combinación de materiales, y los estudios que se reportan son apenas del 2011 cuando Udrea y su grupo de colaboradores realizaron diferentes composiciones de microesferas con PVA, quitosano y MNPs con el fin de caracterizarlas mediante TEM, DRX, FTIR y magnetografía, para ser soporte de grupos aminos que capturen componentes tóxicos presentes en sangre y realizar desintoxicación en pacientes con insuficiencia renal o hepática (Elena Udrea, Hritcu, Popa, & Rotariu, 2011).

Adicional a este reporte de aplicación biomédica, respecto a la ingeniería de tejidos con propósitos en regeneración ósea, también en 2011 Wei y sus colaboradores fabricaron mediante electrospinning membranas nanofibrosas para regeneración ósea de PVA-quitano y MNPs. A estas membranas se les realizaron pruebas de FTIR, DRX, TEM, magnetometría y adicional cultivos de osteoblastos humanos para comprobar por medio de MTT viabilidad celular y por SEM la adhesión de las células a las matrices, mostrando resultados positivos para la proliferación celular (Wei et al., 2011). A diferencia del trabajo de Wei en el cual se necesitan dispositivos para la creación de las membranas y se busca que estas sean soportes a nivel macro, en nuestro trabajo por el método seguido en el

laboratorio no se necesitaría de equipos complejos para la creación de las matrices PVA-quitosano + MNPs.

4.4 Propiedades magnéticas

En esta etapa no se especificó qué tipo de material magnético se espera obtener de la síntesis de las sales de hierro por esta razón las pruebas de las propiedades magnéticas no son muy rigurosas, basta con acercar un imán a las diferentes muestras preparadas como se observa en la Figura 8, para que las MNPs se fijen a él. Se puede ver en la imagen A que la solución de MNPs tras la síntesis de co-precipitación logra dejar el imán sostenido debajo del frasco donde se encuentran las MNPs.

En la imagen B el producto liofilizado de MNPs se puede ver que estas se orientan en dirección al campo magnético con que se estimulan, creando picos. Estos picos definidos indican la presencia de MNPs de pequeño tamaño en la muestra, tal como se ha indicado en la estimulación magnética de ferrofluidos, en la cual cuando se ponen dos imanes, cerca de ellos se observan los picos creados por las MNPs presentes en la solución (Berger et al., 1999).

Respecto a la muestra de xerogel en la imagen C vale la pena destacar que a pesar que el PVA recubre las MNPs estas no pierden sus propiedades magnéticas (Gonzalez et al., 2011), por el contrario la atracción que van a presentar al campo magnético se relaciona con la cantidad de MNPs que se mezclan con el PVA.

Por último se debe mencionar como se observa en la imagen D que la incorporación de las MNPs en la matriz PVA-quitosano fue exitosa, ya que se ve atracción al campo magnético y en las pruebas que se describirán de preparación para el análisis de actividad celular, no se observa que las matrices pierdan sus propiedades magnéticas al hincharse, ni que se salgan las MNPs de la estructura.

Para comprobar propiedades magnéticas específicas sería necesario hacer pruebas con un magnetómetro que permitan comprobar que tipo de magnetismo exhiben las muestras y además dan resultados adicionales del tipo de fase de hierro que se tiene presente. Una prueba sugerida es la magnetografía (Puca Pacheco, Guerrero Aquino, Tacuri Calanchi, & López Campos, 2013).

La característica magnética que se busca es la de superparamagnetismo, ya que se ha mostrado que las NPs con esta característica tienen muy buen desempeño en aplicaciones biomédicas. Para ser superparamagnéticas las NPs deben transformarse de un estado ferromagnético a uno paramagnético, dicha transformación se da en función del tamaño de partícula. Un tamaño crítico para el diámetro de las partículas de magnetita es de 20 nm, inferior a este tamaño teóricamente se exhibe el fenómeno de superparamagnetismo (Jiang Wen, 2009).

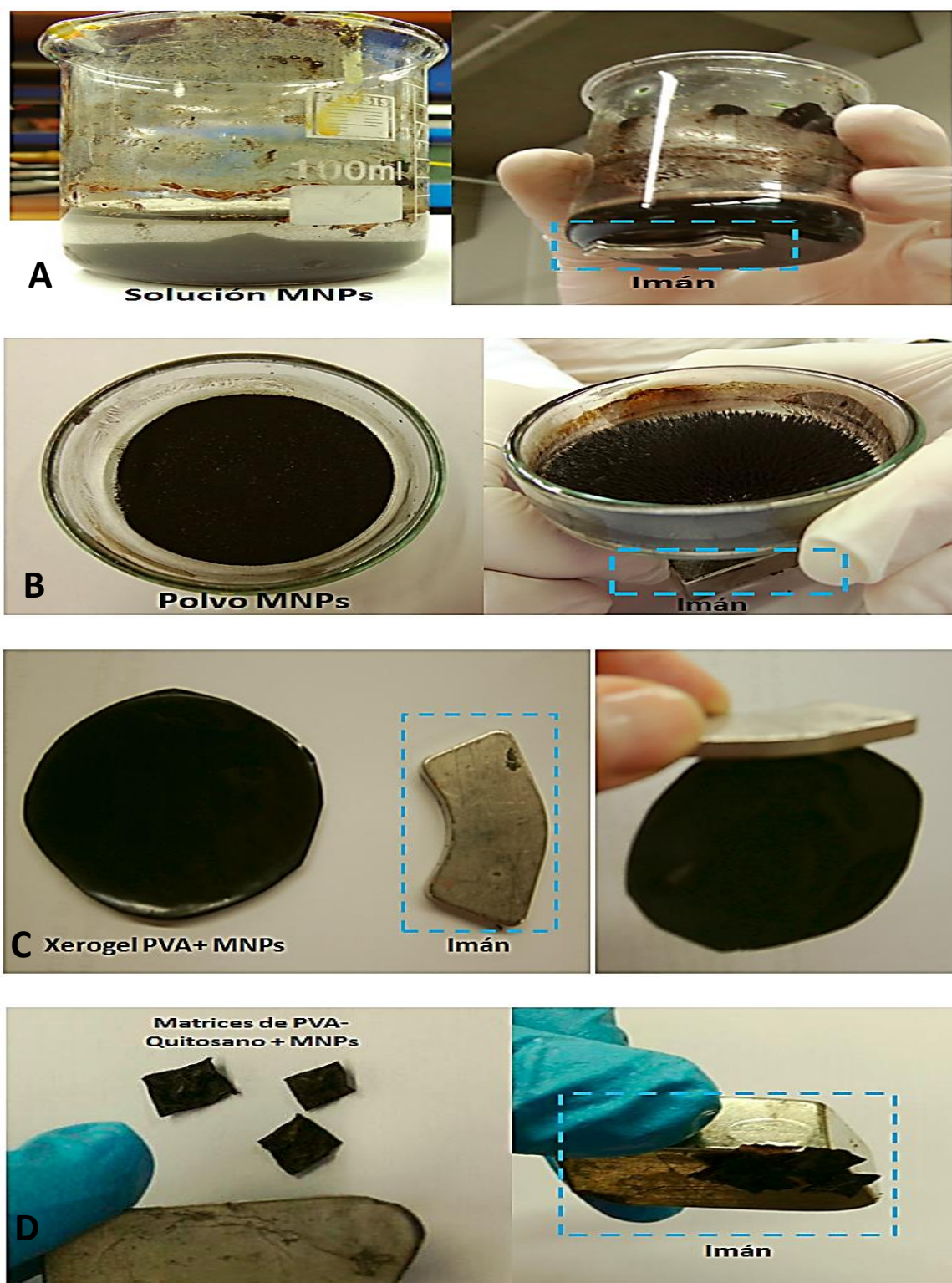


Figura 8. Prueba de propiedades magnéticas en las diferentes muestras.

4.5 Método de dispersión de luz (tamaño de partícula)

Se obtuvieron agregados de partículas entre $0.3\ \mu\text{m}$ y $1\ \mu\text{m}$. El 2,5% de la solución se encuentra en este rango. La Figura 9 muestra una gráfica que se conoce como polidispersa, indicando que posiblemente las partículas son del tamaño mencionado, o que pueden ser el reflejo de agregados llamados flóculos irreversibles. En general se puede decir que el tamaño promedio de partícula es de $2.51\ \mu\text{m}$ lo cual sugiere que el sistema está compuesto de flóculos y una pequeña cantidad de nanopartículas en la solución.

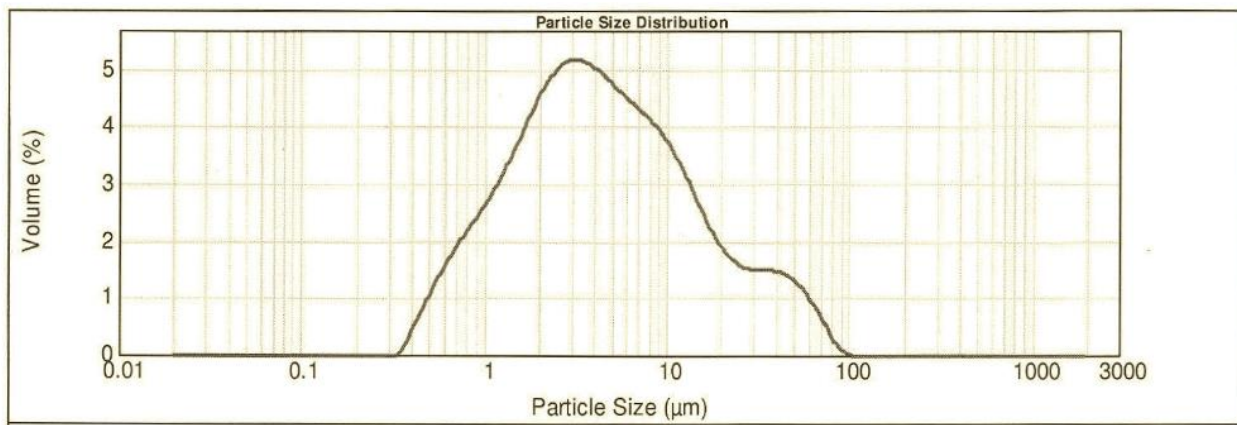


Figura 9. Resultados tamaño de partícula método de dispersión de luz.

Sería necesaria la repetición de esta prueba para ver si por medio de métodos mecánicos o cambiando las concentraciones del surfactante se pueden desagregar los flóculos irreversibles, y utilizando una muestra de sobrenadante de la solución donde se tiene la hipótesis que hay mayor presencia de partículas de tamaño nanométrico. Ya que en este caso la prueba se realizó en el decantado.

Estudios de mediciones del tamaño de partícula usando técnica de dispersión de luz, obtienen valores de 12.5 nm de diámetro para MNPs de magnetita sin recubrimientos, un valor muy similar al calculado por la ecuación de Scherrer para MNPs presentadas en este trabajo (Mahmoudi et al., 2010). El equipo de Singh también reportó por DLS la medición del mismo tipo de partículas con un tamaño aproximado de 10 nm (Singh et al., 2012). En el caso de Lee y sus colaboradores mostraron que al observar MNPs por TEM obtenían valores aproximados a 9 nm mientras que cuando las observaban por medio de DLS, los valores aumentaban aproximadamente a 26 nm, este hecho ocurría por la agregación rápida de las partículas una vez estaban en solución (Lee et al., 1996). Con estos reportes se podría concluir que para aplicar la técnica de DLS es necesario procesar las muestras tan rápido como sea posible para evitar aglomeración de las partículas en la solución, en el caso de las muestras analizadas. También es necesario replantear entonces parámetros del proceso de síntesis como la agitación, el volumen de la gota de amonio, el tiempo de adición, la velocidad de adición y el momento en el cual se agrega el surfactante; si debe seguir agregándose en concentraciones más altas al final de la reacción o durante su síntesis.

4.6 Microscopías

4.6.1 Microscopía óptica

Se tienen dos tipos de resultados para la microscopía óptica, MNPs tratadas y sin tratar con tetrametilamonio como surfactante. En la Figura 10 se pueden observar las imágenes de los filtros sumergidos en una solución de MNPs en cuya síntesis no se utilizó ningún tipo de surfactante para evitar la aglomeración de las partículas. En la imagen A se puede ver el filtro sin sumergir en el sobrenadante, en la imagen B se ve el filtro tras ser sumergido pero dejado en la solución por aproximadamente 1 segundo, y para la imagen C la inmersión fue de más de un segundo. Si se compara la imagen B con la C se puede ver que el tiempo de inmersión tiene una relación con la cantidad de partículas acumuladas. La escala trabajada es de 1 mm por lo que el tamaño de partícula observada en las imágenes aún es grande para lo esperado. Aclarando que con la microscopía óptica no se alcanza la resolución necesaria para observar MNPs y que el tamaño de los poros del filtro es de $0.45\text{ }\mu\text{m}$ por lo que es probable que los aglomerados se queden incrustados en los poros, en el proceso de inmersión. No hay reportes previos de un experimento similar para realizar comprobación de presencia de aglomerados en la solución de MNPs sintetizada, esto es debido a que técnicas más avanzadas dan resultados mucho más concluyentes acerca de los elementos de la muestra, sin embargo este proceso representa un buen primer acercamiento a la presencia o no de partículas en las muestras sintetizadas.

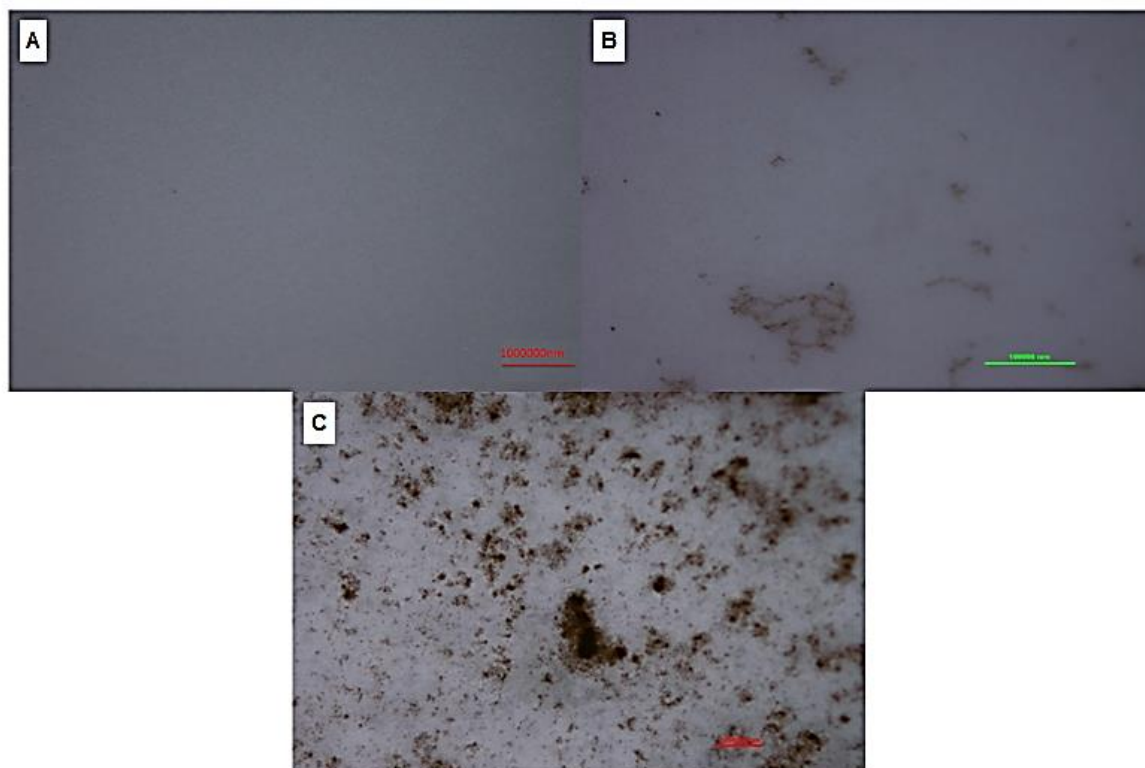


Figura 10. Microscopía óptica MNPs filtradas, sintetizadas sin surfactante. Escala 1 mm aumento 20X.

En la Figura 11 se puede observar una muestra de la solución utilizada es de MNPs tratadas con el surfactante catiónico tetrametilamonio posterior a la síntesis, en la imagen A se observa el filtro sin sumergir en el sobrenadante, en la imagen B se observa el filtro tras ser sumergido por menos de 1 segundo, y en la imagen C se observa el filtro tras ser sumergido por más de un segundo. En esta secuencia de imágenes no se nota una diferencia significativa cuando se varía el tiempo de inmersión del filtro. Lo que sí se puede notar es la presencia de menos manchas en el papel respecto a lo observado en la Figura 10, lo cual simboliza que en la solución tratada con el surfactante se presentan menos aglomerados que en la que no lo contenía. Los aglomerados de partículas, aunque muy pequeños son los apuntados por las flechas de color negro.

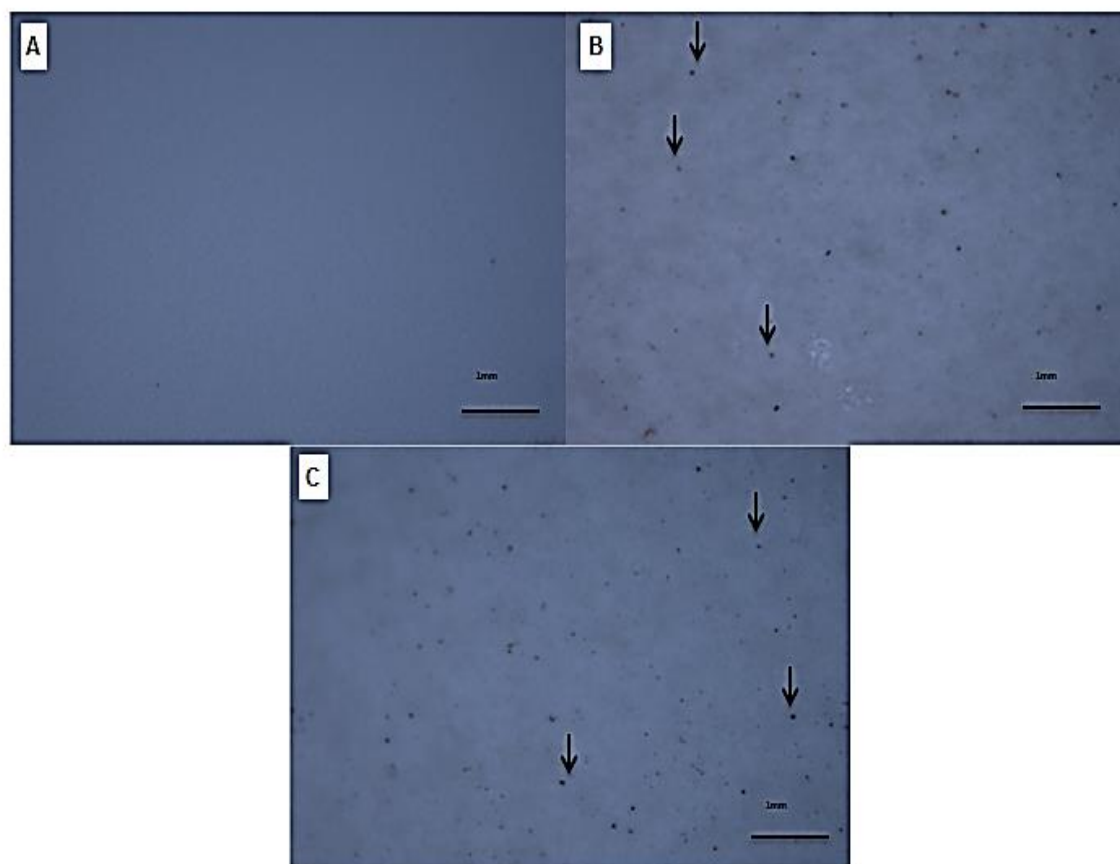


Figura 11. Microscopía óptica MNPs filtradas, sintetizadas con surfactante. Escala 1 mm aumento 20X.

En la Figura 12 se observa los aglomerados de MNPs en hidrogeles de PVA, estos se sumergieron en una solución de sobrenadante de MNPs con el fin de capturar las MNPs en los poros del hidrogel, lo cual puede ser una alternativa para formar el sistema que se está buscando. En la imagen A se observa la membrana antes de la inmersión y en la imagen B la membrana dejada aproximadamente 5 minutos en la solución de las MNPs tratadas con surfactante. No se muestran imágenes de un tiempo de inmersión menor ya que en estas no se observó presencia de MNPs, posiblemente porque por el tamaño de los poros del

hidrogel todas las MNPs atravesaban el gel y al final solo quedaron las que se encontraban en aglomerados de tamaño micrométrico.

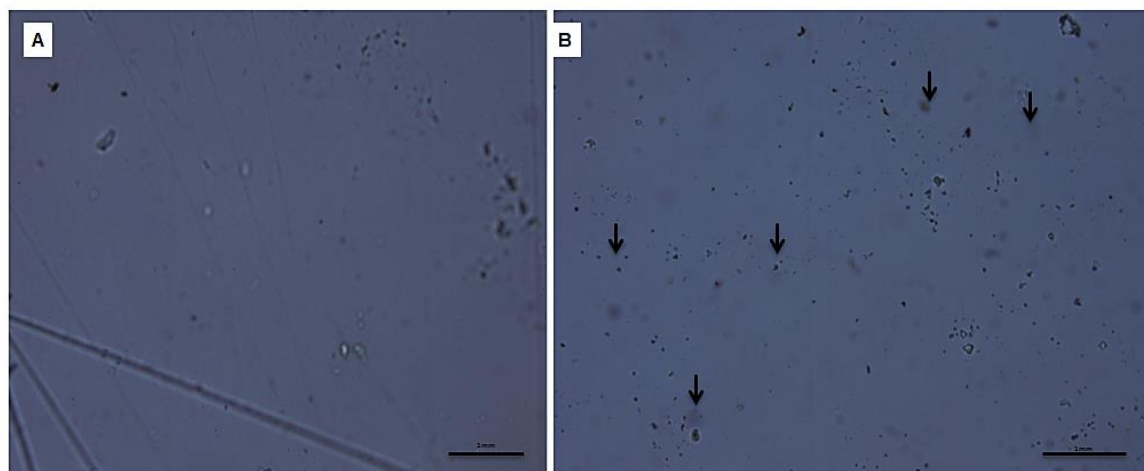


Figura 12. Microscopía óptica MNPs filtradas en PVA, sintetizadas con surfactante. Escala 1 mm aumento 20X.

4.6.2 Microscopía de fuerza atómica

Para las pruebas de AFM se utilizó una gota del sobrenadante de la solución de MNPs tratadas con tetrametilamonio y posteriormente lavadas para retirar el exceso de tetrametilamonio que es un componente muy higroscópico e impide que la gota depositada en el sustrato se pueda secar.

En la Figura 13 se puede observar la presencia de partículas en la solución depositada en el sustrato de silicio, en la imagen A se observa una región del sustrato limpio que presenta una superficie uniforme, este barrido se realizó en un área de $100 \times 100 \mu\text{m}$. Luego en la imagen B se puede observar un barrido con mayor resolución de $50 \times 50 \mu\text{m}$ donde se presentan unas estructuras de apariencia esférica que concuerdan con reportes de imágenes AFM de MNPs (Kim, Ahn, & Lee, 2007; Gibbs, Eschenazi, & Papadopoulos, 2005). En la imagen se muestra una figura delimitada por una línea punteada (verde fluorescente) que indica unas estructuras globulares de las cuales no se tiene certeza que sean aglomerados de partículas o podrían ser contaminación, para esto debería realizarse un análisis de rayos X a la muestra, para identificar los componentes presentes. Con la imagen B es posible decir que en la muestra hay figuras aparentemente circulares de mínimo $2.5 \mu\text{m}$, estas se midieron a través del software Image J, estas esferas pueden representar nubes de aglomerados que se observan con mayor detalle en las imágenes de TEM que se muestran más adelante, sin embargo es un indicio directo de que seguido el proceso de síntesis se encuentran partículas en la solución.

Otros investigadores han reportado que con esta técnica se observan las partículas como puntos blancos en contraste con el sustrato debido a la altura de los componentes presentes,

de una manera similar a las imágenes obtenidas en la Figura 13, y midiendo la distancia del eje Y se obtiene un tamaño de partícula en la escala nanométrica (Ma et al.,2007).

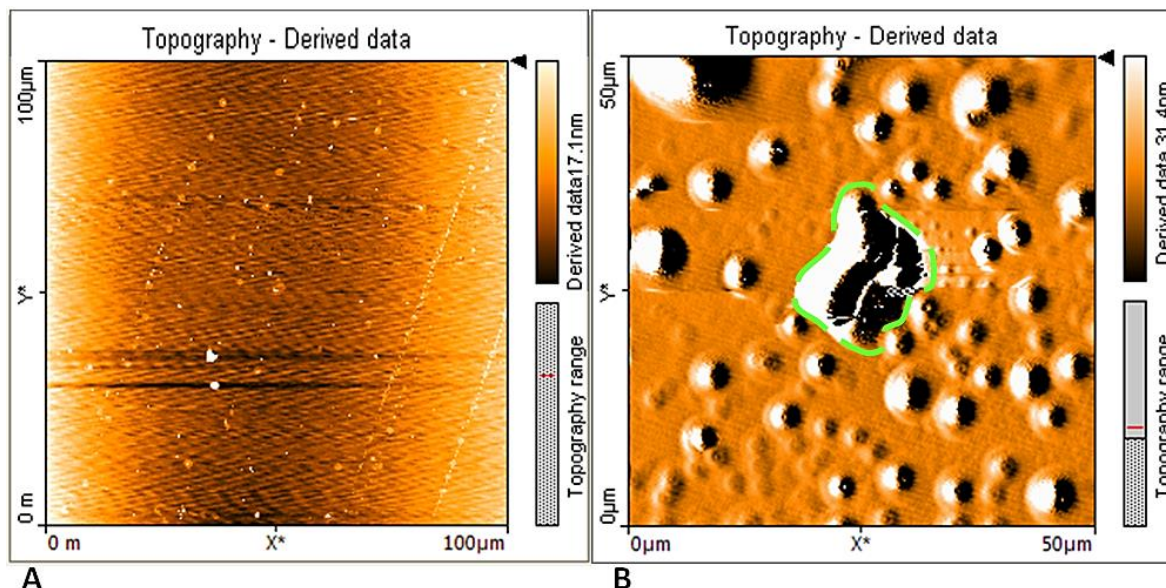


Figura 13. Resultado AFM, solución de MNPs.

4.6.3 Microscopía electrónica de transmisión

Las imágenes obtenidas por TEM son la confirmación directa del tamaño nanométrico de las partículas obtenidas por el método de síntesis por medio de coprecipitación. En la Figura 14 se pueden observar aglomerados de MNPs donde la escala es de 50 nm y con una comparación visual se puede decir que las MNPs tienen un tamaño menor de 50 nm y posiblemente cercano a los 15 – 25 nm. Usualmente las MNPs de hierro se caracterizan por presentar estructuras de configuración cúbica, pero esta se ve alterada cuando se usan surfactantes en el proceso de síntesis tal como reporta Tan (Tan & Bakar, 2006), en este caso el tetrametilamonio. Por esta razón se cree que las MNPs tienen una tendencia a ser amorfas, aunque también se identificaron ciertas MNPs cúbicas y semiesféricas.

Por la naturaleza de las MNPs es complejo realizar su observación individual, ya que ellas tienden a aglomerarse y no es posible realizar un TEM del xerogel donde se asume que se encuentran más dispersas al estar recubiertas de PVA. Son justamente estos aglomerados en los cuales resaltan algunas MNPs los que se observan en la Figura 14.

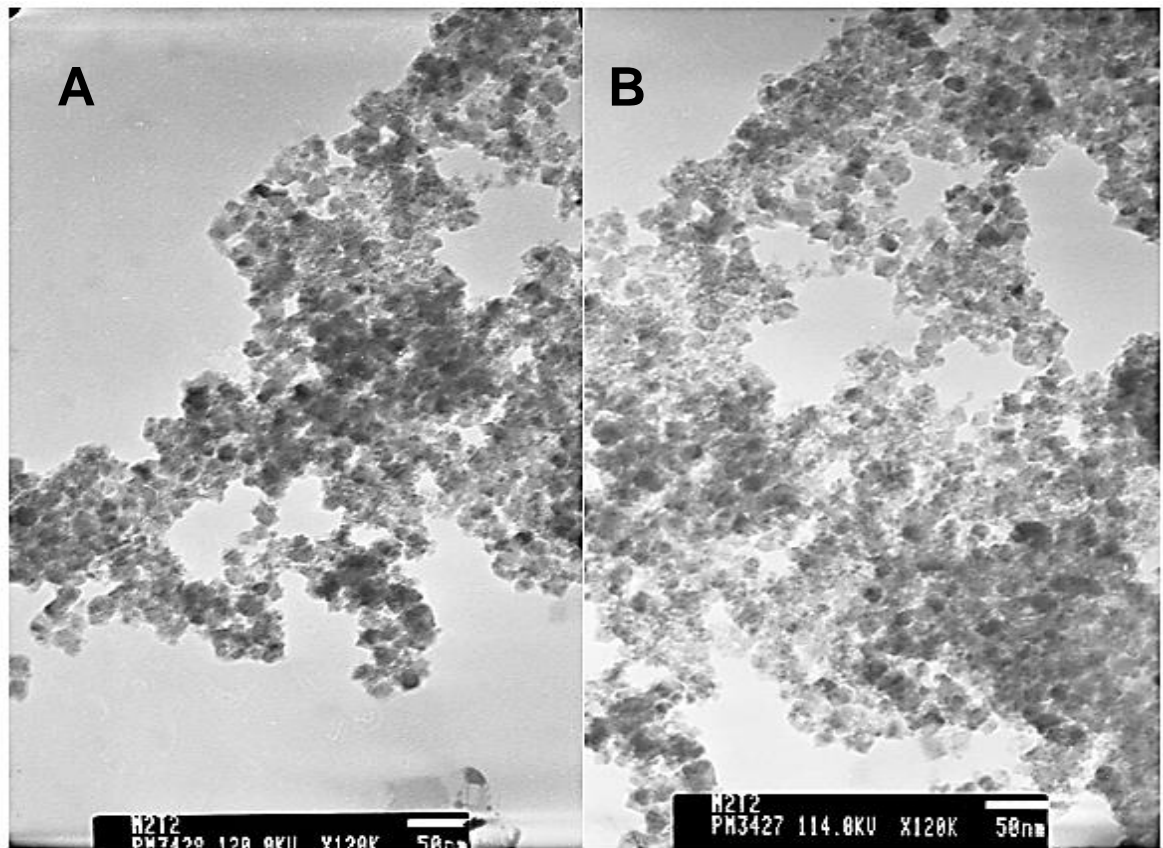


Figura 14. Imágenes TEM solución de MNPs

Con el fin de dar una aproximación al tamaño de partícula se analizó la distribución de las áreas de las MNPs que se podían identificar con el software NIS Elements D 3.10 de Nikon. La distribución promedio del área se presenta en la

Figura 15, se realizó el conteo de 200 MNPs de las observadas en la Figura 14 (Imagen B, no se muestran las áreas elegidas).

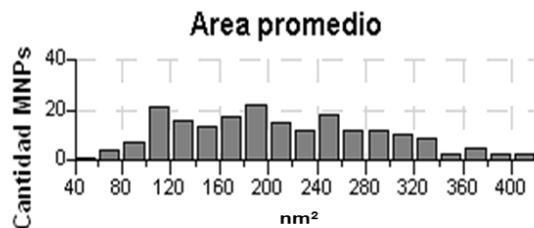


Figura 15. Área promedio de las MNPs

Se identifica que la mayoría de las MNPs están en un rango de área aproximado de 100 – 320 nm² de área. Como no se presenta una geometría definida se plantean dos

suposiciones para encontrar la longitud de MNPs, la primera es una estructura cúbica ya que las partículas de hierro tienen tendencia a crecer con esta configuración, pero se puede ver alterada por los reactivos utilizados en la solución (Tan & Bakar, 2006), para esta geometría el tamaño de la partícula (longitud de un lado del cubo) sería $\sim 13.4 \pm 3.29$ nm.

La segunda geometría que se puede asumir es un geometría semiesférica, para efectos de cálculos se aproxima a una geometría circular, en este caso el tamaño de las partículas (diámetro) sería $\sim 15.16 \pm 3.72$ nm. En este rango las MNPs estarían en un rango de tamaño crítico donde podrían exhibir propiedades de superparamagnetismo como se describió previamente.

4.7 Espectroscopía de infrarrojo

En la Figura 16 se puede observar el espectro en modo transmitancia del producto liofilizado de MNPs liofilizadas, en éste hay varios puntos que se destacan ya que identifican la presencia de hierro en la muestra (indicados por flechas). Los picos de transmitancia más notorios y de interés, corresponden a los identificados en la Tabla 1.

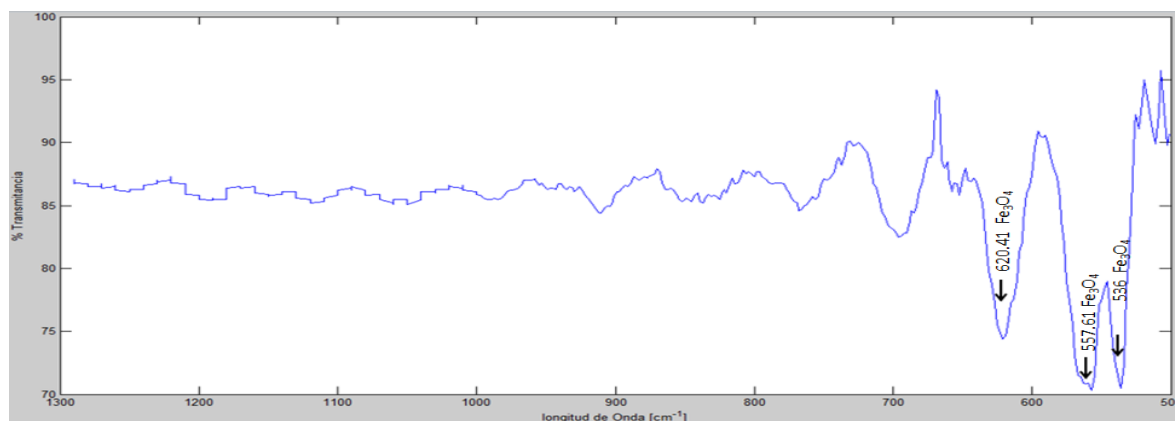


Figura 16. Espectro FTIR en modo transmitancia del producto liofilizado de MNPs.

En la Figura 17 se observa el espectro xerogel PVA+ MNPs, se destacan 7 picos importantes cuyos componentes se identifican en la Tabla 1.

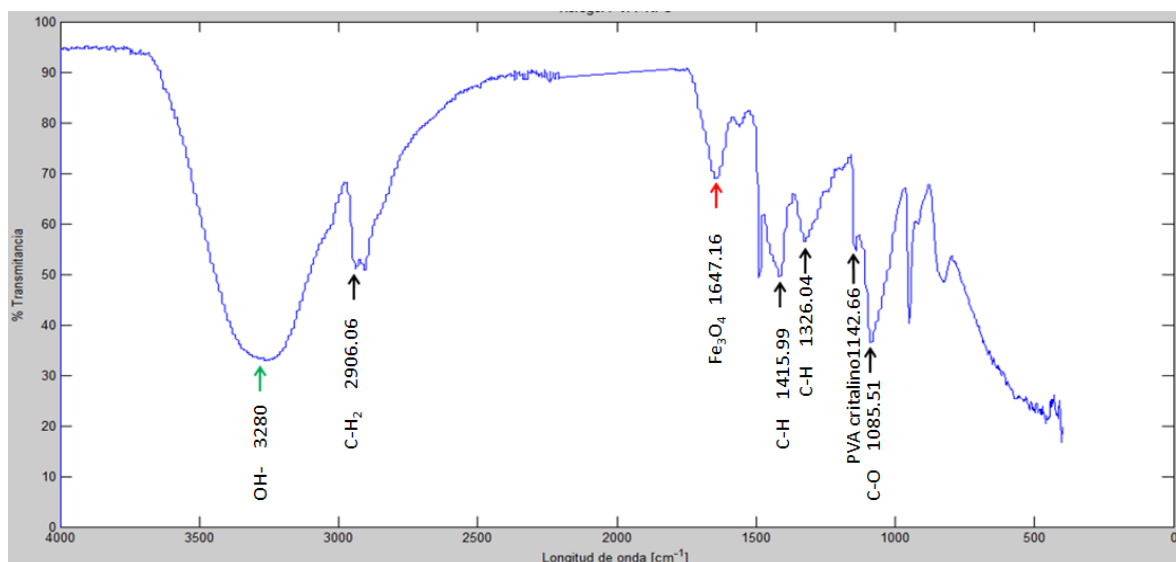


Figura 17. Espectro FTIR en modo transmitancia de PVA+ MNPs en xerogel.

Los picos observados en la Figura 16 y reportados en la Tabla 1 en 620.41, 557.61 y 536 cm^{-1} indican la presencia de magnetita en la muestra de polvo de NPs, estos picos en rangos muy similares de longitud de onda han sido reportados previamente en la literatura en trabajos con NPs de hierro (Lara Rodríguez P, Carranza Bernal S, & Hinojosa Rivera M, 2005; Tan & Bakar, 2006; Ma et al., 2007).

Tabla 1. Bandas de absorción para el FTIR de las diferentes muestras.

Polvo de MNPs		PVA+ MNPs	
Longitud de onda (cm^{-1})	Componente	Longitud de onda (cm^{-1})	Componente
620.41 557.61 536	Magnetita (Fe_3O_4)	2906.06	Vibración de estiramiento de C-H_2
		1415.99	Vibración de deformación de C-H en PVA
		1326.04	
		1085.51	Vibración de estiramiento de C-O en PVA
		1142.66	PVA cristalino
		1647.16	Magnetita
		3280	Enlaces OH^- Agua

Respecto a la Figura 17 para el xerogel de PVA+ MNPs se observa picos característicos de la presencia de PVA (flechas negras), el primero de ellos en 2906.06 cm^{-1} que indica la vibración de estiramiento de los enlaces C-H₂ presentes en la estructura de PVA, cercano al valor que se reporta en estudios de 2920.4 cm^{-1} (Hong et al.,2006). El segundo grupo de picos importantes se identifica en 1415.99 y 1326.04 cm^{-1} que indica la vibración de deformación de los enlaces C-H en el PVA, estos valores son cercanos a 1380 y 1330 cm^{-1} reportados para un sistema de PVA+ NPs de hierro (Lee et al.,1996). El tercer pico se presenta en 1085.51 cm^{-1} éste indica la vibración por estiramiento de los enlaces C-O presentes en el PVA similar al valor reportado de 1083 cm^{-1} (Lee et al.,1996). El cuarto pico se presenta en 1146.66 que caracteriza la estructura cristalina del PVA similar al valor reportado de 1142 cm^{-1} (García-Cerda, Escareño-Castro, & Salazar-Zertuche, 2006) y luego en el rango entre 620 y 540 cm^{-1} se esperarían encontrar picos característicos a los observados solo en la muestra de MNPs indicando la presencia de magnetita, sin embargo este fenómeno no se presenta ya que las MNPs al mezclarse con el PVA son recubiertas totalmente y no absorben en este rango. Tal como se reporta en la literatura(Lee et al.,1996), para observar en este rango picos de magnetita debe trabajarse con concentraciones de PVA del 1 o 2 %, en este trabajo como se dijo previamente se trabaja con el PVA al 10%. Aun así se observa en 1647.16 cm^{-1} (flecha roja) la presencia de un pico que es cercano al valor de 1620 cm^{-1} reportado como característico de la magnetita (Lara Rodríguez P et al.,2005) pero que no está presente en los picos característicos del polvo con MNPs. Quizás este fenómeno se presenta debido a que cuando se entrecruzan las MNPs con el PVA las estructuras tienen a perder su aglomeración y esto permitiría la absorción en otras bandas de radiación infrarroja no presentes en la muestra sin PVA. Adicional, como el xerogel aún tiene un poco de contenido de agua, enlaces OH- los cuales se observan en la banda de 3280 cm^{-1} indicada por una flecha verde.

Para confirmar estos picos característicos sería recomendable repetir la toma de datos con nuevas muestras sintetizadas y aumentar el número de barridos para mejorar la resolución de los espectros.

4.8 Difracción de rayos x

En la Figura 18 se observa el difractograma para la muestra en producto liofilizado de MNPs, se pueden ver 6 picos indicados con flechas cuyos componentes son identificados en la Tabla 2.

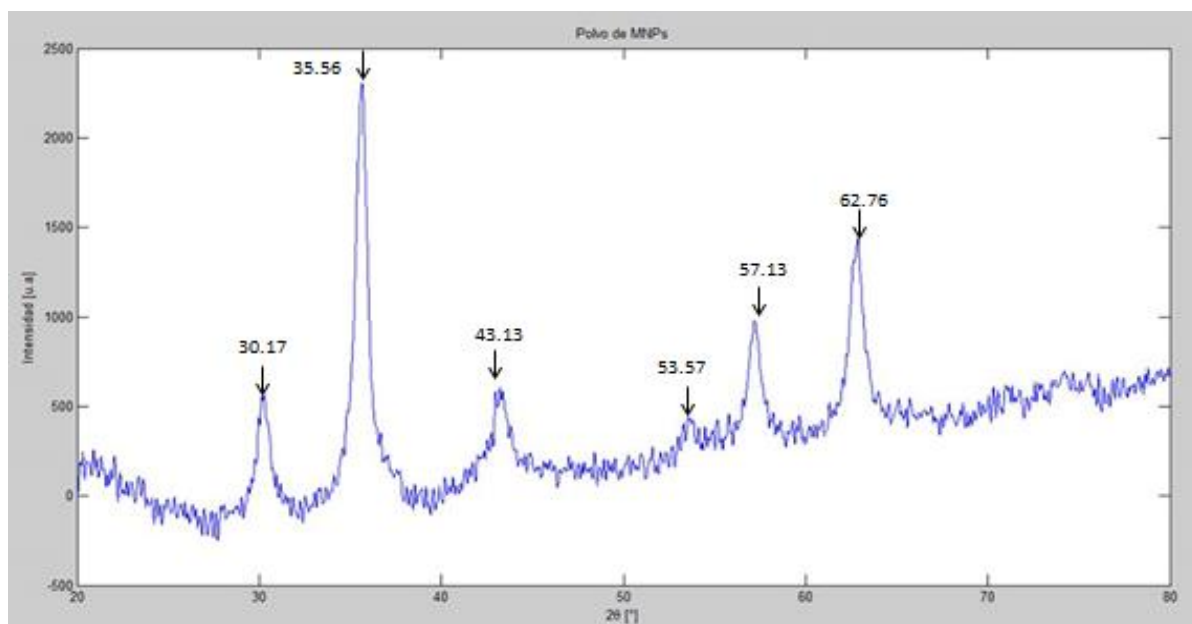


Figura 18. DRX, Picos característicos de la muestra polvo MNPs.

En la Figura 19 se puede observar el difractómetro para el xerogel de PVA+ MNPs, se presentan los mismos 6 picos encontrados en la muestra en producto liofilizado de MNPs (flechas negras) y además 4 picos (flechas rojas) diferentes que indican los componentes del PVA en el sistema y nuevas interacciones, el detalle de los componentes identificados se muestra en la Tabla 2.

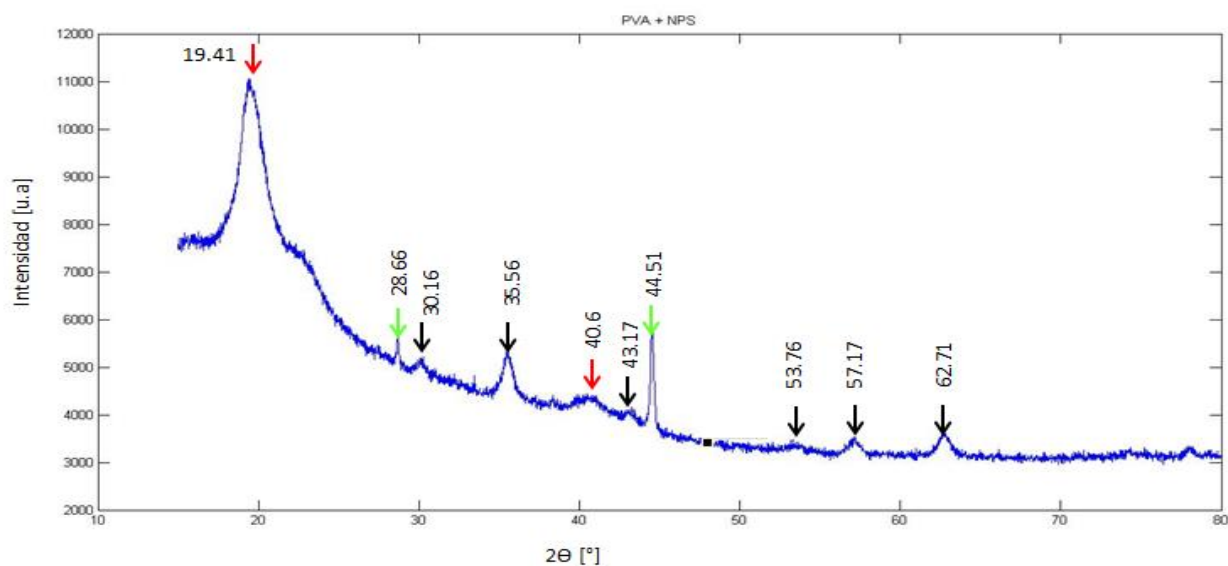


Figura 19. DRX, Picos característicos del xerogel PVA+ MNPs

Tabla 2. Picos principales de la difracción de rayos x para las diferentes muestras.

Producto liofilizado de MNPs		Xerogel PVA + MNPs	
Ángulo 2 θ	Componente	Ángulo 2 θ	Componente
35.56	Magnetita (Fe ₃ O ₄) y/o Maghemita (γ -Fe ₂ O ₃)	35.56	Magnetita (Fe ₃ O ₄) y/o Maghemita (γ -Fe ₂ O ₃)
30.17	Magnetita (Fe ₃ O ₄)	30.16	Magnetita (Fe ₃ O ₄)
43.13		43.17	
53.57		53.76	
57.13		57.17	
62.76		62.71	
		19.41	PVA
		40.6	
		28.66	Otras interacciones
		44.51	

Comparando los picos presentados con los valores obtenidos del centro internacional para la difracción el archivo 19-629 correspondiente al espectro de difracción de la magnetita, se puede identificar que los ángulos encontrados en 30.17°, 35.56°, 43.13°, 53.57° y 62.76°; son los seis picos correspondientes a los planos de difracción 220, 311, 400, 422, 511, 440 respectivamente identificados como magnetita y que indican la ausencia de otras fases de hierro como maghemita o hematita en las muestras (Lee et al., 1996).

Estos picos son similares para las dos muestras analizadas, solo que para el sistema con PVA presentan una desviación en promedio de 0.02°. Lo cual indica que para las dos muestras se encuentra la magnetita como fase principal del hierro sintetizado para las MNPs, estos ángulos han sido reportados previamente (Lee et al., 1996; Tan & Bakar, 2006; Park, 2009) para sistemas similares. Respecto al pico reportado en 35.56° puede ser característico de magnetita y/o maghemita como se indica por Park (Park, 2009) ya que las dos fases de hierro poseen estructuras isomorfas que hacen difícil su identificación, sin embargo, corroborando la presencia de los otros picos característicos solo de la magnetita y la información obtenida por FTIR se puede concluir que la muestra tiene mayormente presencia de magnetita, ya que los difractogramas son huellas de los elementos y no hay dos sustancias con el mismo patrón.

Respecto a lo observado en la Figura 19 los picos en 19.41°, 28.66°, 40.6° y 44.51° corresponden la presencia de PVA en la muestra y las nuevas interacciones que se hayan

podido crear en el sistema, la presencia del PVA en la muestra cómo se reporta Gonzalez (Gonzalez et al.,2011) y por García (García et al.,2006) se encontraría en 19.8° y 40.6° . Para los otros dos picos encontrados 28.66° y 44.51° sería necesario buscar más reportes o análisis en bases de datos que confirmen si pertenecen a la expresión de PVA o exactamente a que nuevas interacciones ocasionadas por los radicales OH de PVA, se están generando.

Con los datos encontrados en los difractogramas se puede utilizar la ecuación de Scherrer (Ecuación 1) para calcular el diámetro de partícula presente en las muestras, realizando el cálculo de los picos de magnetita, se obtuvo un tamaño promedio de partícula de 15.7 ± 5.76 nm para el producto liofilizado de MNPs y de 18.82 ± 4.03 nm para el xerogel. El valor del tamaño promedio de las MNPs es muy similar al encontrado por en análisis de áreas en TEM suponiendo una geometría esférica, este dato es $\sim 15.16 \pm 3.72$ nm.

Los valores encontrados de tamaño de partícula son aproximaciones al valor real, ya que hay que tener en cuenta la incertidumbre del análisis de las áreas de las MNPs al no tener una morfología definida y de los parámetros utilizados en la ecuación de Sherrer.

4.9 MTT

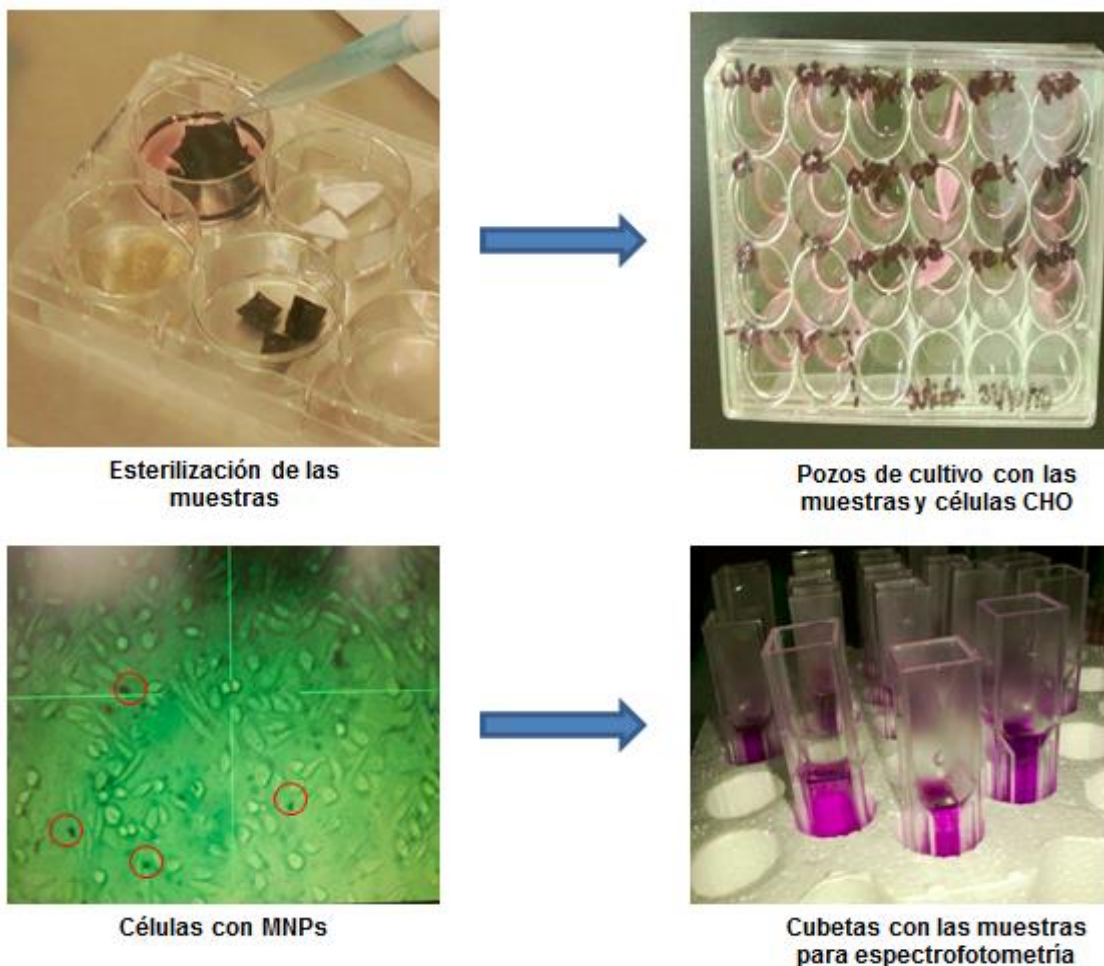


Figura 20. Proceso de preparación de las muestras para cultivo celular y prueba de MTT

En la Figura 20 se pueden observar las muestras mientras se lavan para extraer los residuos de etanol y los pozos de cultivo con las muestras analizadas, en la micrografía inferior izquierda de la Figura 20 se ven las células CHO tras la adición de las MNPs con un aumento de 20X, que en este caso se encuentran como agregados (en círculos rojos) y finalmente en la esquina inferior derecha, pueden verse las cubetas con las soluciones de DMSO + Formazán que fueron analizadas por espectrofotometría.

En la

Tabla 3 se muestra la absorbancia de cada una de las muestras analizadas y usando una curva de calibración para células CHO del laboratorio de Biotecnología en Salud de la EIA - CES, que se describe por la Ecuación 2 y se tomó como referencia para calcular el número de células presentes en cada pozo (

Tabla 3):

Ecuación 2. Curva de calibración células CHO

$$ABS = 1 * 10^{-5} * x \quad R^2 = 0.91$$

Siendo,

ABS: Absorbancia de la solución,

x: Cantidad de células presentes en un pozo.

De los datos obtenidos en la Tabla 3 se obtuvo un histograma con la respuesta de la viabilidad celular de las diferentes muestras como se observa en la Figura 21, en esta se destaca que las muestras con mayor concentración de MNPs exhiben mayor % de viabilidad que aquellas usadas solo como control. Puede apreciarse, que las nanopartículas magnéticas obtenidas en este trabajo, a concentraciones de 100 µg/mL y 200 µg/mL presentan porcentajes de viabilidad de 82.10 % y 87.50 % respectivamente, en comparación al control negativo, que son células CHO sin ningún tratamiento; estos resultados se acercan a los de Kim y su equipo, que sintetizaron MNPs y les hicieron MTT usando células de fibroblastos del tejido conectivo de ratones machos de 100 días de edad (L929), obteniendo un porcentaje de viabilidad del 87% (Kim et al.,2007). Estos resultados indican que no existen efectos citotóxicos en periodos de exposición cortos. En el caso de los pozos en contacto con matrices sin MNPs, se observa una cantidad de células un poco inferior a la de las demás muestras, lo que podría atribuirse a dos posibles causas: (i) Al no haber tenido en cuenta el tamaño de las matrices utilizadas para la prueba, la asimetría de las muestras podría estar causando que los resultados no sean comparables uno con otro y/o (ii) El buen funcionamiento de las matrices podría haber estimulado la migración de las células hacia ella, dejando una menor cantidad de células en el pozo. Cualquiera sea el caso, deben hacerse más pruebas para esclarecer las causas de tales resultados.

El MTT es una buena técnica para probar que no hay citotoxicidad de las muestras con MNPs al contacto con las células, sin embargo, deben realizarse estudios que permitan verificar si las partículas ingresan a las células o se quedan en el medio de cultivo.

Tabla 3. Absorbancia de cada pozo de cultivo con el número de células contendrían según la curva de calibración

Muestra	Absorbancia 1	# células pozo 1	Absorbancia 2	# células pozo 2	Absorbancia 3	# células pozo 3	Porcentaje de viabilidad (%)	Desviación
MNPs 100 µg/mL	1,649	164900	2,057	205700	1,863	186300	82,10231461	9,02616908
MNPs 200 µg/mL	2,08	208000	2,155	215500	1,7	170000	87,49815716	10,7891773
PVA + MNPs	2,196	219600	2,312	231200	2,68	268000	105,9708094	11,1763577
PVA+ Quitosano	1,45	145000	0,501	50100	1,672	167200	53,41294413	27,5088966
PVA+ Quitosano + MNPs	1,832	183200	1,837	183700	1,831	183100	81,08506561	0,14217383
PVA	1,81	181000	1,45	145000	1,696	169600	73,06501548	8,13751128
C-	2,261	226100						
C+	0,065	6500						

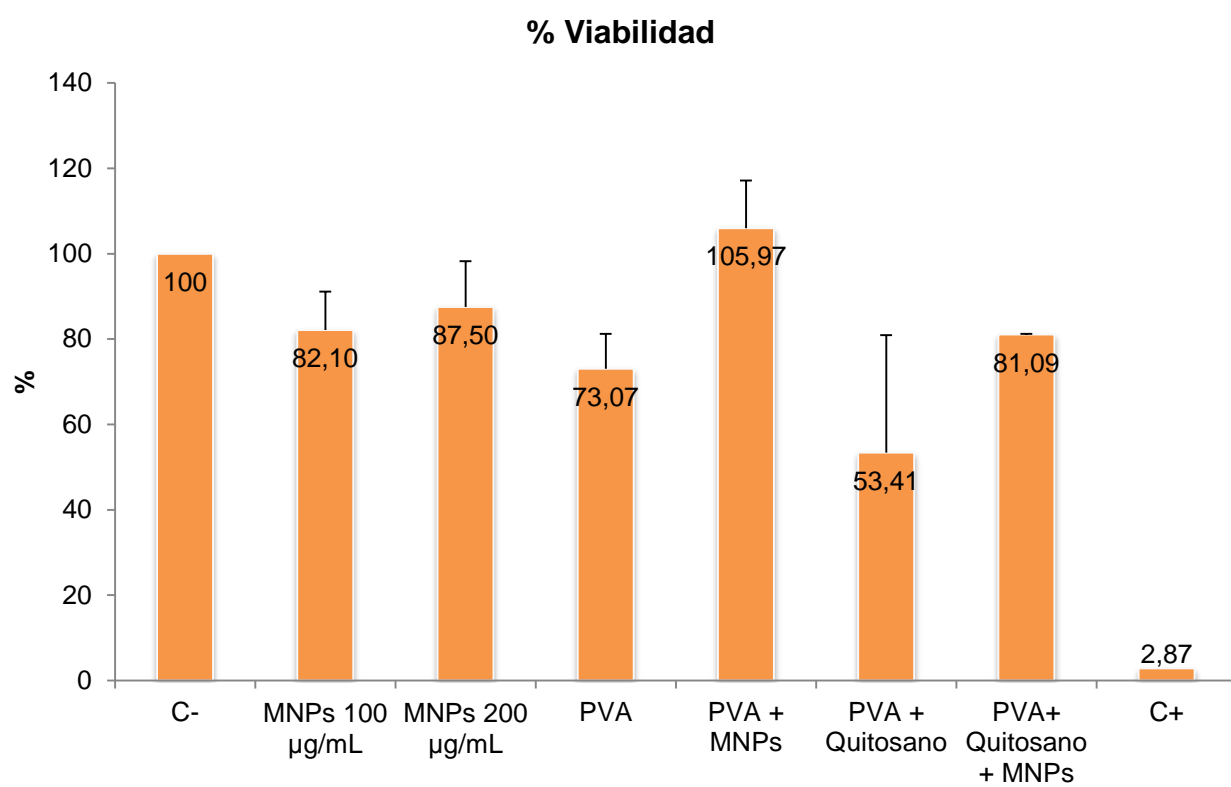


Figura 21. Histograma % de viabilidad

5 CONCLUSIONES

La síntesis por co-precipitación permite obtener agregados y nanopartículas de óxido de hierro en su fase de magnetita, que exhiben propiedades magnéticas al responder a un campo magnético de 0.008T. Los tamaños de los agregados están entre 300nm y 2.5 μm , y los de las partículas son de ~ 15 nm, con una forma amorfa con predominio de una geometría cubica irregular.

Las MNPs se integraron exitosamente a los hidrogeles de PVA formando los ferrogeles de MNPS – PVA. El PVA protege las MNPS preservando sus propiedades magnéticas.

Las MNPs y los ferrogeles obtenidos en este trabajo no producen alteración en el metabolismo de las células, lo que fue comprobado mediante la técnica de MTT.

Dado que el tamaño de las MNPs es menor al tamaño crítico reportado en la literatura, se puede considerar que son superparamagnéticas, aunque esta característica se debe validar con estudios con dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID), sistema de medición de propiedades magnéticas (MPMS) o mediciones Mössbauer.

Las características de los ferrogeles obtenidos en este trabajo los hacen unos candidatos muy prometedores para ser usados en aplicaciones biomédicas.

.

6 RECOMENDACIONES

Realizar los ferrogel con un % de PVA más bajo para permitir *in situ* la síntesis del sistema con las MNPs y evitar el uso de surfactantes.

Realizar un entrecruzamiento del PVA con elementos diferentes, ya que el glutaraldehído se ha identificado como tóxico para las células y se tendrían problemas en las aplicaciones biológicas del sistema a largo plazo.

Encapsular las MNPs en microesferas de PVA para obtener además del ferrogel un sistema de menor tamaño con potenciales aplicaciones en medicina.

Realizar pruebas de las propiedades magnéticas, ya que las MNPs que mejor responden en aplicaciones biomédicas se han caracterizado por ser superparamagnéticas.

Someter el sistema del xerogel al estímulo de un campo magnético alterno con el fin de evaluar el comportamiento de vibración de las partículas, el aumento de calor en la muestra por las colisiones y determinar su potencialidad para uso en hipertermia.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Almonacid, A. (2013, June). *Desarrollo de matrices de PVA y quitasano para el cultivo celular*. Escuela de Ingeniería de Antioquia, Universidad CES, Medellín, Colombia.
- Amirfazli, A. (2007). Nanomedicine: Magnetic nanoparticles hit the target. *Nature Nanotechnology*, 2(8), 467–468. doi:10.1038/nnano.2007.234
- Atkins, P., & Paula, J. de. (2009). *Elements of Physical Chemistry*. W. H. Freeman.
- Berger, P., Adelman, N. B., Beckman, K. J., Campbell, D. J., Ellis, A. B., & Lisensky, G. C. (1999). Preparation and Properties of an Aqueous Ferrofluid. *Journal of Chemical Education*, 76(7), 943. doi:10.1021/ed076p943
- Berne, B. J., & Pecora, R. (2000). *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Courier Dover Publications.
- Bruce, I. J., Taylor, J., Todd, M., Davies, M. J., Borioni, E., Sangregorio, C., & Sen, T. (2004). Synthesis, characterisation and application of silica-magnetite nanocomposites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 284, 145–160. doi:10.1016/j.jmmm.2004.06.032
- Buendía Aceves S. (2009, September). *Síntesis de nanopartículas de Hierro con propiedades magnéticas obtenidas vía precursores organometálicos* (Tesis Grado de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química). Instituto Politecnico Nacional de Mexico, México DF. Retrieved from itzamna.bnct.ipn.mx:8080/dspace/bitstream/123456789/5926/1/41.pdf

- Castillo, C., & Ramos, M. (2011). Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas. *ideas CONCYTEG*, 72(6), 630–649.
- Castro, S. (2006). *Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de isertia laevis empleando líneas celulares de tumores humanos*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Retrieved from <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis75.pdf>
- Ciapetti, G., Cenni, E., Pratelli, L., & Pizzoferrato, A. (1993). In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*, 14(5), 359–364. doi:10.1016/0142-9612(93)90055-7
- Cowley, J. M. (1995). *Diffraction Physics*. Elsevier.
- Dobson, J. (2006). Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery. *Gene therapy*, 13(4), 283–287. doi:10.1038/sj.gt.3302720
- Elena Udrea, L., Hritcu, D., Popa, M. I., & Rotariu, O. (2011). Preparation and characterization of polyvinyl alcohol—chitosan biocompatible magnetic microparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 323(1), 7–13. doi:10.1016/j.jmmm.2010.06.025
- Ferry, J. D. (1980). *Viscoelastic Properties of Polymers*. Wiley.
- García, L. A., Escareño, M. U., & Salazar, M. (2006). Preparación de compósitos magnéticos mediante la síntesis in situ de nanopartículas magnéticas dentro de una matriz polimérica. *Superficies y vacío*, 19(1), 20–24.

- García Mendoza, R. A., Mina Rosales, A., Felix González, N., Serrano Olmedo, J. J., & Pozo Guerrero, F. del. (2010). Caracterización de micro y nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas. *Revista Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, 14(2), 43–59.
- García-Cerda, L. A., Escareño-Castro, M. U., & Salazar-Zertuche, M. (2006). Preparación de compósitos magnéticos mediante la síntesis in situ de nanopartículas magnéticas dentro de una matriz polimérica. *Superficies y vacío*, 19(1), 20–24.
- Garza, M., González, V., Hinojosa, M., Reyes, E., & Torres, A. (2009). Desarrollo de nanopartículas magnéticas en templetes biopoliméricos. *Ciencia UANL*. Retrieved from <http://eprints.uanl.mx/320/>
- Gibbs, M., Eschenazi, E., & Papadopoulos, K. (2005). AFM of Iron Oxide Particles Attachment on Mica. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 25(6), 861–868. doi:10.1081/DIS-200035686
- Goiti, E., Salinas, M. M., Arias, G., Puglia, D., Kenny, J. M., & Mijangos, C. (2007). Effect of magnetic nanoparticles on the thermal properties of some hydrogels. *Polymer Degradation and Stability*, 92(12), 2198–2205. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2007.02.025
- Gonzalez, J. S., Hoppe, C. E., Muraca, D., Sánchez, F. H., & Alvarez, V. A. (2011). Synthesis and characterization of PVA ferrogels obtained through a one-pot freezing–thawing procedure. *Colloid and Polymer Science*, 289(17-18), 1839–1846. doi:10.1007/s00396-011-2501-1

- Grande A. (2007). Nanotecnología y nanopartículas magnéticas: La física actual en la lucha contra la enfermedad. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat*, 101(2), 321–327.
- Happel P, Thatenhorst D, & Dietzel I.D. (2012). Scanning Ion Conductance Microscopy for Studying Biological Samples, 12(11), 14983–15008. doi:10.3390/s121114983
- Hendry, J. H., Jeremić, B., & Zubizarreta, E. H. (2006). Normal tissue complications after radiation therapy. *Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health*, 20(2-3), 151–160.
- Hong, R. Y., Pan, T. T., & Li, H. Z. (2006). Microwave synthesis of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles used as a precursor of nanocomposites and ferrofluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 303(1), 60–68. doi:10.1016/j.jmmm.2005.10.230
- Jiang Wen, W. X.-T. (2009). Study on the Synthesis and Properties of Superparamagnetic Monodisperse Fe₃O₄ Nanoparticles. *Journal of Inorganic Materials*. doi:10.3724/SP.J.1077.2009.00727
- Johannsen M, G. U. (2007). Termoterapia en cáncer de próstata mediante el uso de nanopartículas magnéticas. *Actas urológicas españolas*, 31(6), 660–667. doi:10.4321/S0210-48062007000600012
- Katime, I., Katime, Ó., & Katime, D. (2004). *Los materiales inteligentes de este milenio: los hidrogeles macromoleculares: síntesis, propiedades y aplicaciones*. Universidad del País Vasco, Servicio Editorial = Euskal Herriko Unibertsitateko, Argitalpen Zerbitzua.

- Kim, E. H., Ahn, Y., & Lee, H. S. (2007). Biomedical applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated within chitosan. *Journal of Alloys and Compounds*, 434–435, 633–636. doi:10.1016/j.jallcom.2006.08.311
- Lang, K. M., Hite, D. A., Simmonds, R. W., McDermott, R., Pappas, D. P., & Martinis, J. M. (2004). Conducting atomic force microscopy for nanoscale tunnel barrier characterization. *Review of Scientific Instruments*, 75(8), 2726–2731. doi:10.1063/1.1777388
- Lara Rodríguez P, M. M. M., Carranza Bernal S, G. N. M., & Hinojosa Rivera M, G. G. V. (2005, November). Síntesis y caracterización de nanocompositos magnéticos. *Ingenierías Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica*, 3(29), 47–51.
- Lee, J., Isobe, T., & Senna, M. (1996). Preparation of Ultrafine Fe₃O₄ Particles by Precipitation in the Presence of PVA at High pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, 177(2), 490–494. doi:10.1006/jcis.1996.0062
- M. Knobel, W. C. Nunes, L. M. Socolovsky, E. De Biasi, J. M. Vargas, & J. C. Denardin. (2008). Superparamagnetism and other magnetic features in granular materials: a review on ideal and real systems. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 8, 2836–2857.
- Ma, H., Qi, X., Maitani, Y., & Nagai, T. (2007). Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate. *International journal of pharmaceutics*, 333(1-2), 177–186. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.10.006
- Maaz, K., Mumtaz, A., Hasanain, S. K., & Ceylan, A. (2006). *Synthesis and Magnetic Properties of Cobalt Ferrite (CoFe₂O₄) Nanoparticles Prepared by Wet Chemical*

Route (arXiv e-print No. cond-mat/0606631). Retrieved from <http://arxiv.org/abs/cond-mat/0606631>

Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., Shokrgozar, M. A., Milani, A. S., Häfeli, U. O., & Stroeve, P. (2010). A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 75(1), 300–309. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.08.044

Martínez, G. (2013, 09). *Análisis de parámetros microestructurales: tamaño de cristalita y microdeformación de compuestos tipo Hidrotalcita de Cobalto*. Instituto Politécnica Nacional, México DF.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55–63.

Mur, F. J. G., alt, G. M., Francisco +, & Planella, J. M. M. (2005). *Metalografía*. Univ. Politèc. de Catalunya.

Nič, M., Jirát, J., Košata, B., Jenkins, A., & McNaught, A. (Eds.). (n.d.). coprecipitation. In *IUPAC Compendium of Chemical Terminology* (2.1.0 ed.). Research Triangle Park, NC: IUPAC. Retrieved from <http://goldbook.iupac.org/C01339.html>

Nin, G. (2000). *Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a Las Ciencias Biológicas*. UNAM.

nucleation (crystallography). (n.d.). *Encyclopedia Britannica*. Retrieved October 21, 2013, from <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/421892/nucleation>

- Nuñez, M. (2011). Las células de cáncer hacen trampa con su dieta. *Journal of Feelsynapsis*, 1, 106–108.
- Park, S. (2009). Preparation of iron oxides using ammonium iron citrate precursor: Thin films and nanoparticles. *Journal of Solid State Chemistry*, 182(9), 2456–2460. doi:10.1016/j.jssc.2009.06.027
- Pedrés, J. R. L., & Tognoni, G. (1993). *Principios de epidemiología del medicamento*. Ediciones Científicas y Técnicas.
- Prados, C., Multigner, M., Hernando, A., Sánchez, J. C., Fernández, A., Conde, C. F., & Conde, A. (1999). Dependence of exchange anisotropy and coercivity on the Fe-oxide structure in oxygen-passivated Fe nanoparticles. *Journal of Applied Physics*, 85(8), 6118. doi:10.1063/1.370280
- Puca Pacheco, M., Guerrero Aquino, M., Tacuri Calanchi, E., & López Campos, R. G. (2013). Síntesis y caracterización de nanopartículas superparamagnéticas obtenidas por precipitación en microemulsión inversa para aplicaciones biomédicas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 79(2), 99–106.
- Ramón, M. L. (2007, September). Determinación del tamaño de cristal utilizando el software Jade 6.5. Retrieved from <http://xml.cie.unam.mx/xml/ms/Doctos/ManualJade65.pdf>
- Rodríguez, J., Vicente, V., & Canteras, M. (1997). Valor del ensayo colorimétrico con MTT en el estudio del crecimiento y citotoxicidad in vitro de líneas de melanoma. *Revista española de patología*, 30(1), 18–27.

- Rosen, M. J., & Kunjappu, J. T. (2012). *Surfactants and Interfacial Phenomena*. John Wiley & Sons.
- Singh, N., Jenkins, G. J. S., Nelson, B. C., Marquis, B. J., Maffei, T. G. G., Brown, A. P., ... Doak, S. H. (2012). The role of iron redox state in the genotoxicity of ultrafine superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 33(1), 163–170. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.087
- Stöhr, J., & Siegmann, H. C. (2007). *Magnetism: From Fundamentals to Nanoscale Dynamics*. Springer.
- Tan, W. L., & Bakar, M. A. (2006). THE EFFECT OF ADDITIVES ON THE SIZE OF Fe₃O₄ PARTICLES. Retrieved from <http://core.kmi.open.ac.uk/display/758266>
- Urquijo Morales J. (2007). *Síntesis de nanopartículas magnéticas y su implementación como ferrofluidos* (Trabajo de investigación grado de Magister). Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Retrieved from <http://www.cenm.org/abstract/udea/GES/jeaneth-urquijo.pdf>
- Wang, Z., Lam, A., & Acosta, E. (2013). Suspensions of Iron Oxide Nanoparticles Stabilized by Anionic Surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 16(3), 397–407. doi:10.1007/s11743-012-1425-1
- Wei, Y., Zhang, X., Song, Y., Han, B., Hu, X., Wang, X., ... Deng, X. (2011). Magnetic biodegradable Fe₃O₄/CS/PVA nanofibrous membranes for bone regeneration. *Biomedical materials (Bristol, England)*, 6(5), 055008. doi:10.1088/1748-6041/6/5/055008

Willard, H. H., Dean, J. A., & Merritt, L. L. (1981). *Métodos instrumentales de análisis*.
Compañía Editorial Continental.

Zélis, P. M., Muraca, D., Gonzalez, J. S., Pasquevich, G. A., Alvarez, V. A., Pirota, K. R., &
Sánchez, F. H. (2013). Magnetic properties study of iron-oxide nanoparticles/PVA
ferrogels with potential biomedical applications. *Journal of Nanoparticle Research*,
15(5), 1–12. doi:10.1007/s11051-013-1613-6

ANEXO 1 Protocolo síntesis de nanopartículas magnéticas por medio de co-precipitación

MATERIALES Y EQUIPOS

No.	Equipos	No.	Equipos
1	Agitador magnético	1	Beaker 100 mL
3	Balones Volumétricos	2	Beaker 20 mL
1	Plancha térmica	1	Erlenmeyer
1	Imán	1	Bureta 50 mL
1	Liofilizador	4	Cajas Petri
5	Pipetas pasteur	1	Pipetas de vidrio de 10 mL
1	Balanza		

REACTIVOS

Reactivo	Cantidad	Peso molecular	Marca
Cloruro férrico hexahidratado (Hierro III)	2.703 g	270.3	Sigma Aldrich
Cloruro ferroso Tetrahidratado (Hierro 2)	3.976 g	198.81	Sigma Aldrich
HCl	20 mL	36.46	Chemical
NH ₃	50 mL	35.05	Chemical
Tetrametilamonio	3 mL	106.9	
Agua destilada	500 mL	--	--

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se sintetizarán nanopartículas magnéticas de óxido de hierro. El experimento se desarrollará a condiciones de presión y humedad ambientales bajo techo en el municipio de Sabaneta.

PROCEDIMIENTO

1. Lavar todos los implementos que se van a utilizar en el proceso de síntesis con agua y jabón neutro. Purgar con agua destilada y secar en estufa o autoclave y empacar en bolsas herméticas, si no se van a utilizar inmediatamente.

2. Pesar el hierro II y el hierro III en la balanza en los beaker de 20 mL, en recipientes separados.
 3. Preparar en un balón volumétrico 20 mL de HCl al 2 M.
 4. Preparar en un balón volumétrico 100 mL de NH_3 al 0.7 M.
 5. Adicionar 10 mL de HCl a cada beaker con hierro. (el hierro II se prepara al 2 M y el hierro III al 1 M)
 6. En beaker de 100 mL adicionar por 1 mL de la solución de hierro II y 4 mL de la solución de hierro III.
- Nota: Por cada 5 mL de hierro, proporción 1:4 que se adicionan, deben adicionarse 50 mL de NH_3 .
7. Ubicar en beaker en la plancha térmica y poner el agitador magnético en el interior.
 8. Llenar la bureta con 50 mL de NH_3 .
 9. Realizar el montaje que se observa en la Figura 22, asegurándose que la punta de la bureta apunte al centro del agitador magnético que se tiene en el beaker. Empezar a agitar a ~ 500 rpm.

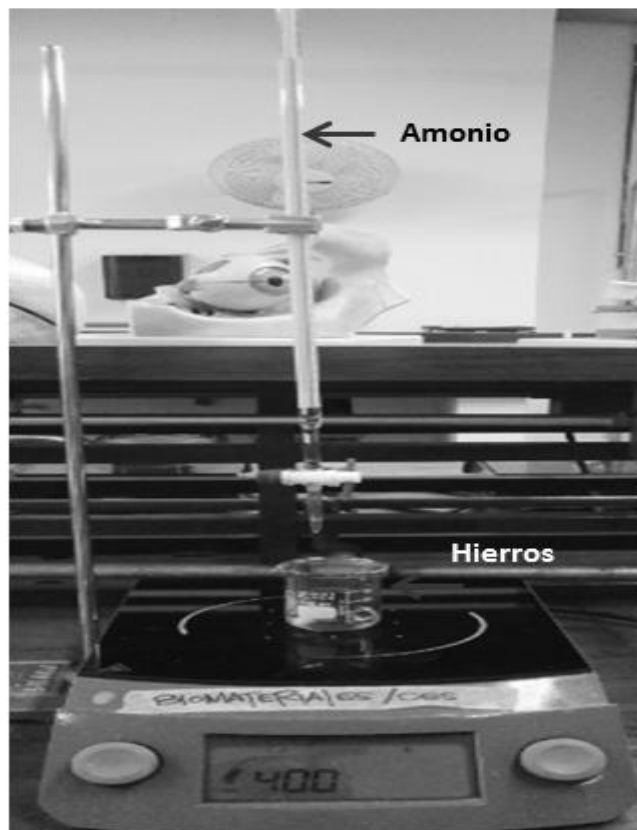


Figura 22. Montaje para agregar el amonio en la co-precipitación.

10. Abrir la bureta de tal forma que el NH_3 salga caiga en la solución de hierros gota a gota a una tasa de 2.5 mL por minuto.
11. Observar el cambio de tonalidad de la solución de amarillo a café y posterior negro.
12. Esperar que se termine de añadir todo el amonio.
13. Agitar por 15 minutos.
14. Retirar el agitador magnético.
15. Retirar el beaker de la plancha térmica y dejar decantar la solución de 10 – 15 minutos con el imán debajo del beaker, comprobando que hay atracción magnética de las partículas hacia el fondo.
16. Sosteniendo el imán debajo del beaker eliminar el sobrenadante.
17. Adicionar 3 mL de tetrametilamonio al 25%.
18. Agitar por 10 min.
19. Llevar a tubos falcón y realizar ultrasonido por 20 minutos a 35 °C.
20. Centrifugar a 1000 rpm por 2 minutos.
21. Eliminar el sobrenadante y añadir al decantado una solución entre 4 – 6 mL de HCl con pH 2. Para lavar.
22. Repetir el paso 20 y 21 tres veces.
23. Almacenar en la solución de lavado en la nevera a 20 °C o a temperatura ambiente.

Si se quieren obtener el polvo de la solución de MNPs, se debe:

24. Congelar la muestra a – 80 °C por mínimo 2 horas.
25. Llevar a la máquina de liofilizado por 24 horas.
26. Guardar el polvo en un tubo adecuado, no usar herramientas metálicas para manipularlo, ya que el polvo se quedara pegado a ellas por la magnetización.

CÁLCULOS

Cuando se tienen las soluciones a un x % masa volumen, para preparar una solución con una molaridad (M) específica se debe seguir:

Si se tiene x g en 100 mL siendo X el % m/V entonces se tiene $\frac{x}{100}$ g/ mL

1 mol de la solución es igual al peso molecular de esta.

La molaridad

$$M = \frac{\text{moles}}{\text{Litro}}$$

Para hallar la molaridad

$$M = \frac{x \text{ g}}{100 \text{ mL}} * \frac{1 \text{ mol}}{\text{peso molecular}} * 1000 \frac{\text{mL}}{\text{L}} = Y \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ Siendo } Y, \text{ el resultado de la molaridad.}$$

Con esta ecuación se halla la molaridad de la solución y al final dependiendo de la concentración que se busque se hace una dilución:

$$y * V1 = c2 * V2$$

Siendo,

y: Concentración 1 (botella).

V1: Volumen que se debe adicionar de la solución.

c2: Concentración deseada (a preparar).

V2: Volumen final que se preparé.

$$V1 = \frac{c2 * V2}{c1}$$

Ejemplo: Se tiene el HCl al 37% y se debe preparar 20 mL al 2M.

Entonces se tienen $\frac{37}{100}$ g/ mL, se sabe que el peso molecular del HCl es 36,46 g

$$M = \frac{37 \text{ g}}{100 \text{ mL}} * \frac{1 \text{ mol}}{36,46 \text{ g}} * 1000 \frac{\text{mL}}{1 \text{ L}} = 10 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$V1 = \frac{2M * 20 \text{ mL}}{10 M} = 4 \text{ mL}$$

La solución es que se necesitan 4 mL de HCl y 16 mL de agua destilada para preparar la solución al 2 M.

REFERENCIAS

Berger, P., Adelman, N. B., Beckman, K. J., Campbell, D. J., Ellis, A. B., & Lisensky, G. C. (1999). Preparation and Properties of an Aqueous Ferrofluid. *Journal of Chemical Education*, 76(7), 943. doi:10.1021/ed076p943

ANEXO 2 Protocolo preparación de PVAe incorporación de las MNPs

MATERIALES Y EQUIPOS

No.	Equipos	No.	Equipos
1	Agitador magnético	1	Beaker 100 mL
3	Balones Volumétricos	2	Beaker 20 mL
1	Plancha térmica	1	Erlenmeyer
1	Imán	1	Bureta 50 mL
1	Horno	1	Pesasustancias
1	Balanza	1	Termocupla

REACTIVOS

Reactivo	Cantidad	Peso molecular	Marca
Nanopartículas magnéticas	4 – 6 mL	--	Previamente sintetizadas
PVA	2 g	89000 - 93000	Sigma Aldrich
Metanol	20 mL	32.04	Chemical
Ácido acético	50 mL	60.1	Chemical
Glutaraldehído	3 mL	100.11	Chemical
Agua destilada	500 mL	--	--

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se sintetizará PVA incorporándole nanopartículas magnéticas de óxido de hierro. El experimento se desarrollará a condiciones de presión y humedad ambientales bajo techo en el municipio de Sabaneta.

PROCEDIMIENTO

1. Lavar todos los implementos que se van a utilizar en el proceso de síntesis con agua y jabón neutro. Purgar con agua destilada y secar en estufa o autoclave y empacar en bolsas herméticas, si no se van a utilizar inmediatamente.
2. Pesar en la balanza 2 g de PVA en un pesasustancias.
3. Colocar un beaker en la plancha térmica con un agitador magnético a 200 rpm y 10 mL de agua destilada. A una temperatura entre 80 – 90 °C.
4. Añadir lentamente el PVA al beaker, observando que no se formen grumos en la solución, cuando se presenta saturación añadir 10 mL más de agua.
5. Tapar el beaker para evitar la evaporación y dejar agitar hasta que el PVA se disuelva completamente aproximadamente por 2 horas.

6. Controlar periódicamente la temperatura que continué en el rango de 80 – 90 °C.
7. Destapar y dejar enfriar hasta alcanzar una temperatura de 27 – 30 °C.
8. Añadir entre 4 – 6 mL de la solución de MNPs.
9. Preparar la solución de entrecruzamiento mezclando 3 mL al 50%, 2 mL de ácido acético y 1 mL de glutaraldehído.
10. Dependiendo de la cantidad de muestras que se quieren preparar mezclar 3 mL de la solución de PVA con MNPs con 1 mL de la solución de entrecruzamiento, por Petri.
11. Meter las muestras en el horno y dejar secar por 24 horas a 35 °C.

Nota: Para fines de caracterización, se recomienda preparar simultáneamente hidrogeles de solo PVA al 10%, para esto se siguen todos los pasos menos el 8.

CALCULOS

- Para las diluciones de los diferentes componentes de la solución de entrecruzamiento se aplica la ecuación.

$$c1 * V1 = c2 * V2$$

c1: Concentración de la solución,

V1: Volumen de la solución,

c2: Concentración deseada,

V2: Volumen deseado.

Nota: En esta ecuación se puede trabajar las concentraciones en M o %.

- Se espera que la solución de PVA quede al 10%, por esta razón para calcular el valor de PVA que se quiere pesar se debe tener en cuenta que debe ser el 10% del volumen de agua en el que se haga la dilución. Por ejemplo en 20 mL de agua se agregan 2 g de PVA.

REFERENCIA

Gonzalez, J. S., Hoppe, C. E., Muraca, D., Sánchez, F. H., & Alvarez, V. A. (2011). Synthesis and characterization of PVA ferrogels obtained through a one-pot freezing–thawing procedure. *Colloid and Polymer Science*, 289(17-18), 1839–1846. Doi: 10.1007/s00396-011-2501-1

ANEXO 3 Protocolo síntesis de matrices de PVA y quitosano

Nota: Este protocolo se encontraba en el laboratorio y fue un trabajo de grado desarrollado previamente (Almonacid, 2013).

MATERIALES Y EQUIPOS

N°	EQUIPOS	N°	EQUIPOS
1	Balanza analítica	1	Varilla para agitación
2	Plancha térmica	2	Beaker 200 ml
1	Liofilizado	1	Beaker 50ml
12	Cajas de Petri pequeñas	8	Beaker 25ml
1	Pesa sustancias	2	Beaker 10ml
8	Magnetos	1	Nevera
1	Termocupla	3	Micropipetas (1000ul, 2-20ul, 10-100ul)
2	Probetas 10ml		

REACTIVOS

REACTIVO	CANTIDAD	PESO MOLECULAR	GRADO DE HIDRÓLISIS	MARCA
PVA	7,5 g	130000	99%	Sigma
Agua destilada	200 ml			
Trimetafosfato de sodio	1,5g			

Hidróxido de sodio	0,75g			
Quitosano	0,45g	Low		Sigma Aldrich
Ácido acético	0,3ml			
Bromuro de amonio	20g			

PROCEDIMIENTO

- Hacer solución de PVA 5% (150ml H₂O+7,5gPVA) por 4 horas a 90 °C en agitación
- Solución de quitosano 1,5% con 1% ácido acético (30ml H₂O+0,45g quitosano+0,3ml ácido acético) 4 horas a temperatura ambiente en agitación
- Solución stock de 20ml de STMP al 10% (1,5g STMP+ 15ml agua destilada). Se recomienda hacer una nueva solución para cada experimento.
- Solución stock de 15ml de NaOH al 5% (0,75g NaOH+15ml agua destilada)
- Solución de STMP 5%+NaOH 2,5% (2,7ml). Mezclar:
 - 0,9ml solución stock STMP + 0,9ml agua destilada
 - 0,45ml solución stock NaOH + 0,45ml agua destilada
- Solución de STMP 1%+NaOH 0,5% (0,54ml). Mezclar:
 - 0,036ml solución stock STMP+ 0,324ml agua destilada
 - 18ul solución stock NaOH+0,162ml agua destilada
- Soluciones de PVA y quitosano
 - Mezclar 13, 32ml sln PVA+3,33ml sln quitosano
 - Agitar por 5min
 - Lentamente (gota a gota) adicionar 1,35ml de Solución de STMP 5%+NaOH 2,5%
 - Adicionar mientras se agita 2,86g sal (bromuro de amonio)
 - Verter en dos Petri pequeños por cantidades iguales
 - Poner a congelar por 24 horas
 - Liofilizar todas las muestras por 24 horas.

REFERENCIAS

Almonacid, A. (2013, June). *Desarrollo de matrices de PVA y quitosano para el cultivo celular*. Escuela de Ingeniería de Antioquia, Universidad CES, Medellín, Colombia.

ANEXO 4 Preparación de las muestras para microscopias

MATERIALES Y EQUIPOS

No.	Equipos
1	Pipeta de 2 μ L
2	Tubos falcon
1	Equipo de ultrasonido
1	Vórtex

REACTIVOS

Reactivo	Cantidad	Peso molecular	Marca
Nanopartículas magnéticas	1 mL	--	Previamente sintetizadas
Agua destilada	2 mL	--	--

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se disolverán MNPs con el fin de preparar una solución para usarla en microscopias. El experimento se desarrollará a condiciones de presión y humedad ambientales bajo techo en el municipio de Sabaneta.

PROCEDIMIENTO

1. Tomar 1 mL de la solución almacenada de MNPs y agitarla en vórtex por 2 minutos.
2. Tomar de la solución anterior 2 μ L y mezclarlos con 1 mL de agua destilada.
3. Agitar en el vórtex por 2 minutos.
4. Llevar al ultrasonido por 20 minutos a una temperatura de 35 °C.

Esta solución debe utilizarse en el menor tiempo posible luego del ultrasonido para evitar la aglomeración de las partículas.

Microscopía óptica

- Para las pruebas de microscopía óptica se sumergen las membranas en la solución, atrayendo las partículas a un lado del tubo donde se está trabajando por medio de un imán.

Microscopía de fuerza atómica



- Para las pruebas de microscopia de fuerza atómica, se depositan 0.5 μL de la solución en un sustrato de silicio y se deja secar la muestra a temperatura ambiente.

Microscopía electrónica de transmisión

- Para las pruebas de microscopia electrónica se depositan 20 μL en una rejilla de cobre se deja la solución depositada alrededor de 20 segundos, se retira el líquido sobrante, y se volvió a repetir el procedimiento de depositar 20 μL , para dejar evaporar a temperatura ambiente.

ANEXO 5 Espectroscopía de infrarrojo

MATERIALES Y EQUIPOS

No.	Equipos
1	Espectrofotómetro Nicolet

MUESTRAS

Muestra	Cantidad
Polvo MNPs	500 mg
Xerogel PVA + MNPs	1

PROCEDIMIENTO

1. Tomar la muestra y ubicarla en el soporte del equipo que se está utilizando.
2. Indicar que se leerá la muestra en un rango de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$
3. Indicar que realizarán 64 escáneres por muestra.
4. Iniciar la prueba.
5. Almacenar los datos de la muestra.

REFERENCIA

Lee, J., Isobe, T., & Senna, M. (1996). Preparation of Ultrafine Fe_3O_4 Particles by Precipitation in the Presence of PVA at High pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, 177(2), 490–494. doi:10.1006/jcis.1996.0062

ANEXO 6 Difracción de rayos x

MATERIALES Y EQUIPOS

No.	Equipos
1	Liofilizador
1	Equipo de difracción de rayos X

MUESTRAS



Muestra	Cantidad
Nanopartículas magnéticas	20 mL
Xerogel PVA + MNPs	1

PROCEDIMIENTO

1. Previo a la prueba de DRX tomar los 20 mL de MNPs sintetizadas y congelarlas por 2 horas a -80°C .
2. Llevar las muestras congeladas a un liofilizador por 24 horas.
3. Almacenar el producto liofilizado de MNPs obtenido teniendo en cuenta que se necesita 1 g de la muestra, sino se logra esta cantidad se deben sintetizar más MNPs.
4. Llevar las muestras de producto liofilizado de MNPs y el xerogel a un equipo de difracción de rayos X.
5. Con una radiación de cobre, $\lambda=1,5406 \text{ \AA}$, 45 kV y 40 mA realizar un barrido.
6. Para el producto liofilizado de MNPs el angulo de barrido entre $20 - 80^{\circ}$ y para el xerogel entre $0 - 80^{\circ}$.

REFERENCIA

Lee, J., Isobe, T., & Senna, M. (1996). Preparation of Ultrafine Fe_3O_4 Particles by Precipitation in the Presence of PVA at High pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, 177(2), 490–494. doi:10.1006/jcis.1996.0062

ESCUELA DE INGENIERÍA DE ANTIOQUIA

ACTA DE EVALUACIÓN FINAL DE TRABAJO DE GRADO

Fecha: (dd/mm/aa)	20 / 11 / 2013
Nombre del proyecto:	Nanoferrogeles para aplicaciones biomédicas
Director del proyecto:	Martha Elena Londoño López

Nombre del estudiante	Programa académico
Sara María Leal Marín	Ingeniería Biomédica
Julián David Vergara Rojas	Ingeniería Biomédica

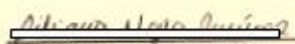
Nombre del Jurado: José William Restrepo

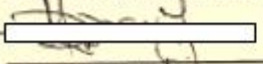
Evaluación del proyecto: Espacio exclusivo para jurado

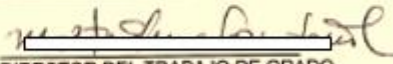
☐ No aprobado ☐ Aprobado sin mención
☒ con Mención Pública ☐ con Mención honorífica ☐ Trabajo laureado

Justificación del reconocimiento: (Artículo 28 del Acuerdo 11: "El director del Programa presentará el acta final de evaluación al Consejo Académico, donde consta la solicitud de mención especial debidamente justificada y el Consejo determinará si se otorga o no")

Se recomienda mención Pública en reconocimiento al rigor con el que los estudiantes afrontaron el trabajo de grado; realizando actividades que fueron más allá de los objetivos planteados. Además por, el manejo e interpretación de resultados de técnicas de caracterización que son complejas para su nivel de formación en pregrado.


DIRECTOR DEL PROGRAMA


JURADO (Si lo hubo)


DIRECTOR DEL TRABAJO DE GRADO

Evaluación Trabajo de grado/ formulario oficial a partir de enero de 2009

1 de 2