



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALDO

INSTITUTO DE INVESTIGACION EN METALURGIA Y MATERIALES

DISEÑO Y SÍNTESIS DE SISTEMAS NANOPARTICULADOS DE  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  COMO  
PORTADORES DE MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES

Presenta:

MC SAMUEL TORRES CADENAS

Asesor:

Dra. MARÍA EUGENIA CONTRERAS GARCÍA

Co-asesor:

Dr. ALEJANDRO BRAVO PATIÑO



Morelia, Michoacán, Febrero 2017

## AGRADECIMIENTOS

He tenido la dicha de contar con personas que me han apoyado de manera incondicional a lo largo de mi vida, contribuyendo de una u otra manera en mi formación personal y académica. Personas que han confiado en mí tanto o más de lo que yo puedo confiar. Podría comenzar a citar nombres, sin embargo, es posible que olvide algunos o bien la lista se haga larga. Lo que sí puedo hacer es expresar mi más profunda gratitud en forma más general a mi familia, amigos, compañeros, profesores y técnicos, ya sea dentro de la UMSNH o fuera de ella; o bien, en alguna otra Institución tal como la UNAM México. De esta manera espero evitar agradecer a quien debería.

Finalmente, agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al PIFI-PROFOCIE por el apoyo al proyecto de investigación.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN .....	13
1.1. OBJETIVOS.....	15
1.1.1. Objetivo General.....	15
1.1.2. Objetivos Específicos.....	15
1.2. HIPÓTESIS .....	17
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	18
Capítulo 2. REVISIÓN DEL ESTADO DEL ARTE .....	22
2.1. BIOMATERIALES .....	22
2.1.1. Aplicaciones .....	23
2.2. SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACO .....	26
2.2.1. Liposomas.....	26
2.2.2. Nanopartículas poliméricas .....	27
2.2.3. Micelas .....	27
2.2.4. Dendrímeros .....	28
2.2.5. Nanopartículas Magnéticas .....	28
2.3. CLASIFICACIÓN DE LOS MATERIALES MAGNÉTICOS .....	29
2.3.1. Diamagnetismo .....	29
2.3.2. Paramagnetismo.....	29
2.3.3. Ferromagnetismo .....	30
2.3.4. Antiferromagnetismo .....	30
2.3.5. Ferrimagnetismo .....	31
2.3.6. Superparamagnetismo.....	31
2.4. FERRITAS HEXAGONALES.....	32
2.5. METODOS DE SÍNTESIS .....	33

2.5.1.	Síntesis sol-gel .....	33
2.5.2.	Secado por aspersión.....	36
2.6.	ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE LA SÍNTESIS Y APLICACIÓN DE MATERIALES NANOESTRUCTURADOS A BASE DE OXIDO DE HIERRO COMO SISTEMAS DDS.....	39
Capítulo 3.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	44
3.1.	MATERIALES INICIALES .....	44
3.2.	DISEÑO EXPERIMENTAL FRACCIONARIO 2 <sup>f</sup> .....	49
3.3.	SÍNTESIS DE AGREGADOS DE BaFe <sub>12</sub> O <sub>19</sub> .....	49
3.4.	CARACTERIZACIÓN .....	50
3.4.1.	Difracción de rayos X .....	50
3.4.2.	Microscopía electrónica de barrido .....	50
3.4.3.	Microscopía electrónica de transmisión .....	51
3.4.4.	Isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno.....	51
3.4.5.	Espectroscopía infrarroja.....	52
3.4.6.	Propiedades magnéticas.....	52
3.4.7.	Potencial zeta ζ.....	52
3.5.	PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	52
3.5.1.	Extracción de ADN plasmídico .....	52
3.5.2.	Síntesis del péptido DS .....	53
3.5.3.	Carga/liberación del péptido .....	56
3.5.4.	Liberación del péptido DS de los sistemas nanoestructurados de BaFe <sub>12</sub> O <sub>19</sub> .....	57
Capítulo 4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	59
4.1.	DISEÑO FACTORIAL 2 <sup>f</sup> .....	59
4.2.	CARACTERIZACIÓN .....	63
4.2.1.	Difracción de rayos X .....	63
4.2.2.	Microscopía electrónica de barrido .....	64
4.2.3.	Microscopía electrónica de transmisión .....	67

4.2.4.	Isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno.....	74
4.2.5.	Espectroscopía infrarroja.....	75
4.2.6.	Propiedades magnéticas.....	76
4.3.	PROPIEDADES BIOLÓGICAS.....	79
4.3.1.	Extracción de ADN plasmídico.....	79
4.3.2.	Síntesis, inducción y expresión del péptido DS.....	80
4.3.3.	Caracterización del péptido DS.....	82
4.4.	PRUEBAS DE CARGA/LIBERACIÓN.....	84
Capítulo 5.	CONCLUSIONES.....	92
	TRABAJO A FUTURO Y RECOMENDACIONES.....	93
	REFERENCIAS.....	94
	ANEXOS.....	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Número de artículos publicados anualmente en la revista Journal of Controlled Released desde 1984.....	18
Figura 1.2.	Métodos de síntesis de los sistemas nanoestructurados dirigidos a aplicaciones biomédicas. Las tres rutas principales incluyen métodos químicos, físicos y biológicos. Fuente: Instituto de Información Científica. Modificado de M. Mahmoudi [16]......	20
Figura 2.1.	Categorías esenciales de los materiales usados como DDS. i) Materiales orgánicos: dendrímeros, micelas, liposomas. i) Materiales inorgánicos: nanopartículas de oro, sistemas nanoestructurados a base de óxido de hierro, quantum dots. (Modificado de Grumezescu [40] y Riggio [45]).....	26
Figura 2.2.	(a) Clasificación de los materiales según su comportamiento magnético: paramagnéticos, ferromagnéticos, antiferromagnéticos y ferrimagnéticos. (b) Los materiales superparamagnéticos son observados en los nanomateriales ferro- y ferrimagnéticos que se componen de un sólo dominio magnético.....	29

Figura 2.3 (a) sección transversal de la estructura de la ferrita tipo M ( $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ) Tomado de Robert C. Pullar [60] .....	33
Figura 2.4. Rutas de síntesis derivadas del método sol-gel. Tomado de <a href="https://str.llnl.gov/str/May05/Satcher.html">https://str.llnl.gov/str/May05/Satcher.html</a> .....	35
Figura 2.5. Configuración del equipo de secado por aspersión: (a) secador por aspersión concurrente, misma dirección de flujo y (b) secador por aspersión a contracorriente. (c) Evolución de la temperatura en el proceso de secado en una gotita líquida [Handscomb y cols.]. En la separación y recolección del polvo se pueden emplear: (d) separadores tipo ciclón y/o (e) filtros de bolsa. ....	36
Figura 3.1. Diseño experimental fraccionario 2 <sup>f</sup> . Las variables de entrada son la presión (P), Temperatura (T) y porcentaje de agente porógeno (%PS). Las variables de respuesta son la morfología y tamaño de agregado, área superficial BET, volumen de mesoporo y tamaño de macroporo.....	46
Figura 3.2. Diagrama de flujo que muestra las etapas principales en el desarrollo experimental en la síntesis de agregados nanoestructurados de $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ : i) Diseño y Síntesis, ii) Caracterización y iii) pruebas biológicas. ....	48
Figura 3.3. Extracción de ADN plasmídico: (a) Pasos generales en la extracción de ADNp y (b) procedimiento del Kit Pure Yield <sup>TM</sup> Plasmid Miniprep System .....	53
Figura 3.4. Diagrama de síntesis del péptido DS a partir del plásmido pFN21K. El Diagrama incluye los pasos desde la expresión del péptido hasta su detección y revelado con luminol, en un análisis tipo Western. ....	54
Figura 4.1. Espectro DRX del polvo de las esferas de $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ obtenidas después del proceso de secado por aspersión y calcinado a diferentes temperaturas. Este presenta las fases H = $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ (tarjeta Crystallography Open Database, COD, 1008841), F = $\text{Fe}_2\text{O}_3$ (tarjeta COD 9015964).....	63
Figura 4.2. Imágen SEM de (a) agregados esféricos de $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ antes de ser tratados térmicamente y (b) una amplificación a 20000 X que muestra un agregado de $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ en el cual pueden ser observadas las esferas de poliestireno (PS) antes de ser eliminadas. ....	64

Figura 4.3. Imágenes de SEM de los agregados de  $BaFe_{12}O_{19}$  y sus correspondientes histogramas de distribución de tamaño. (a) Muestra con 50% de PS bajo condiciones de secado por aspersión de 200 °C y 2.0 Kg/cm<sup>2</sup> y su correspondiente distribución de tamaño de partícula (b). (c) Muestra con 30% de PS bajo condiciones de secado por aspersión de 180 °C y 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> y su correspondiente distribución de tamaño de partícula (d). Las muestras fueron calcinadas a 700 °C.....66

Figura 4.4. (a) Espectro EDS de los agregados de  $BaFe_{12}O_{19}$  el cual indica la presencia de los elementos Ba, Fe y O. El C es producido por la cinta doble cara de carbono usada como adhesivo en soporte. (b) Mapeos químicos de EDS de los agregados de  $BaFe_{12}O_{19}$ : Imagen SEM en el modo de electrones secundarios. Las imágenes de Ba (verde), Fe (rojo) y O (azul) indican su distribución homogénea y que estos elementos son los únicos presentes en las muestras. ....67

Figura 4.5. Imágenes de STEM-ADF de los agregados de  $BaFe_{12}O_{19}$ . Las esferas están conformadas principalmente por cristales alargados. ....68

Figura 4.6. Imágenes de una misma esfera de  $BaFe_{12}O_{19}$  en el modo (a) STEM-ADF y (b) TEM, las cuales permiten comparar el contraste de los cristales que la conforman. ....68

Figura 4.7. Imágenes de TEM en campo claro (a y c) y en campo oscuro (b y d) del material que conforman las esferas después de haber sido desbaratadas por el tratamiento ultrasónico. El inserto en (b) presenta el patrón SAEDP proveniente del material presentado en (a). El inserto en (d) presenta el patrón SAEDP del cristal alargado presentado en (c). ....69

Figura 4.8. Imágenes HRTEM de los cristales que conforman los agregados porosos de  $BaFe_{12}O_{19}$ . (a) y (b) corresponden a cristales individuales de la fase  $BaFe_{12}O_{19}$ . (c) Coexistencia entre las fases  $BaFe_{12}O_{19}$  y  $BaFe_2O_4$ . (d) Coexistencia entre las fases  $BaFe_{12}O_{19}$  y  $Fe_2O_3$ .....70

Figura 4.9. (a) Imagen de HRTEM de uno de los cristales alargados que conforman las esferas de  $BaFe_{12}O_{19}$ . El inserto presenta la correspondiente FFT, la cual indica que el eje de zona corresponde al eje en la dirección [2-110]. (b) Imagen digitalmente procesada correspondiente al área del recuadro indicado en (a). El filtro usado para el procesamiento es indicado en el inserto. (c) Imagen de HRTEM de otro de los cristales alargados con defectos. (d) Imagen digitalmente procesada del área indicada en el recuadro en (c). ....71

Figura 4.10. Celda unitaria de  $BaFe_{12}O_{19}$  obtenidas usando los valores indicados en [27] y observada en la dirección [10-10] (a) y en la dirección [21-10] (b). También se presentan las unidades S y R. El plano que contiene a Ba es un plano espejo. Ba en verde, Fe en amarillo y O en rojo.....72

Figura 4.11. Simulación computacional de imágenes de HRTEM en las direcciones [0001] (a), [10-10] (b), y [2-1-10] (c). Se presenta la proyección de la celda  $BaFe_{12}O_{19}$  en las direcciones indicadas, la simulación de su imagen en el desenfoque de Scherzer, y su correspondiente patrón de difracción del área selecta simulado. Las condiciones de simulación fueron: V = 200 KV, desenfoque de Scherzer en -54.85 nm y 4x4x4 celdas. Ba en verde, Fe en amarillo, y O en rojo.73

Figura 4.12. Imagen de HRTEM en la dirección [1-100] de uno de los cristales alargados que conforman los agregados de  $BaFe_{12}O_{19}$  y la imagen computacionalmente simulada en la misma dirección. En este caso la imagen de HRTEM no presenta defectos. También se incluyen las posiciones de los átomos en la celda unitaria. Ba en verde, Fe en amarillo y O en rojo. ....74

Figura 4.13. Isotermas de adsorción/desorción BET para (a) muestra con 50% de esferas de PS bajo condiciones de secado por aspersión de 200 °C y 2.0 Kg/cm<sup>2</sup>, y (b) muestra con 30% de esferas de PS bajo condiciones de secado por aspersión de 180 °C y 1.5 Kg/cm<sup>2</sup>. Las muestras fueron calcinas a 700 °C.....75

Figura 4.14. Espectro Infrarrojo (IR) que muestra los enlaces/grupos funcionales a números de onda (cm<sup>-1</sup>) específicos correspondientes al péptido DS-HaloTag libre y, los sistemas nanoestructurados de  $BaFe_{12}O_{19}$  libres y cargados con el péptido.....76

Figura 4.15. Curvas de histéresis de los agregados de  $BaFe_{12}O_{19}$  calcinados a diferentes temperaturas. Los valores de las muestras fueron tomadas a temperatura ambiente y 5000 Oe. ..77

Figura 4.16. Extracción de ADN plasmídico: La columna 1 es referida al marcador Kb Plus DNA Ladder de peso molecular conocido (pares de bases, pb). El marcador se compone de 20 bandas de ADN de alta pureza, de doble cadena que abarca 100 pb hasta 12000 pb. La columna 2 representa el ADNp de la cepa NEB (New England Biolab) T7 DS. Además, puede ser observado en la columna 2 la presencia de tres bandas: a) es referida al ADNp relajado, b) describe el ADNp enrollado, y c) explica el ADNp súper-enrollado. ....79

Figura 4.17. Separación de proteínas por electroforesis en gel SDS-PAGE.....80



Figura 4.18. Imágenes del microscopio óptico en las cuales se puede observar la expresión de un gen reportero indicando las células CHO han sido transfectadas. ....	81
Figura 4.19. Análisis tipo Western blot. La proteína de interés DS-HaloTag aparece a una altura de 61 ~KDa. ....	82
Figura 4.20. Histograma de distribución de aminoácidos. ....	83
Figura 4.21. Interacción BaFe <sub>12</sub> O <sub>19</sub> -DS-HaloTag. La disminución en los valores de DO a medida que el tiempo transcurre indica la absorción del péptido por los agregados de BaFe <sub>12</sub> O <sub>19</sub> . ....	85
Figura 4.22. Análisis visual SDS-PAGE de la interacción BaFe <sub>12</sub> O <sub>19</sub> -DS-HaloTag que muestra cómo disminuye la cantidad de proteína libre en el medio. ....	86
Figura 4.23. Carga superficial (mV) en función del pH para el péptido DS-HaloTag y los sistemas nanoestructurados de BaFe <sub>12</sub> O <sub>19</sub> . ....	87
Figura 4.24. Modelo propuesto para las posibles interacciones BaFe <sub>12</sub> O <sub>19</sub> -DS-HaloTag ....	88
Figura 4.25. Perfiles de liberación del péptido DS ....	89

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.I. Factores a evaluar en el diseño experimental: A) Presión (P), B) Temperatura (T) y C) Concentración de poliestireno usado como agente porógeno (%PS). Cada uno de los parámetros presenta un nivel bajo (-) y un nivel alto (+). ....	46
Tabla 3.II. Matriz del diseño experimental. ....	47
Tabla 4.I Variables de respuesta ( $\phi_{\text{agregado}}$ , $S_{\text{BET}}$ , $V_{\text{mesoporo}}$ , $\phi_{\text{macroporo}}$ ) del diseño experimental fraccionario 2 <sup>f</sup> como resultado del efecto de los factores P, T y %PS. ....	61
Tabla 4.II. Análisis de variancia ANOVA. ....	62
Tabla 4.III. Propiedades magnéticas de los agregados porosos de hexaferrita de bario. ....	78
Tabla 4.IV. Información de secuencia. ....	82
Tabla 4.V. Tabla de distribución de aminoácidos. ....	83

## RESUMEN

Hoy en día existe una gran variedad de formulaciones para la síntesis de materiales nanoestructurados a base de óxido de hierro para aplicaciones biomédicas. El objetivo del presente trabajo fue diseñar y sintetizar agregados nanoestructurados de hexaferrita de bario ( $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ) de tamaño micrométrico con jerarquía meso-macroporosa usando el método sol-gel y secado por aspersión. Usando un diseño experimental factorial  $2^f$ , se evaluaron la concentración (% peso) de agente porógeno y los parámetros de temperatura (T) y presión (P) en el proceso de secado por aspersión para determinar el efecto de estas variables sobre el tamaño de agregado de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  y el tamaño de macroporo. A partir de técnicas de caracterización tales como XRD, SEM y TEM se determinó la estructura, morfología y composición de los polvos de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . Se obtuvieron agregados esféricos de 1.7  $\mu\text{m}$  de diámetro con una estructura meso-macroporosa determinada a partir de SEM y BET. El tamaño de macroporo fue de aproximadamente 223 nm y el tamaño de mesoporo varió entre 3.4 nm y 12 nm. Así mismo, mediante VSM se obtuvieron curvas de histéresis a partir de las cuales se determinó las propiedades magnéticas de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . A una temperatura de calcinación de 700 °C se obtuvo un material con comportamiento semiduro, cuyos valores de magnetización de saturación y campo coercitivo fueron,  $M_s = 14.24$  emu/g y  $H_c = 194.65$  Oe, respectivamente. Finalmente, los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  fueron probados como portadores de moléculas con actividad biológica, para ello, se usó el péptido DS como fármaco modelo, sintetizado a partir de los plásmidos pF1A T7 Flexi® y pFN21K a partir de la cepa T7 de *Escherichia coli*. Se determinó la capacidad de carga y perfil de liberación del péptido DS mediante las técnicas de SDS-PAGE, FTIR, análisis tipo Wester blot y UV-vis. El porcentaje de absorción del péptido DS por los agregados nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  fue de 87.5%. Por lo tanto, los agregados esféricos nanoestructurados con jerarquía meso-macroporosa obtenidos en el presente trabajo de investigación pueden ser considerados como candidatos para ser aplicados en el área biomédica como sistemas de liberación de fármaco.

Palabras clave:  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ , sistemas nanoestructurados, macro-mesoporosidad, método sol-gel, secado por aspersión, diseño experimental.

## ABSTRACT

Nowadays, there is a great variety of formulations for the synthesis of nanostructured materials based on iron oxide with biomedical applications. The aim of the present work was to design and synthesize nanostructured macro-mesoporous hierarchical spherical aggregates of barium hexagonal ferrite  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  using the sol-gel method through molecular self-assembly and spray-drying. Therefore, using a  $2^f$  factorial experimental design, the concentration (wt%) of template and the parameters of temperature (T) and pressure (P) in the spray drying process were evaluated to determine the effect of these variables on the aggregate size of  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  and the size of macropore. Characterization techniques such as XRD, SEM, and TEM determined the structure, morphology and composition of the  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  powders obtained after the spray-drying process. Spherical aggregates of 1.7  $\mu\text{m}$  were obtained with a meso-macroporous structure determined from SEM and BET. The macropore size was about 223 nm and the mesopore size varied between 3.4 nm and 12 nm. Hysteresis loops were obtained from VSM technique and the magnetic properties of  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  aggregates were determined. At a calcination temperature of 700 ° C a material with semi-hard behavior was obtained, whose saturation magnetization and coercive field values were,  $M_s = 14.24$  emu/g and  $H_c = 194.65$  Oe, respectively. Finally, the  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  aggregates were tested as carriers of biologically active molecules. For this purpose, the peptide DS (Hairless suppressor binding domain [Su (H)]) was used as the template drug, synthesized from the plasmids pF1A T7 Flexi® and pFN21K from the T7 strain of *Escherichia coli*. The loading capacity and release profile of the DS peptide was determined by the SDS-PAGE, FTIR, Western blot and UV-vis techniques. Absorption performance of DS peptide by the nanostructured aggregates of  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  was 87.5%. Therefore, the nanostructured macro-mesoporous hierarchical spherical aggregates of barium hexagonal ferrite  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  obtained in the present research can be considered as candidates to be applied in the biomedical area as drug delivery systems.

## CAPÍTULO 1.

---

## INTRODUCCIÓN

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es un campo científico multidisciplinario que aplica los principios de ingeniería y fabricación para el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales a escala nanométrica. En las últimas décadas, la nanotecnología se ha desarrollado en diversas áreas de investigación abarcando las matemáticas, química, física, biología, electrónica, ingeniería, biomédica y ciencia de materiales, entre otras.

Dentro del sector biomédico, una gran variedad de materiales orgánicos e inorgánicos tales como micelas, polímeros, liposomas, lipoproteínas dendrímeros y nanopartículas magnéticas han sido investigados ampliamente para diferentes aplicaciones incluyendo terapia celular, reparación de tejidos, imagen de resonancia magnética, hipertermia, marcadores biológicos y como sistemas de liberación de fármacos (DDS). Sin duda, las partículas magnéticas son los materiales más prominentes usados como DDS debido a sus propiedades físicas, químicas, térmicas, mecánicas y magnéticas que las hacen herramientas ideales para ser usadas en las aplicaciones antes mencionadas. Como plataformas para la liberación de fármacos, estos sistemas pueden ofrecer muchas ventajas, por ejemplo, (i) se estabilizan sin alterar la actividad farmacológica del medicamento, (ii) previenen la degradación metabólica prematura en la circulación sistémica o interacción con el ambiente biológico, de manera que alcance el objetivo pretendido en su estado prístino, (iii) liberan el medicamento en el sitio o tumor deseado y (iv) presentan una toxicidad menor o similar que la del fármaco libre.

Recientemente, un gran número de fármacos macromoleculares, tales como péptidos, proteínas y ácidos nucleicos han sido descubiertos. Sin embargo, estos fármacos muestran pobre estabilidad en la mayoría de los ambientes biológicos y pobre penetración a través de la barrera hematoencefálica, lo cual limita su administración a través de rutas parentales. Además, cuando estos fármacos son administrados parentalmente están expuestos a la degradación químico-enzimática antes de alcanzar su sitio de destino debido a su estabilidad limitada y corta vida media. Por lo tanto, una gran cantidad de trabajos se ha enfocado al desarrollo de sistemas DDS para proporcionar una manera más efectiva de liberar y proteger los péptidos y proteínas.

Existen numerosos métodos (i) físicos, (ii) químicos, (iii) biológicos, e (híbridos) para la síntesis de nanopartículas. El método de preparación de los nanomateriales determinará el tamaño y distribución de las partículas, su morfología, química superficial y, consecuentemente, sus propiedades magnéticas.

En esta investigación, agregados esféricos nanoestructurados de hexaferrita de bario ( $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ) de tamaño micrométrico con jerarquía macro-mesoporosa fueron sintetizados usando el método químico húmedo sol-gel mediante autoensamble molecular y secado por aspersion aplicando un diseño experimental factorial  $2^f$ . En el procesamiento de los materiales dirigidos a una aplicación específica, una información detallada sobre las características del material es requerida para alcanzar el objetivo deseado. Así, los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  se caracterizaron mediante difracción de rayos x (XRD, por sus siglas en inglés), microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), área superficial específica BET, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) y por magnetómetro de muestra vibrante (VSM, por sus siglas en inglés) para la determinación de las propiedades magnéticas.

Finalmente, los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  se evaluaron como portadores de moléculas biológicas. El péptido DS (Dominio de unión a supresor de Hairless [Su(H)]) se usó como fármaco modelo para evaluar la capacidad de carga de los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  como DDS. Después de ser cargados los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  con el péptido, se llevaron a cabo los estudios de liberación. El péptido DS se sintetizó a partir de los plásmidos pF1A T7 Flexi®, pFN21K y pFN18K empleando la cepa T7 Express Iq Competent XL-1 blue (T7) de *Escherichia coli*. A su vez, isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranoídido (IPTG) se usó para inducir la producción del péptido. El IPTG es una molécula de uso común en biología molecular. Se usa como un análogo no hidrolizable de la alolactosa, un metabolito de la lactosa que desencadena la transcripción del operón lac, y por lo tanto se usa para inducir la expresión de proteínas cuando el gen está bajo el control del operón lac.

## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1. Objetivo General

Diseñar, sintetizar y caracterizar sistemas nanoparticulados de hexaferrita de bario ( $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ) conformados en agregados micrométricos con jerarquía macro-mesoporosa, a partir de un diseño experimental factorial fraccionario  $2^f$ ; usando el método químico sol-gel con autoensamble molecular asistido por surfactante Tween 20 y esferas de poliestireno usadas como agente porógeno, y mediante secado por aspersión, para ser usados como portadores de moléculas con actividad biológica.

### 1.1.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la concentración (% peso) de agente porógeno y los parámetros de temperatura ( $T$ ) y presión ( $P$ ) en el proceso de secado por aspersión para determinar el efecto de estas variables sobre el tamaño de agregado de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  y el tamaño de macroporo.
- Sintetizar sistemas de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  mediante el método químico sol-gel asistido por Tween 20 y esferas de poliestireno para producir agregados esféricos nanoestructurados de tamaño micrométrico con jerarquía macro-mesoporosa.
- 
- Caracterizar estructural, morfológica y fisicoquímicamente los sistemas nanoparticulados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  mediante técnicas de XRD, SEM, TEM, BET, FTIR y VSM para proporcionar los detalles necesarios respecto a las propiedades físicas, químicas y magnéticas de los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ .

- Sintetizar y caracterizar el péptido DS a partir de los plásmidos pF1A T7 Flexi®, pFN21K y pFN18K empleando la cepa T7 de *Escherichia coli*, el cual será utilizado como fármaco modelo.
- Determinar las propiedades magnéticas de los sistemas nanoparticulados de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub>, incluyendo su magnetización magnética (*Ms*), remanencia magnética (*Mr*) y coercitividad (*Hc*) para ser explotadas en la entrega y direccionamiento del péptido DS.
- Determinar la carga superficial de los sistemas nanoparticulados de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> para permitir una mejora en el rendimiento de adsorción del péptido DS.
- 
- Determinar la capacidad de carga de los sistemas nanoestructurados de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> y evaluar el perfil de liberación del péptido DS para evaluar los sistemas de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> como candidatos para sistemas de liberación de fármaco.



## 1.2. HIPÓTESIS

La obtención de agregados esféricos de nanopartículas superparamagnéticas con nanoestructura y macroporosidad diseñada, obtenidas utilizando técnicas de autoensamblaje molecular con agentes porógenos y mediante secado por aspersión, permitirá la obtención de un portador de moléculas con actividad biológica más viable, que tenga un mejor desempeño en cuanto a la adsorción de ciertas moléculas biológicas sin perder las propiedades superparamagnéticas características de las nanopartículas.

### 1.3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances significativos en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, ésta es una de las enfermedades más devastadoras que amenazan con la salud humana y es la segunda causa más común de mortalidad. Actualmente, la cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia son los métodos de tratamiento más utilizados, sin embargo, ninguno de estos métodos ofrece una verdadera recuperación total. En muchos casos, la erradicación quirúrgica o tratamiento por radiación no son factibles.

Por otra parte, el mayor problema de la quimioterapia es la limitada eficacia de los agentes quimioterapéuticos y su falta de especificidad a las células tumorales, así como a las altas concentraciones de fármaco utilizadas. Para superar este problema, altas concentraciones o frecuencias de dosificación de los agentes quimioterapéuticos son requeridas, resultando así en efectos secundarios severos no deseados debido a la alta citotoxicidad del fármaco. Por lo tanto, surge la necesidad de desarrollar métodos eficaces de administración de fármacos, capaces de mantener los niveles del fármaco en una concentración estrecha necesaria para evitar toxicidad. Además de dirigir el medicamento a las células cancerosas mientras se reducen los efectos secundarios en la mayor medida posible. Esta necesidad se ve reflejada en cómo ha ido incrementando gradualmente el número de publicaciones a lo largo de los años, ya que la tecnología basada en sistemas de liberación de fármaco (DDS) ha progresado en las últimas décadas. Por ejemplo, la revista *Journal of Controlled Released* (JCR) ha recibido sustancialmente más artículos de lo que publica (Fig. 1.1).

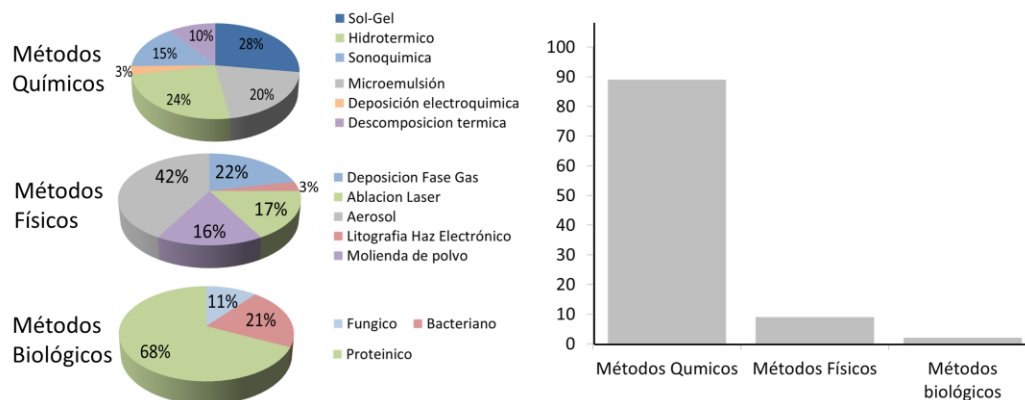


**Figura 1.1** Número de artículos publicados anualmente en la revista *Journal of Controlled Release* desde 1984

Una amplia variedad de biomateriales compuestos de diversas formulaciones han sido usados como DDS. No obstante, en las últimas dos décadas, las nanopartículas magnéticas han atraído mucha atención como DDS [1,2], además de otras aplicaciones tales como imagen de resonancia magnética (MRI) [3,4], reparación de tejidos [5,6], hipertermia magnética [7,8] e inmunoensayos [9] debido a su biocompatibilidad, fácil modificación superficial y sus propiedades físicas, químicas y magnéticas únicas. Una de las características más importantes de las nanopartículas magnéticas es su comportamiento superparamagnético, donde la energía térmica es suficientemente fuerte para cambiar la dirección de la magnetización [10], por ejemplo, las fluctuaciones térmicas desmagnetizan espontáneamente un ensamble previamente saturado. Como resultado de esta propiedad, las partículas magnéticas muestran un potencial para mejorar las características de contraste en MRI, DDS e hipertermia. Además, el comportamiento superparamagnético permite la manipulación de las partículas en presencia de un campo magnético externo. Así, un sistema DDS puede ser guiado magnéticamente hasta el sitio de acción en el cual el fármaco será liberado, reduciendo de esta manera la concentración del fármaco y su frecuencia de dosificación para evitar efectos secundarios no deseados. Además, una vez eliminando el campo magnético, las nanopartículas magnéticas no muestran una interacción magnética ya que no retienen magnetismo [11]. Por lo tanto, la ausencia de coercitividad prevendrá la agregación potencial de las partículas que pudieran fácilmente causar la formación de embolismo en los vasos sanguíneos [12].

Más aún, los sistemas micrométricos nanoestructurados permiten la preservación de las propiedades a escala nanométrica, pero con partículas a escala micrométrica. Esto es importante debido a que las partículas de tamaño micrométrico son más fáciles de manejar que las partículas nanométricas. Además, una jerarquía macro-mesoporosa presentan una arquitectura que exhiben alta área superficial, baja densidad y buena estabilidad fisicoquímica [13]. Así mismo, la estructura jerárquica juega un papel importante en muchas de las propiedades y aplicaciones funcionales del material [14]; por ejemplo, los materiales macro-mesoporosos muestran un incremento considerable en la capacidad de carga de un fármaco. En los materiales macro-mesoporosos, los macroporos proporcionan una interconectividad que mejora la difusión o flujo

de fluidos. Mientras que los mesoporos aumentan considerablemente el área superficial específica y por lo tanto tienen una mayor capacidad para que las moléculas puedan ser adsorbidas [15]. Por otra parte, la morfología de las partículas juega un papel importante en el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo. Además, una morfología esférica es de importancia práctica ya que, en general, ésta presenta mejores propiedades reológicas comparado con otras morfologías. Una gran variedad de métodos han sido estudiados para la síntesis de sistemas nanoestructurados dirigidos a aplicaciones biomédicas. La Fig. 1.2 muestra las tres rutas de síntesis más importantes. Sin duda, los métodos de síntesis química húmeda, principalmente el método sol-gel, es el método fundamental más empleado en la síntesis de materiales para aplicaciones biomédicas debido a sus muchas ventajas: i) los precursores pueden mezclarse a nivel molecular, lo cual permite la formación de soluciones sólidas del material a temperaturas de procesamiento relativamente bajas cuando se compara con los métodos tradicionales, ii) es un método fácil, sencillo y versátil, iii) permite un control químico y estructural, es decir, la nucleación y crecimiento de las partículas coloidales primarias puede ser controlada para dar partículas con tamaño y forma deseada, además de la composición química deseada, iv) los materiales sintetizados a partir de este método son obtenidos con una alta pureza.



**Figura 1.2.** Métodos de síntesis de los sistemas nanoestructurados dirigidos a aplicaciones biomédicas. Las tres rutas principales incluyen métodos químicos, físicos y biológicos. Fuente: Instituto de Información Científica. Modificado de M. Mahmoudi [16].

## CAPÍTULO 2

---

---

## REVISIÓN DEL ESTADO DEL ARTE

## CAPÍTULO 2. REVISIÓN DEL ESTADO DEL ARTE

En el presente capítulo se aborda cómo la nanotecnología ha revolucionado los diferentes aspectos de la investigación científica y tecnología en diversos campos tales como la electrónica, semiconductores, química, física, ciencia de los materiales, bioingeniería, medicina, etc. [17-27]. En las últimas décadas, la nanotecnología ha contribuido a avances significativos en el desarrollo de los biomateriales y el área de la medicina a través de la terapia y diagnóstico clínico para el tratamiento de diversos tipos de cáncer mediante el diseño e ingeniería de materiales nanoestructurados capaces de interactuar con los sistemas biológicos a escala molecular. Las aplicaciones más prominentes de estos nanodispositivos incluyen terapia génica, MRI [28-30], hipertermia [31-33], sistemas de liberación de fármacos (DDS) [35,35]. Una gran variedad de materiales orgánicos e inorgánicos han sido investigados como sistemas DDS. Sin embargo, los materiales magnéticos nanoestructurados de óxido de hierro son considerados los materiales más prominentes debido a sus características únicas tales como biocompatibilidad, alta área superficial y comportamiento superparamagnético; lo que los hace una herramienta ideal para las aplicaciones antes mencionadas [36].

### 2.1. BIOMATERIALES

Un *biomaterial* puede ser definido como cualquier material, natural o sintético, usado para la fabricación de dispositivos que reemplacen una parte de un sistema vivo, o bien, que realice una función en contacto íntimo con el tejido vivo de una manera segura, confiable, y fisiológicamente aceptable [37]. Por lo tanto, un biomaterial tiene que presentar propiedades compatibles con el tejido a interactuar para obtener el efecto deseado. El Consejo Asesor para Biomateriales de la Universidad de Clemson ha definido formalmente un biomaterial como una sustancia de actividad sistémica y farmacológicamente inerte para su implantación o incorporación dentro o con el sistema vivo.

Debido a que los biomateriales tienen como objetivo interactuar con los tejidos o fluidos biológicos del cuerpo humano, es fundamental que estos cumplan con ciertos requisitos para evitar inducir cambios o provocar reacciones no deseadas en el cuerpo humano. Un requisito fundamental es la biocompatibilidad, la cual se refiere a la capacidad del material para realizar con eficiencia una respuesta apropiada en el huésped en una aplicación deseada, es decir, el material y el entorno de los tejidos deben coexistir sin tener ningún efecto no deseado o inapropiado entre ellos [36]. Otras características importantes son su baja toxicidad, estabilidad química, densidad y peso adecuado, además es deseable que sean económicos.

### 2.1.1. Aplicaciones

En las últimas décadas, la síntesis y aplicación de biomateriales ha llegado a ser una de las áreas de investigación más activa y prometedora, posicionada en la intersección de la química, ciencia de los materiales, bioingeniería y la medicina.

Una de las aplicaciones de los biomateriales que ha atraído cada vez más la atención de los científicos es su uso como sistemas de liberación de fármaco. Una gran variedad de materiales han sido estudiados para esta aplicación, por ejemplo, dendrímeros, micelas, emulsiones, liposomas y sistemas nanoestructurados. Especialmente, las nanopartículas magnéticas a base de hierro han sido de gran interés debido a las oportunidades en la terapia de cáncer y el tratamiento de otras enfermedades. Su potencial deriva de las propiedades intrínsecas de sus núcleos magnéticos combinados con la capacidad de carga del fármaco y las propiedades bioquímicas que pueden ser adquiridas mediante su recubrimiento adecuado. Además, las nanopartículas pueden actuar a nivel tisular o celular, lo cual implica que pueden ser endocitadas o fagocitadas, resultando en su internalización. En éste proceso, las nanopartículas pueden llegar más allá de la membrana citoplasmática.

Entre las aplicaciones más usadas de las nanopartículas como biomateriales se encuentran la imagen de resonancia magnética, hipertermia y sistemas de liberación de fármacos, las cuales se explican a continuación.

*a. Imagen de resonancia magnética*

Los avances en el desarrollo de nuevas estrategias y tecnologías para tratamiento y evaluación preclínica de cáncer mediante el uso de fármacos antitumorales destacan la creciente necesidad de una evaluación a tratamientos tumorales *in vivo* mediante el uso de biomarcadores de imagen. La imagen de resonancia magnética (MRI) se ha establecido como la herramienta principal en el monitoreo *in vivo* de cambios morfológicos, funcionales y metabólicos en tumores sólidos debido a su excelente contraste en tejidos blandos, excelente resolución espacial, y naturaleza no-invasiva. MRI es una técnica que usa el magnetismo y pulso por radiofrecuencia (RF) para producir imágenes de tejidos u órganos compuestos de elementos sensibles a la resonancia magnética tales como hidrógeno (H). La MRI se basa en los principios de la resonancia magnética nuclear. El cuerpo biológico se compone de numerosos protones contenidos en el núcleo del H, los cuales giran en sus ejes con la llamada frecuencia de Larmor produciendo un campo magnético representado por el momento o vector magnético. Una gran cantidad de protones en el cuerpo resultará en un vector magnético neto que se alinea con el campo magnético externo, o paralelo al eje longitudinal del magneto. Esta alineación de protones es llamada magnetización longitudinal. Cuando la magnetización longitudinal se inclina transversalmente debido a un impulso de RF, se induce una corriente eléctrica, o señal de resonancia magnética, que puede ser recibida por una bobina de RF. En esencia, la MRI se lleva a cabo aplicando de manera alterna pulsos de RF al tejido biológico. La Aplicación de pulsos de RF en cierto tiempo de repetición (TR) y las señales recibidas en un tiempo predefinido o tiempo de repetición (TE) produce el contraste en las imágenes de MRI. Tales señales de resonancia magnética son entonces codificadas en fase y frecuencia a imágenes de resonancia magnética por la técnica de transformada de Fourier.



### *b. Hipertermia*

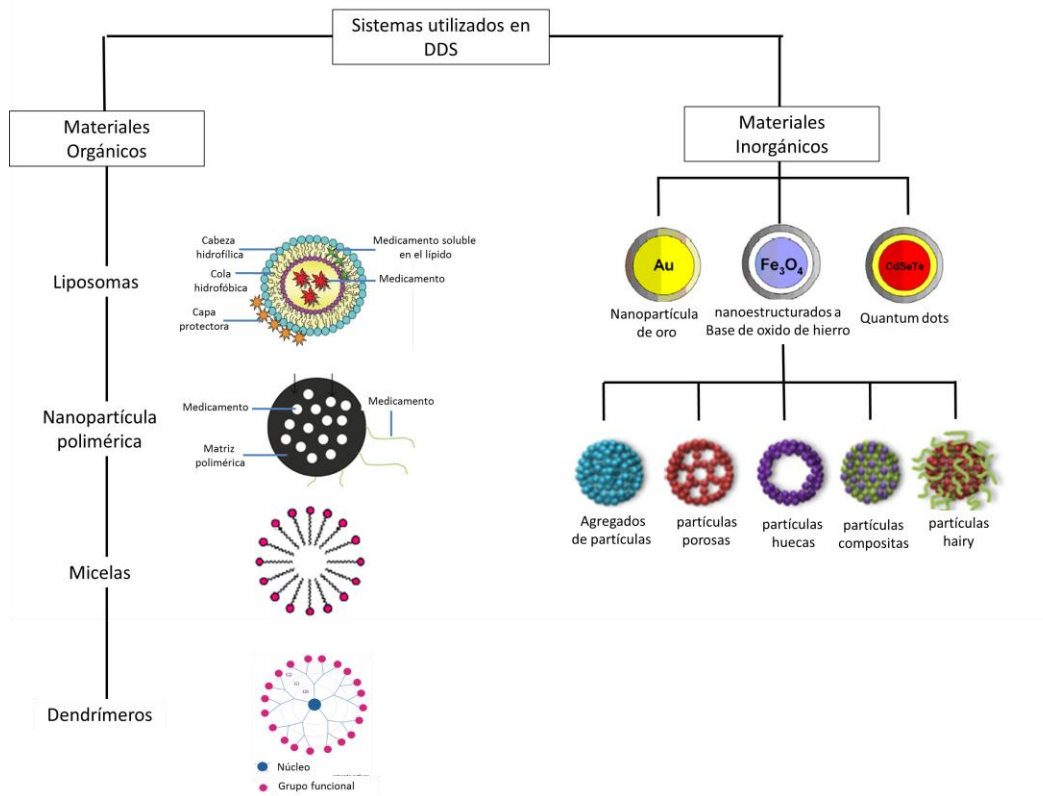
La hipertermia implica el tratamiento de células cancerígenas a través de la generación de calor [38]. Este enfoque involucra el aumento de la temperatura del ambiente local del tumor resultando en un cambio en la fisiología de las células enfermas llevándolas finalmente a la apoptosis. Dependiendo del grado en el aumento de la temperatura, el tratamiento por hipertermia puede ser clasificado como: i) ablación térmica [39], en el cual el tumor es sometido a altas temperaturas de calor mayores a 46 °C, pudiendo llegar a los 56 °C causando que las células experimenten necrosis, coagulación o carbonización. ii) Hipertermia moderada [39], con temperaturas entre 41 °C y 46 °C, tiene efectos tanto a nivel celular como tisular; las células experimentan estrés térmico resultando en la activación y/o iniciación de muchos mecanismos de degradación intra- y extracelular tal como la degradación o pliegue. iii) Diatermia [39], implica temperaturas menores a 41 °C para el tratamiento de enfermedades reumáticas en la fisioterapia.

### *c. Sistemas de liberación de fármaco*

Los sistemas de liberación de fármaco tienen como objetivo la entrega y liberación de fármacos a sitios de acción específicos manteniendo la concentración del fármaco a un nivel terapéutico adecuado durante un período de tiempo determinado. Es decir, un sistema ideal para la liberación de fármacos debe ser capaz de controlar la liberación y focalización del fármaco para garantizar una alta eficiencia del fármaco, a la vez que se disminuyen los efectos secundarios causados por los fármacos anticancerígenos que no únicamente actúan sobre las células cancerosas, sino además sobre las células sanas. Un sistema nanoestructurado para la liberación de fármacos puede penetrar en el cuerpo, ya que su tamaño le permite ser administrado vía intravenosa o a través de otras rutas de administración. Además, los sistemas de liberación de fármaco deben permanecer estables, tanto física como químicamente antes de llegar a su destino.

## 2.2. SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACO

En la Fig. 2.1 se presentan los diferentes tipos de sistemas nanoparticulados empleados en la liberación de fármacos, los cuales se describen brevemente.



**Figura 2.1.** Categorías esenciales de los materiales usados como DDS. i) Materiales orgánicos: dendrimeros, micelas, liposomas. i) Materiales inorgánicos: nanopartículas de oro, sistemas nanoestructurados a base de óxido de hierro, quantum dots. (Modificado de Grumezescu [40] y Riggio [45])

### 2.2.1. Liposomas

Los liposomas tienen una larga historia como sistemas de liberación de fármaco debido a su fácil preparación, baja toxicidad, y biodegradabilidad [41,42]. Los liposomas son estructuras coloidales autoensambladas compuestas de bicapas lipídicas que rodean un compartimiento

acuoso y puede encapsular una amplia variedad de fármacos quimioterapéuticos, ya sean hidrófilos o hidrófobos [43,44]. Los liposomas se pueden clasificar como liposomas de primera generación o liposomas desnudos, con una superficie de fosfolípido no modificado; de segunda generación o liposomas furtivos, con una capa de carbohidratos o polímeros hidrófilos, generalmente de PEG, en la superficie de las vesículas; y liposomas de tercera generación que incorporan ligandos superficiales para mejorar el índice terapéutico del fármaco mediante el aumento de la selectividad y la especificidad del complejo. En la Fig. 2.1 se representa esquemáticamente la estructura de los liposomas.

### 2.2.2. Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas (Fig. 2.1) son portadores que van de 10 a 100 nm, conformados de polímeros naturales o artificiales, generalmente biodegradables, donde los fármacos terapéuticos puede ser adsorbidos, disueltos, atrapados, encapsulados, o enlazados covalentemente a la cadena principal del polímero por medio de un enlace sencillo éster o amida que se pueden hidrolizar in vivo a través de un cambio de pH.

Los polímeros sintéticos, que incluyen al ácido poliláctico (PLA) [46], ácido poliglicólico (PGA) [47], poli etilenglicol (PEG) [48], y sus copolímeros, han sido los más ampliamente investigados debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Otros polímeros naturales como el quitosano y alginato han sido ampliamente probados [49].

### 2.2.3. Micelas

Las micelas son portadores esféricos biodegradables con un intervalo de tamaño de 10-200 nm. Éstas son formadas por autoensamblaje de bloques de copolímeros compuestos de dos o más cadenas de polímeros con diferente hidrofobicidad. Estos copolímeros espontáneamente se

ensamblan para formar una estructura de núcleo-coraza en un medio acuoso para minimizar la energía libre del sistema (Fig. 2.1). Los segmentos hidrófobos forman el núcleo interior hidrófobo para minimizar su exposición al medio ambiente, mientras que las cadenas hidrófilas forman la coraza hidrófila externa para estabilizar el núcleo a través del contacto directo con el agua [50].

#### 2.2.4. Dendrímeros

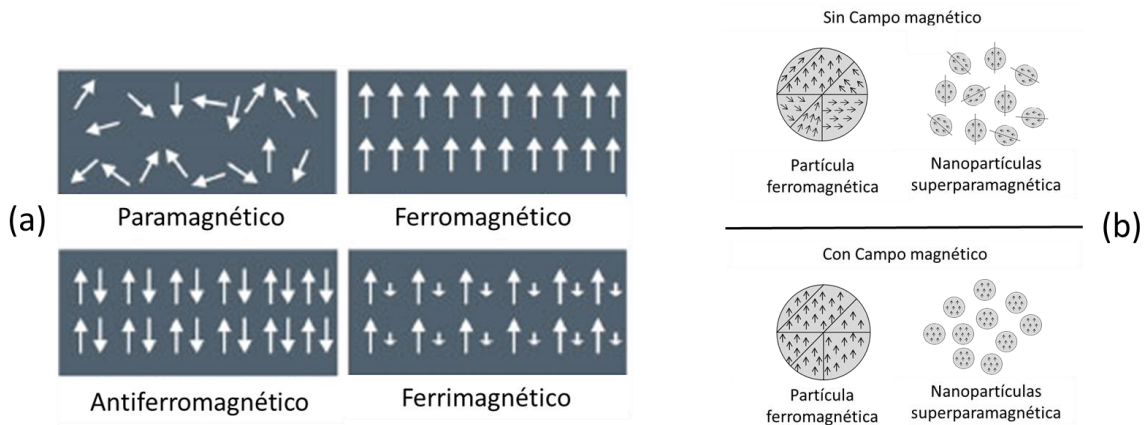
Los dendrímeros son macromoléculas altamente ramificadas, esféricas, y sintéticas con tamaño y forma ajustable. Contienen múltiples capas con grupos terminales activos, también conocidos como generaciones, que se extienden hacia fuera desde un núcleo iniciador llamado generación cero (Fig. 2.1). El tamaño de los dendrímeros está, generalmente, en el rango de 1-15 nm. Las ramificaciones de estos polímeros proporcionan un área superficial grande para que moléculas y/o medicamentos quimioterapéuticos, puedan ser unidos, a través de la conjugación covalente o adsorción electrostática. Alternativamente, los agentes terapéuticos se pueden cargar en las cavidades de las regiones centrales a través de interacción hidrofóbica, enlaces de hidrógeno, o enlace químico. Los dendrímeros más comúnmente estudiados pertenecen a la familia de los dendrímeros PAMAM (poliamidoamina). Estos polímeros han mostrado un gran potencial para la liberación de medicamentos, ya que son biodegradables y biocompatibles y tienen alta solubilidad en agua [51].

#### 2.2.5. Nanopartículas Magnéticas

La liberación controlada de fármacos con materiales funcionales nanoestructurados, especialmente las nanopartículas magnéticas, está atrayendo cada vez más la atención debido a las oportunidades en la terapia de cáncer y el tratamiento de otras enfermedades. El potencial de las nanopartículas magnéticas deriva de las propiedades intrínsecas de sus núcleos magnéticos combinados con su capacidad de carga del medicamento y las propiedades bioquímicas que pueden ser otorgados a estas por medio de un recubrimiento adecuado.

### 2.3. CLASIFICACIÓN DE LOS MATERIALES MAGNÉTICOS

Desde el punto de vista del comportamiento magnético podemos clasificar los materiales en diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos antiferromagnéticos, ferrimagnéticos (Fig. 2.2).



**Figura 2.2.** (a) Clasificación de los materiales según su comportamiento magnético: paramagnéticos, ferromagnéticos, antiferromagnéticos y ferrimagnéticos. (b) Los materiales superparamagnéticos son observados en los nanomateriales ferro- y ferrimagnéticos que se componen de un sólo dominio magnético

#### 2.3.1. Diamagnetismo

El diamagnetismo se basa en la interacción entre el campo aplicado y los electrones móviles del material [52]. El diamagnetismo se caracteriza por: i) una magnetización débil del material en el sentido opuesto al campo magnético aplicado [53]; ii) una susceptibilidad magnética negativa y pequeña, con permeabilidad relativa ligeramente menor que 1; iii) intensidad de respuesta muy pequeña.

#### 2.3.2. Paramagnetismo

En los materiales paramagnéticos los momentos magnéticos se encuentran desordenados, por lo que no mantiene un momento magnético neto. Estos materiales se caracterizan por i) requerir un gran campo magnético para poder adquirir una alta magnetización; ii) magnetización débil en el

mismo sentido que el campo magnético aplicado; iii) susceptibilidad magnética positiva y pequeña, con permeabilidad relativa ligeramente mayor que 1; iv) intensidad de respuesta muy pequeña. Ejemplos de estos materiales son el Cr, Mn y los gases diatómicos. La Fig. 2.2(a) muestra el ordenamiento magnético de estos materiales.

### 2.3.3. Ferromagnetismo

En los materiales ferromagnéticos los momentos magnéticos individuales de grupos de átomos o moléculas se mantienen alineados entre sí debido a un fuerte acoplamiento, aún en ausencia de campo exterior [54]. Estos grupos se denominan dominios, y actúan como un pequeño imán permanente. En ausencia de campo aplicado, los dominios tienen sus momentos magnéticos netos distribuidos al azar. Cuando se aplica un campo exterior, los dominios tienden a alinearse con el campo. Este alineamiento puede permanecer en algunos casos con un muy fuerte acoplamiento cuando se retira el campo, creando un imán permanente [55]. Los materiales ferromagnéticos se caracterizan por i) una fuertemente magnetización en el mismo sentido que el campo magnético aplicado; ii) susceptibilidad magnética positiva y grande, con permeabilidad relativa mucho mayor que 1; iv) la agitación térmica tiende a desalinear los dominios. A temperatura normal, la energía térmica no es en general suficiente para desmagnetizar un material magnetizado, sin embargo, por encima de la temperatura de Curie [56], el material se vuelve paramagnético, debido a que los efectos térmicos de desorden son mayores que los efectos de alineamiento de la interacción magnética entre dominios. La Fig. 2.2(a) muestra el alineamiento de los materiales ferromagnéticos.

### 2.3.4. Antiferromagnetismo

Los materiales antiferromagnéticos tienen un estado natural en el cual los espines atómicos de átomos adyacentes son opuestos, de manera que el momento magnético neto es nulo [57]. Este estado hace difícil que el material se magnetice, aunque de todas formas adopta una

permeabilidad relativa ligeramente mayor que 1. Por encima de una temperatura crítica, llamada temperatura de Neel, un material antiferromagnético se vuelve paramagnético. La Fig. 2.2(a) esquematiza el ordenamiento magnético de los materiales antiferromagnéticos.

### 2.3.5. Ferrimagnetismo

Los materiales ferrimagnéticos son similares a los antiferromagnéticos, salvo que las especies de átomos alternados son diferentes (por ejemplo, por la existencia de dos subredes cristalinas entrelazadas) y tienen momentos magnéticos diferentes [58]. Existe entonces una magnetización neta, que puede ser en algunos casos muy intensa.

### 2.3.6. Superparamagnetismo.

El superparamagnetismo es una forma de magnetismo observado en los nanomateriales ferro- y ferrimagnéticos que se componen de un sólo dominio magnético [59] (Fig. 2.2(b)). Debido a su tamaño tan pequeño, no hay orden de largo alcance en estos materiales. Estos materiales se caracterizan por: i) alcanzar una magnetización relativamente alta con bajos campos magnéticos aplicados [59]; ii) por debajo de la temperatura Curie los momentos magnéticos dentro de un dominio magnético se alinean paralelamente a un campo aplicado para producir la alta magnetización [59]; iii) después de que un campo magnético aplicado se ha eliminado, no queda magnetización remanente ( $M_r$ ) neta [59]. La falta de  $M_r$  se debe al hecho de que la magnetización de cada dominio fácilmente salta entre dos orientaciones estables, que están separados por una pequeña diferencia de energía. De hecho, la diferencia de energía es tan pequeña que la energía térmica cancela la magnetización total de la partícula. Compuestos de hierro, cobalto y níquel y sus aleaciones, elementos de tierras raras, intermetálicos de gadolinio, oro y vanadio son ferromagnéticos que pueden ser utilizados para producir partículas superparamagnéticas, cuando el tamaño del dominio magnético se encuentra a escala nanométrica. Otros materiales pueden ser utilizados, incluyendo ferritas, compuesto por óxidos

de hierro o con otros elementos como el aluminio, cobre, cobalto, níquel, manganeso, magnesio, hierro y zinc. Además, también se pueden utilizar las ferritas hexagonales.

#### 2.4. FERRITAS HEXAGONALES

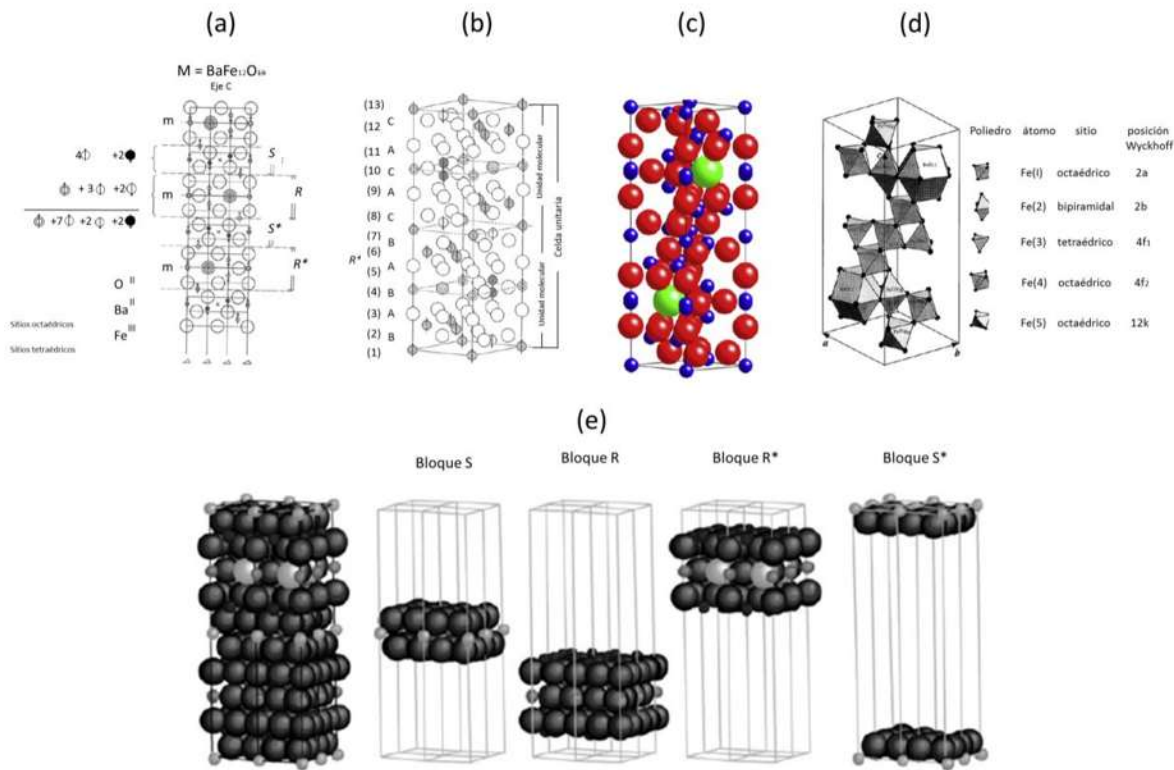
Desde el descubrimiento de las ferritas en la década de 1950 ha habido un gran interés en las ferritas hexagonales, también conocidas como hexaferritas. Este interés, tanto científico como tecnológico ha ido creciendo exponencialmente hasta el día de hoy. Además de su uso como imanes permanentes, las hexaferritas tienen aplicaciones como material de grabación magnética, en almacenamiento de datos y como componentes en dispositivos eléctricos.

Existen diferentes tipos de ferritas hexagonales, indicadas como M, W, X, Y, Z y U, todas ellas con estrechas estructuras cristalinas altamente complejas. De los diferentes tipos de ferritas hexagonales, las hexaferritas de mayor importancia comercial son las tipo M, dentro de las cuales se encuentran las hexaferritas de bario  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  y las ferritas de estroncio con Sr reemplazando al Ba en la misma fórmula. La importancia de estas ferritas es debido a su bajo costo y sus propiedades como estabilidad química, alta resistividad, magnetización de saturación conveniente y alta coercitividad magnética, etc.

La unidad molecular de la ferrita tipo M está formada por un bloque S y un bloque R, con una superposición de capas cúbicas y hexagonales (Fig. 2.3(a)). El plano basal que contiene el átomo de bario es un plano espejo, y los dos bloques S por encima y por debajo del bloque R son por lo tanto rotaciones de  $180^\circ$  alrededor del eje c de cada una. Un bloque R espejo,  $R^*$ , es entonces requerido para continuar la estructura, y es por esta razón que la célula unitaria requiere dos unidades moleculares M, dando la fórmula de celda unitaria  $\text{SRS}^*\text{R}^*$ , donde \* es una rotación del bloque a  $180^\circ$  alrededor del eje c (Fig. 2.3(a)). Los parámetros reticulares de la  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  son 23,17 Å para la longitud del eje c y 5,89 Å para a, la anchura del plano basal, y este parámetro a es constante para todas las hexaferritas de bario. La relación de altura a ancho es de 3,94, por lo que  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  tiene una gran anisotropía cristalina. Las vistas en perspectiva de la estructura son



también mostradas en la Fig. 2.3(b) y Fig. 2.3(c), mientras que los poliedros de la estructura M, incluyendo el sitio bipiramidal del bloque R, se muestran en la Fig. 2.3(d). La Fig. 2.3(e) representa el apilamiento de los bloques R y S en la estructura M.



**Figura 2.3** (a) sección transversal de la estructura de la ferrita tipo M ( $BaFe_{12}O_{19}$ ) Tomado de Robert C. Pullar [60]

## 2.5. METODOS DE SÍNTESIS

### 2.5.1. Síntesis sol-gel

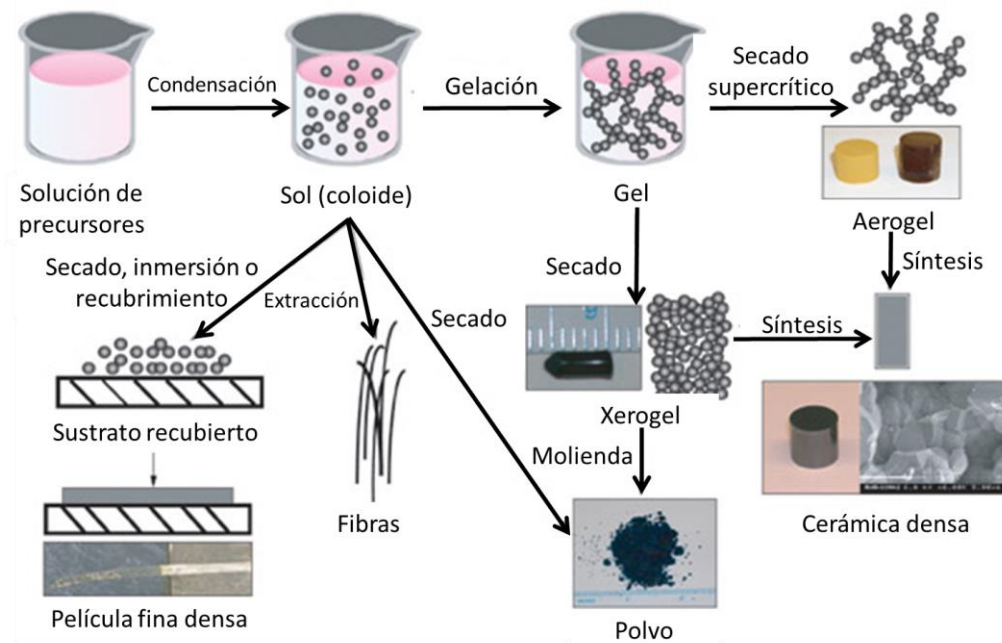
El método sol-gel es un método de síntesis química húmeda, el cual permite la fabricación de una amplia gama de materiales con diversas configuraciones, por ejemplo, fibras, películas delgadas, monolitos y revestimientos. Además, el método sol-gel permite sintetizar materiales híbridos orgánicos-inorgánicos con una gran variedad de aplicaciones potenciales en diversos campos de

la investigación, incluyendo la óptica, electrónica, semiconductores, superconductores y biomateriales. El método sol gel ofrece una serie de ventajas: i) los precursores pueden mezclarse a nivel molecular, lo cual permite la formación de soluciones sólidas del material a temperaturas de procesamiento relativamente bajas cuando se compara con los métodos tradicionales, ii) es un método fácil, sencillo y versátil, iii) permite un control químico y estructural, es decir, la nucleación y crecimiento de las partículas coloidales primarias puede ser controlada para dar partículas con tamaño y forma deseada, además de la composición química deseada.

Actualmente existe una amplia gama de rutas de síntesis derivadas del método sol-gel (Fig. 2.4). En términos simples, el método sol-gel implica dos fases distintas. La primera fase, una suspensión coloidal, la cual es una suspensión estable de partículas sólidas coloidales dentro de un líquido; donde las partículas sólidas deben ser más densas que el líquido de los alrededores y suficientemente pequeñas (2 nm a 1  $\mu\text{m}$ ; lo cual corresponde a  $10^3$ - $10^9$  átomos por partícula) para que las fuerzas responsables de la dispersión sean más grandes que las fuerzas de gravedad. La segunda fase, constituida por un gel, el cual es una red sólida porosa, tridimensionalmente interconectada que forma una entidad continua a lo largo de una fase secundaria, usualmente líquida.

Se han dedicado esfuerzos considerables en el desarrollo de micro y nanopartículas de óxido de hierro, con propiedades magnéticas adecuadas para la investigación biomédica. Las nanopartículas de óxido de hierro son las más ampliamente investigadas en el campo médico y farmacéutico debido a sus excelentes propiedades de biocompatibilidad, estabilidad química y baja toxicidad. El método sol gel es un método fácil y conveniente para sintetizar óxidos de hierro a partir de soluciones acuosas de sales metálicas. Además, el tamaño, la forma y la composición de las partículas magnéticas dependen en gran medida del tipo de precursores utilizados, relación  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , temperatura de reacción, valor de pH y la fuerza iónica del medio. Por lo tanto, el control del proceso mediante estos parámetros, es esencial en la producción

partículas monodispersas de óxido de hierro El método sol-gel parte de una suspensión coloidal (sol) y la subsiguiente formación del (gel). En la preparación del sol, los precursores, tanto orgánicos como inorgánicos, experimentan reacciones de hidrólisis y condensación (o polimerización) para formar pequeñas partículas sólidas en un líquido (ya sea un solvente orgánico o acuoso). Las partículas sólidas son tan pequeñas (1-1000 nm) que las fuerzas gravitacionales son despreciables y las interacciones están dominadas por fuerzas estéricas, de van der Waals y Coulombicas.



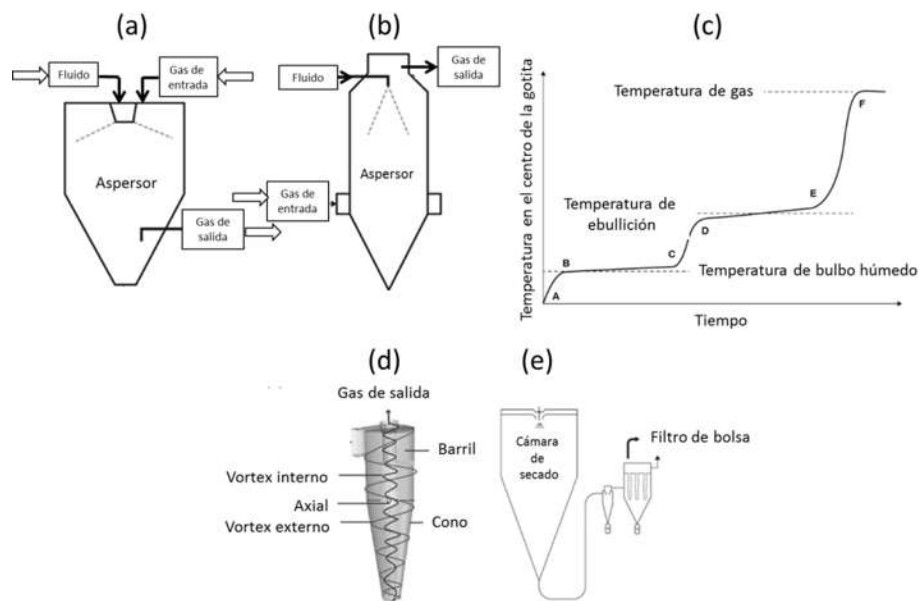
**Figura 2.4.** Rutas de síntesis derivadas del método sol-gel. Tomado de <https://str.llnl.gov/str/May05/Satcher.html>

Varios grupos de investigación [61-63] han descrito la síntesis de partículas magnéticas nanoestructurados de base de óxido de hierro a partir del método sol-gel para aplicaciones en el control de liberación de fármacos.

Los avances en nanotecnología y ciencia de los materiales sugieren que algunos de los problemas actuales de los materiales podrían ser resueltos o al menos mejorados mediante la modificación superficial.

### 2.5.2. Secado por aspersión

El secado por aspersión es un método que permite la conversión continua de fluidos (soluciones, emulsiones, suspensiones, mezclas, pastas) en polvos sólidos mediante un proceso de secado dirigido a diseñar y producir materiales con un gran potencial para diversos sectores industriales, tales como la industria química, cosmética, alimentaria y farmacéutica. Este proceso es un método rápido, simple, sencillo, de escalabilidad industrial y bajo costo. El principio del método se basa en la eliminación de la humedad mediante la aplicación de calor al fluido alimentado. El secado por aspersión consiste de tres etapas principales: (a) atomización del fluido, (b) vaporización o secado del líquido mediante una corriente de gas y (c) separación y recolección de las partículas.



**Figura 2.5.** Configuración del equipo de secado por aspersión: (a) secador por aspersión concurrente, misma dirección de flujo y (b) secador por aspersión a contracorriente. (c) Evolución de la temperatura en el proceso de secado en una gotita líquida [Handscorn y cols.]. En la separación y recolección del polvo se pueden emplear: (d) separadores tipo ciclón y/o (e) filtros de bolsa.

### *a. Atomización*

La atomización es el primer paso que experimenta el fluido alimentado durante el secado por aspersión, la cual involucra el rompimiento del líquido a granel en un número grande de gotitas impulsado por el proceso de secado por aspersión mediante la reducción de la resistencia interna a la transferencia de humedad desde la gotita hasta el medio de los alrededores. La atomización es una etapa crítica en el proceso de secado, debido a su influencia en la forma, estructura, velocidad y distribución de la gotita generada y, por lo tanto, la naturaleza y tamaño de partícula del producto final. Consecuentemente, hay una pérdida mínima de calor sensible y, eventualmente, se producen las partículas con las características físicas y morfológicas deseadas. La Fig. 2.5 presenta el diagrama de dos tipos de secadores por aspersión: (Fig. 2.5(a) secador por aspersión concurrente y (Fig. 2.5(b) secador por aspersión a contracorriente.

### *b. Vaporización*

En esta etapa, se constituye la formación de fase de la partícula. Con el líquido a granel atomizado en pequeñas gotas, el siguiente paso involucra el contacto íntimo de la gotita con el gas acarreador. Esto permite la rápida evaporación de la humedad de la superficie de todas las gotitas de una manera uniforme. Aquí, el requerimiento es un flujo de gas uniforme en la cámara de secado. Las gotas usualmente se encuentran en contacto con aire caliente en la cámara de secado, ya sea en la misma dirección de flujo o a contracorriente.

El paso más crítico en la formación de la partícula involucra la evaporación de la humedad, ya que este paso está asociado con la formación del producto final. La evaporación de la humedad durante el proceso de secado puede ser visualizada en dos fases: un periodo de velocidad constante y un periodo de caída de velocidad. Inicialmente, cuando la gotita está expuesta a una corriente de gas caliente, la rápida evaporación toma lugar. Durante esta exposición, la gotita se calienta desde una temperatura inicial ( $T_0$ ) a la temperatura de evaporación de equilibrio ( $T_{eq}$ )

(Fig. 2.5(c)-AB). Durante este periodo, la eliminación de la humedad sigue la curva del periodo de velocidad constante a medida que la humedad es removida constantemente a partir de la superficie de la gotita manteniendo el enfriamiento suficiente. La superficie de la gotita permanece saturada con la humedad en esta fase y su temperatura es constante e igual a la temperatura de bulbo húmedo (Fig. 2.5(c)-BC). A medida que se elimina la humedad de la gotita, el soluto disuelto en el líquido alcanza una concentración más allá de su concentración de saturación y tiende a formar una coraza delgada en la superficie de la gotita descrita como formación de coraza. El comienzo de formación de coraza es una característica cinética importante del proceso de secado por aspersión. Después de esta fase, la eliminación de la humedad regresa al proceso de difusión controlada, y la velocidad de evaporación es dependiente de la velocidad de difusión de vapor de agua a través de la coraza superficial. Esto constituye el periodo de caída de velocidad. Durante el periodo de caída de velocidad, aunque la partícula comenzará a calentarse (Fig. 2.5(c)-CD), es casi la parte más fría del equipo de secado, donde el gas de secado está en o cerca de la temperatura de salida del equipo de secado.

### *c. Separación y recolección*

Los sistemas empleados para la separación y recolección del producto final incluyen separadores tipo ciclón (Fig. 2.5(d)) y/o filtros de bolsa (Fig. 2.5(e)).

El diseño e ingeniería de micro y nanopartículas a través del secado por aspersión ha sido investigado como una alternativa de proceso de manufacturación en la industria farmacéutica debido a su amplia aplicabilidad. El secado por aspersión ha sido exitosamente usado en la industria farmacéutica para producir productos con propiedades físicas y químicas definidas, por ejemplo, tamaño y forma de partícula controlada, para incrementar la solubilidad del fármaco y la biodisponibilidad de las sustancias activas. Además, el ajuste de los parámetros del proceso de secado por aspersión permite la manipulación de varias propiedades de la partícula, con respecto a los requerimientos de la aplicación deseada.

## 2.6. ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE LA SÍNTESIS Y APLICACIÓN DE MATERIALES NANOESTRUCTURADOS A BASE DE OXIDO DE HIERRO COMO SISTEMAS DDS.

Como se mencionó anteriormente, los biomateriales han llegado a ser una de las áreas más atractivas en la investigación científica y tecnológica para el desarrollo de dispositivos con aplicaciones biomédicas sorprendentes tal como ocurre con los sistemas de liberación de fármaco. Diversos biomateriales han sido investigados como DDS incluyendo dendrímeros, micelas, liposomas, polímeros y partículas magnéticas. A este respecto, Szulc y colaboradores [64] han estudiado dendrímeros de poli(propileno imina) modificados con azúcar como DDS para liberación de citarabina. Mientras, Song y colaboradores [65] han estudiado un sistema DDS micelar termosensible exitosamente cargado con Doxorubicina (DOX) cuya eficiencia de carga fue de 17%. Por otra parte, Vahed y colaboradores [66] han estudiado un sistema DDS basado en liposomas enfocándose en estrategias de quimioterapia combinada para la co-liberación de dos fármacos quimioterapéuticos, un agente quimioterapéutico con metales anticancerígenos y un agente quimioterapéutico con agentes génicos. Duggan y colaboradores [67] han estudiados polímeros tiolados como DDS mucoadhesivos.

Actualmente los sistemas nanoestructurados de partículas magnéticas han ganado atención considerable como DDS debido a su biocompatibilidad, fácil modificación superficial y sus propiedades físicas, químicas y magnéticas únicas. Oka y colaboradores [68] estudiaron un compuesto núcleo-coraza para liberación localizada de fármaco. El compuesto está estructurado por un núcleo de polímero biodegradable y una coraza de nanopartículas de óxido de hierro, preparado a partir de una emulsión Pickering. Además, estudiaron la capacidad de carga del sistema núcleo-coraza cargando partículas de pireno cuya presencia fue confirmada mediante un análisis de fluorescencia después de ser expuestas a rayos UV. Además, la caracterización morfológica del sistema núcleo-coraza fue estudiada por SEM y TEM. Las propiedades cristalográficas se estudiaron mediante XRD. Finalmente, se estudiaron sus propiedades magnéticas usando un sistema de medición de propiedades físicas (Quantum Desing).

Por otra parte, Chandra y colaboradores [69] estudiaron un compuesto dendrimero-nanopartículas magnéticas como un vehículo de liberación enzimática de fármaco, sensible a estímulos simples. El sistema fue caracterizado por diferentes técnicas microestructurales y espectroscópicas. Ellos obtuvieron partículas mesoporosas con propiedades superparamagnéticas. Además, exploraron su uso en la liberación de DOX alcanzando una alta eficiencia (superior a 95%) con velocidades de liberación controlada bajo pH y temperatura sostenida. La interacción química entre la DOX y las nanopartículas fue confirmada por un cambio en el potencial zeta y una disminución en la intensidad de fluorescencia. Otros estudios sobre DDS basados en nanopartículas magnéticas pueden ser encontrados en la literatura [70-74].

Los sistemas DDS pueden ser diseñados con gran variedad de diferentes morfologías, las cuales han sido reportadas en la literatura [75]. Estas morfologías incluyen partículas esféricas completamente densas, partículas rugosas, partículas huecas, partículas tipo dona y partículas porosas. Estas últimas muestran características notables, sobre todo, aquellas partículas con una jerarquía macro-mesoporosa ya que exhiben alta área superficial, baja densidad y buena estabilidad fisicoquímica. Además, dichos materiales pueden incrementar considerablemente la capacidad de carga de un fármaco, debido a que proporcionan una interconectividad que mejora la difusión o flujo de fluidos, a la vez que aumentan considerablemente el área superficial específica. Por lo tanto, estos sistemas aumentan la capacidad para que las moléculas puedan ser adsorbidas.

Muchos estudios sobre sistemas nanoestructurados (macro/meso)porosos han sido reportados en la literatura. Por ejemplo, Liu y colaboradores [76] estudiaron materiales magnéticos macroporosos silíceos ordenados tridimensionalmente, los cuales fueron fabricados por la combinación de una co-sedimentación simple de un sistema coloidal binario de esferas de PMMA y partículas de magnetita, y la infiltración de precursores de silicio. A partir de la caracterización por SEM y TEM, establecen que los materiales macroporosos presentan una estructura de empaquetamiento cúbico centrado en las caras (fcc) con macroporos del orden de 200 nm. Además, la caracterización magnética mostró que los materiales poseen una alta magnetización (19,2 emu/g) y comportamiento superparamagnético.



Por otra parte, Santamaría y colaboradores [77] sintetizaron un sistema estructurado meso-macroporoso de sílice para liberación controlada de ibuprofeno (IBU). El sistema fue sintetizado usando una emulsión W/O usando decano como fase dispersa. Los materiales obtenidos fueron caracterizados por TEM, SEM, dispersión de difracción de rayos x a bajo ángulo (SAXS) e isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos mostraron que la carga del IBU incrementa a medida que la presencia de macroporos en el material incrementa. Esto último lo atribuyen suponiendo que los macroporos permiten que el fármaco acceda a los poros internos. Pero establecen que cuando únicamente mesoporos estuvieron en el material, el IBU fue probablemente adsorbido únicamente sobre los mesoporos únicamente cercanos a la superficie. Más aun, señalan que mientras más cantidad de macroporos están presentes en el material, más bajo fue el comportamiento de liberación del IBU debido a que el ibuprofeno adsorbido en los poros internos tiene que difundirse a lo largo de los canales macroporos hasta la superficie del material.

Una amplia gama de métodos han sido estudiados para la síntesis de sistemas magnéticos nanoestructurados, siendo los métodos químicos los mayormente usados; entre estos métodos, la técnica sol-gel sobresale debido a ventajas tales como el uso temperaturas de procesamiento relativamente bajas comparadas con los métodos tradicionales, la facilidad, sencillez y versatilidad del método, el control sobre el tamaño y morfología del material, y la obtención de materiales relativamente puros. Por ejemplo, Anjaneyulu y Vijayalakshmi [82] fabricaron un compuesto [HAP: (Ca)<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>]/ magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) derivado del método sol-gel sobre una aleación Ti-6Al-4V. El compuesto fue caracterizado por XRD, SEM-EDAX y mediciones de ángulo de contacto. Además, realizaron un estudio de bioactividad in vitro el cual conformo que el Ti-6Al-4V revestido por el compuesto fue altamente bioactivo e indujo la formación de apatita en la presencia de las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Por lo tanto, su estudio sugiere que los implantes recubiertos con HAP/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> pueden ser usados para aplicaciones biomédicas. Además, una revisión detallada sobre materiales para aplicaciones biomédicas sintetizados por el método sol-gel es proporcionada por G. J. Owens y colaboradores [83] en la revista Progress in Materials Science publicada en 2016. Los materiales sintetizados por este método incluyen los materiales a

base de sílice, materiales a base de fosfatos, materiales a base de metales (Fe–O, Ti–O, Zn–O, etc.) y materiales híbridos orgánicos-inorgánicos.

El aumento en el número de artículos publicados en una gran variedad de revistas científicas dirigidas al diseño, síntesis e ingeniería de una amplia gama de materiales con diversas formulaciones, por ejemplo, los liposomas, dendrímeros, micelas, partículas poliméricas y materiales magnéticos nanoestructurados, revela que el área biomédica ha llegado a ser un área de gran interés debido al potencial de estos materiales para ser usados en una gran variedad de aplicaciones, tal como agentes de contraste para MRI, tratamiento de cáncer mediante hipertermia y como DDS.

Dentro de los materiales más prominentes para este tipo de aplicaciones se encuentran los materiales magnéticos a base de óxido de hierro, dentro de los cuales podemos incluir a los sistemas nanoestructurados de hexaferrita de bario ( $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ) diseñados y sintetizados en el presente trabajo de investigación. La relevancia de estos materiales se basa en su biocompatibilidad, aprobados por la *Federal Drug Administration* (FDA) para su uso biomédico. Una ventaja de los materiales porosos, en especial aquellos materiales con una jerarquía macro-mesoporosa, tal es el caso de los sistemas de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  sintetizados aquí, es la presencia de una arquitectura que exhiba alta área superficial, baja densidad y buena estabilidad fisicoquímica, lo cual reflejaría un incremento considerable en la capacidad de carga de moléculas con actividad biológica, usadas como fármaco modelo, ya sea de naturaleza hidrofóbica o hidrofílica. Además, mediante la aplicación de un campo magnético externo, las propiedades magnéticas pueden ser aprovechadas para dirigir y focalizar el fármaco a un sitio específico de acción, logrando un perfil de liberación controlado. Por lo tanto, la concentración y número de dosificaciones del fármaco se reduciría, lo cual se vería reflejado en la disminución de efectos secundarios no deseados en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer.

## CAPÍTULO 3

---

---

### DESARROLLO EXPERIMENTAL

## CAPÍTULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En el presente capítulo se describe el procedimiento experimental llevado a cabo durante el trabajo de investigación. La Fig. 3.2 muestra las tres etapas principales que constituyen el procedimiento experimental para el estudio de los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ : I) Diseño (Fig. 3.1) y Síntesis, II) Caracterización y III) Pruebas biológicas. La Tabla 3.I muestra los factores a evaluar en el diseño experimental fraccionario  $2^f$ .

### 3.1. MATERIALES INICIALES

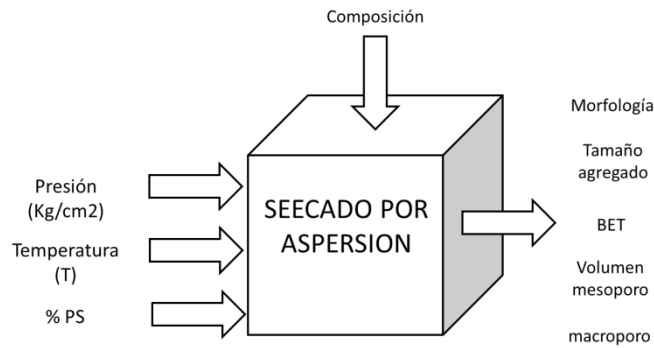
Se usaron productos comerciales grado reactivo sin purificación alguna. Los reactivos usados para la síntesis de la hexaferrita de bario fueron marca Sigma-Aldrich. Nitrato de hierro (III) noahidratado  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , carbonato de bario  $\text{BaCO}_3$  e hidróxido de amonio. El surfactante utilizado fue el Tween 20 (Merck). El surfactante hidrofílico no-iónico Tween 20 ( $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ ) es un éster de polioxietileno sorbitan (con un peso molecular calculado de 1225 Daltones asumiendo 20 unidades de óxido de etileno, 1 sornitol y un ácido láurico como ácido graso primario. Microesferas de poliestireno (PS) monodispersas sintetizadas en el laboratorio fueron usadas como agente porógeno o agente formador de poro.

La primera etapa establece el diseño y síntesis de agregados esféricos nanoestructurados de hexaferrita de bario de tamaño micrométrico con jerarquía macro-mesoporosa (de aquí en adelante llamados simplemente agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ). En esta etapa, un diseño factorial  $2^f$  fue usado para diseñar y evaluar los efectos de la temperatura ( $T$ ), presión ( $P$ ) y concentración de agente porógeno (% en peso) en el método de síntesis sol-gel acoplado a secado por aspersión. La síntesis sol-gel se inició con el uso de nitrato de hierro (III) noahidratado  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  y carbonato

de bario  $\text{BaCO}_3$  como sales precursoras, las cuales son disueltas en agua desionizada. A su vez, Tween 20 se usó como surfactante para permitir la creación de la estructura mesoporosa.

La mezcla de sales precursoras + Tween 20 se agitó por 30 min mediante agitación magnética, modificando el pH a 8 usando  $\text{NH}_4\text{OH}$ . A continuación se agregó una suspensión acuosa de esferas de poliestireno (PS) usada como agente porógeno con una concentración de 30% o 50% de acuerdo al diseño factorial  $2^f$ . La suspensión resultante se sometió al proceso de secado por aspersión donde se evaluaron los parámetros de temperatura ( $T$ , °C) y presión ( $P$ ,  $\text{Kg/cm}^2$ ) de acuerdo a los valores del diseño factorial  $2^f$ . Como resultado se obtuvo un compuesto cerámico/polímero el cual fue sometido a un tratamiento térmico a temperaturas de 700 °C hasta 1000 °C para obtener el material macro-mesoporoso con estructura y morfología deseada.

La segunda etapa se enfoca en la caracterización. Esta etapa del proceso aborda las técnicas de caracterización estructural, morfológica, física, química y magnética de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . Difracción de rayos X (XRD) fue usada para determinar la estructura y cristalinidad de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . Microscopía electrónica de barrido (SEM) fue usada para determinar la morfología y tamaño de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ; además de caracterizarlos químicamente mediante análisis EDS y mapeo químico. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) fue usada para determinar la morfología y estructura de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  usando las modalidades de campo claro (BF), campo oscuro (DF), alta resolución (HRTEM), barrido-transmisión (STEM) en su modalidad de campo oscuro anular (STEM-ADF) y difracción electrónica de área selecta (SAEDP). Determinación de área superficial específica BET mediante adsorción/desorción de  $\text{N}_2$ . Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), Potencial zeta  $\zeta$ , El Magnetómetro de muestra vibrante (VSM) fue usada para determinación de las propiedades magnéticas (saturación magnética  $M_s$ , remanencia magnética  $M_r$  y coercitividad  $H_c$ ). La tercera etapa evalúa las pruebas biológicas. Los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  se evaluaron como DDS al probar su capacidad de carga usando el péptido DS como fármaco modelo. El péptido DS se sintetizó a partir de los plásmidos pF1A T7 Flexi®, pFN21K y pFN18K empleando la cepa T7 de *Escherichia coli*. A su vez, isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) se usó para inducir la producción del péptido.



**Figura 3.1.** Diseño experimental fraccionario  $2^f$ . Las variables de entrada son la presión ( $P$ ), Temperatura ( $T$ ) y porcentaje de agente porógeno (%PS). Las variables de respuesta son la morfología y tamaño de agregado, área superficial BET, volumen de mesoporo y tamaño de macroporo.

**Tabla 3.I.** Factores a evaluar en el diseño experimental: A) Presión ( $P$ ), B) Temperatura ( $T$ ) y C) Concentración de poliestireno usado como agente porógeno (%PS). Cada uno de los parámetros presenta un nivel bajo (-) y un nivel alto (+).

Factor	Parámetro	Nivel	
		Bajo (-)	Alto (+)
A	$P$ (Kg/cm <sup>2</sup> )	1.5	2
B	$T$ (°C)	180	200
C	%PS	30	50

Los diseños factoriales se usan ampliamente en experimentos que incluyen varios factores cuando es necesario estudiar el efecto conjunto de los factores sobre una respuesta. El diseño  $2^f$  es de particular importancia, ya que proporciona el menor número de corridas con las que pueden estudiarse  $f$  factores en un diseño factorial completo.

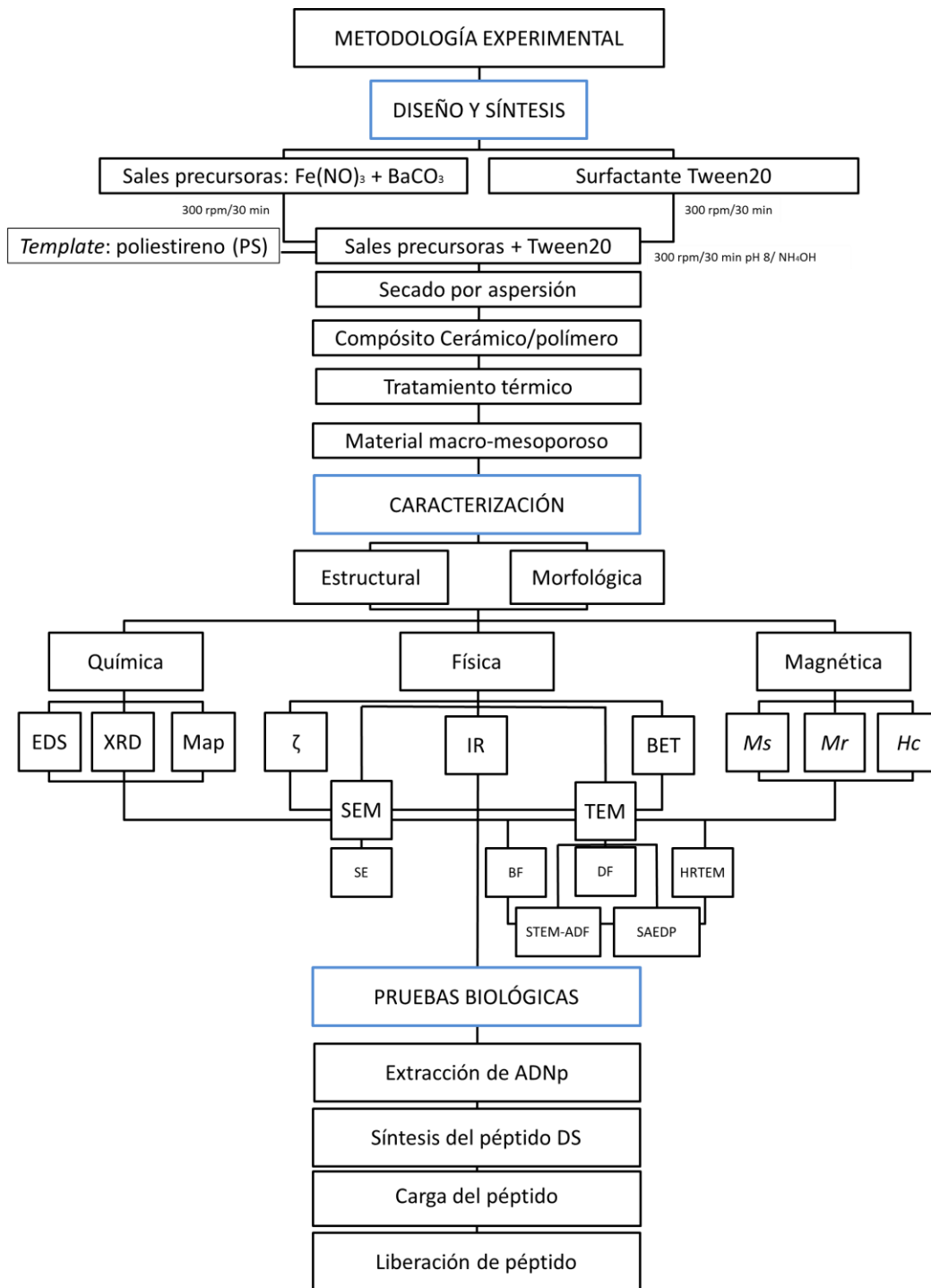
El resultado total del diseño factorial  $2^f$  es representado en la Tabla 3.II. El nivel alto para cada factor está representado por el símbolo más (+), mientras el símbolo menos (-) representa el nivel bajo. Los resultados del diseño factorial de dos factores pueden ampliarse en el caso general en que hay  $a$  niveles del factor  $A$ ,  $b$  niveles del factor  $B$  y  $c$  niveles del factor  $C$ , dispuestos en un experimento factorial. En general, habrá  $abc...n$  observaciones totales si se hacen  $n$  réplicas del

experimento completo. Es necesario un mínimo de dos replicas ( $n \geq 2$ ) para determinar una suma de cuadrados debida al error si todas las interacciones posibles están incluidas en el modelo.

Cuando todos los factores del experimento son fijos, es sencillo formular y probar hipótesis acerca de los efectos principales y las interacciones

**Tabla 3.II.** Matriz del diseño experimental.

	A	B	AB	C	AC	BC	ABC
(1)	-	-	+	-	+	+	-
a	+	-	-	-	-	+	+
b	-	+	-	-	-	-	+
ab	+	+	+	-	-	-	-
c	-	-	+	+	-	-	+
ac	+	-	-	+	+	-	-
bc	-	+	-	+	+	+	-
abc	+	+	+	+	+	+	+



**Figura 3.2.** Diagrama de flujo que muestra las etapas principales en el desarrollo experimental en la síntesis de agregados nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ : i) Diseño y Síntesis, ii) Caracterización y iii) pruebas biológicas.



### 3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL FRACCIONARIO $2^f$

El diseño del sistema de los agregados esféricos nanoestructurados macroporosos de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  fue llevado a cabo usando un diseño factorial  $2^f$ . El término  $2^f$  mide la cantidad de condiciones experimentales, siendo  $f$  el número de factores a evaluar. En este caso particular, cada factor presenta dos niveles, lo cual está representado por el número 2 en el término  $2^f$ . El diseño permitió evaluar el efecto de los parámetros del secado por aspersión tales como la presión del aire ( $P$ ,  $\text{Kg}/\text{cm}^2$ ) y la temperatura de entrada ( $T$ ,  $^{\circ}\text{C}$ ). Así también como la concentración del porógeno (%) en el tamaño y volumen de los aglomerados esféricos obtenidos en el proceso de secado por aspersión.

### 3.3. SÍNTESIS DE AGREGADOS DE $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$

Las esferas de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  fueron sintetizadas por el método sol-gel asistido por surfactantes y agentes porógenos. Durante la síntesis, dos suspensiones fueron preparadas: la primera, compuesta por las sales de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{BaCO}_3$ , las cuales fueron disueltas en agua desionizada y agitadas magnéticamente con una relación molar estequiometría; la segunda, formada por el surfactante Tween 20 en solución acuosa. Ambas suspensiones fueron mezcladas con agitación magnética constante. Durante el proceso de reacción, el pH de la suspensión fue ajustado a 8.0 usando  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Una tercera suspensión compuesta por esferas de poliestireno dispersas en agua desionizada fue adicionada a la mezcla con agitación magnética constante por 1 h, variando la concentración de acuerdo al diseño experimental.

La mezcla coloidal resultante fue alimentada a una cámara de secado tubular de un equipo Mini Spray Dryer (Yamato, ADL31) a través de un flujo concurrente de aire caliente como gas acarreador. El proceso de secado fue iniciado por la generación de pequeñas gotas a partir de la suspensión coloidal seguida por la atomización del líquido a una temperatura y presión variando de acuerdo al diseño experimental, resultando en la producción de polvos (xerogeles) compuestos de partículas sólidas. Finalmente, el polvo fue recolectado mediante un ciclón y sometido a un

tratamiento térmico para la eliminación total de los agentes orgánicos, surfactante y el agente porógeno, la eliminación total de agua estructural, la formación de óxidos y la cristalización de los mismos. Cuatro diferentes temperaturas de tratamiento isotérmico fueron evaluadas: 700, 800, 900 y 1000 °C a una velocidad de calentamiento de 3 °C/min por 2 h, con el objeto de seguir la cristalización y la formación de las fases de hexaferrita de bario, así como la evaluación de la microestructura y de las propiedades magnéticas en función de la temperatura de tratamiento térmico.

### 3.4. CARACTERIZACIÓN

#### 3.4.1. Difracción de rayos X

Las fases y estructuras cristalinas de la  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  fueron analizadas por difracción de rayos x en un difractoro Bruker modelo D8 Advance, usando radiación  $\text{Cu K}\alpha$  (45 KV, 30 mA). Las muestras analizadas fueron escaneadas en un rango  $2\theta$  a partir de 20 a 80 °, y una amplitud de paso constante de 0.02°.

#### 3.4.2. Microscopía electrónica de barrido

La caracterización estructural y morfológica de la  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  fue llevada a cabo en un microscopio electrónico de barrido (SEM) de emisión de campo JEOL JSM-7600F, así como su caracterización química usando la técnica de espectroscopía de división de energía de los rayos característicos (EDS). El tamaño de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  fue determinado a partir de imágenes de SEM mediante la medición y análisis estadístico de los datos usando el programa Lince linear intercept (Verfügbare Software).

### 3.4.3. Microscopía electrónica de transmisión

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) de emisión de campo FEG Phillips Tecnai F20 fue usado para la obtención y estudio de la cristalinidad de las esferas de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ , usando las técnicas de difracción de área selecta (SAEDP), alta resolución (HRTEM) y microscopía electrónica de barrido-transmisión (STEM) en su modalidad de campo oscuro anular (STEM-ADF). Para su observación por TEM, 1.0 mg del polvo obtenido después del secado por aspersión y calcinado a 700 °C, se dispersó en 1.0 mL de etanol (Sigma-Aldrich) en un tubo para micro-centrifuga de 1.5 ml (Eppendorf). Después la solución se dispersó usando un equipo limpiador de vibración ultrasónica Branson 1510 (42 KHz a 70 W) por 30 min. Con ayuda de un capilar, una gota de la suspensión homogénea se depositó sobre una rejilla de cobre de 300 mesh previamente recubierta con colodión y una película delgada de carbón. La rejilla se secó a temperatura ambiente por toda la noche. El análisis y procesamiento computacional de las imágenes de TEM, así como la obtención de su transformada rápida de Fourier (FFT), se analizaron con el software Digital Micrograph de la compañía Gatan. Tomando en cuenta las posiciones xyz reportadas para la  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  con grupo espacial P3/mmc [47], se simuló computacionalmente las imágenes de HRTEM. Para esto, se creó la celda a una supercelda de 4x4x4 celdas con el programa Diamond Crystal and Molecular Visualization [48] y se simuló las imágenes de TEM en el programa Simulatem [49]. Las condiciones para la simulación fueron: 200 Kv, Cs de 1.2 mm y foco de Scherzer -54.85 nm.

### 3.4.4. Isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno

Las isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno a 77 K fueron obtenidas en un instrumento Quantachrome. Antes de su análisis, las muestras (0.14 – 0.38 g) fueron colocadas en un tubo bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  y entonces degasificadas por 4 h a 100 °C. Además, la distribución de tamaño de mesoporo fue medida mediante la técnica Barrett-Joyner-Halenda (BJH).

### 3.4.5. Espectroscopía infrarroja

Las mediciones de espectroscopía infrarroja (IR) fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente (46% HR) en un espectrofotómetro con Transformada de Fourier Marca Bruker Modelo Tensor 27. Los espectrogramas fueron obtenidos en un rango de longitud de onda de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  (tiempo de escaneo 32 scans) con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros fueron obtenidos a partir de muestras en polvo con una corrección de línea base y suavizado usando el software Tensor.

### 3.4.6. Propiedades magnéticas

El análisis de las propiedades magnéticas de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  fueron llevadas a cabo usando un magnetómetro de muestra vibrante (VSM LDJ 9600) a temperatura ambiente aplicando un campo magnético constante de 5000 Oe. Los valores de saturación magnética ( $M_s$ ), magnetización remanente ( $M_r$ ) y coercitividad ( $H_c$ ) fueron obtenidos a partir de la curva de histéresis.

### 3.4.7. Potencial zeta $\zeta$

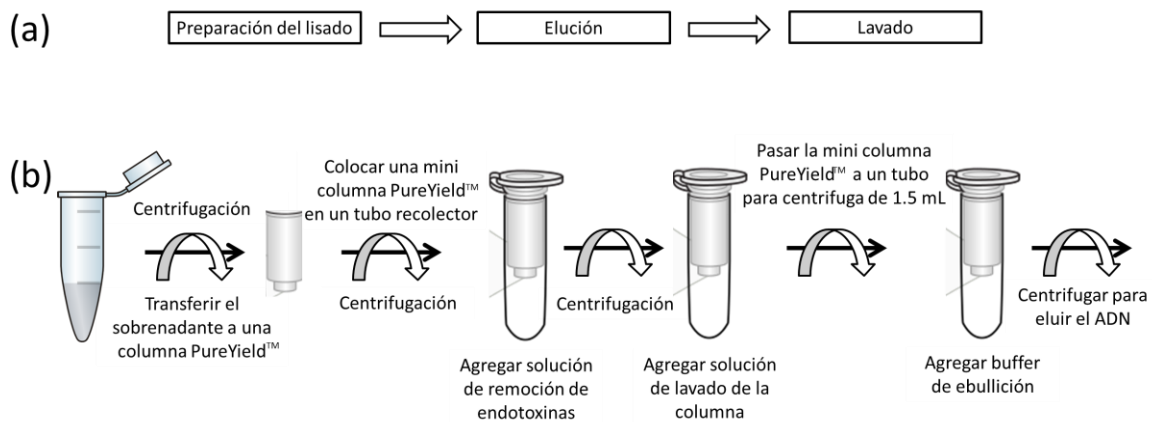
Las mediciones de potencial zeta de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  fueron obtenidos usando un equipo ZetaMeter (Zetasizer, Modelo Malverin 300 HSA). Se prepararon diferentes suspensiones de polvo de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  (0.011g) en 20 mL de agua destilada. Para cada suspensión el valor de pH fue modificado a valores ácidos y básicos, desde 2.0 hasta 10.0, usando como modificadores de pH ácido nítrico,  $\text{HNO}_3$ , e hidróxido de amonio,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , respectivamente.

## 3.5. PRUEBAS BIOLÓGICAS

### 3.5.1. Extracción de ADN plasmídico

La Fig. 3.3 muestra el diagrama de extracción de ADN plasmídico. Las etapas principales en la extracción de ADNp incluye la preparación del lisado, lavado y elución (Fig. 3.3(a)). El plásmido

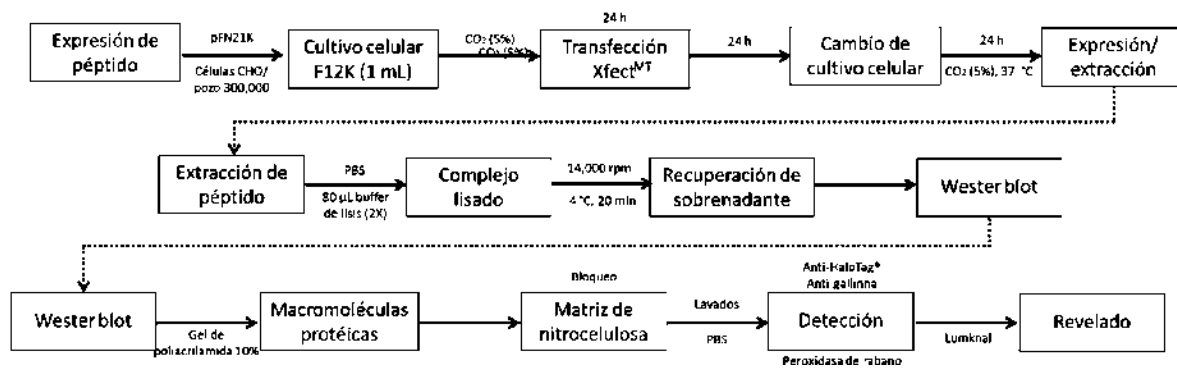
recombinante presente en la cepa T7 Express Iq Competent de *Escherichia coli* [MiniF laqIq(CamR)/fhuA2 lacZ::T7 gene1 [Ion] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10—Tets)2[dcM] R(zgb-210::Tn10—Tets) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10] fue aislado de acuerdo a las instrucciones del Kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Fig. 3.3(b)). 3.0 μL de ADN + 1.0 μL de buffer de carga fueron cargados en un gel de agarosa al 0.8%, para determinar la presencia del plásmido mediante electroforesis. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V por 30 min. El gel fue analizado en un Fotocodificador EL LOGIC 200.



**Figura 3.3.** Extracción de ADN plasmídico: (a) Pasos generales en la extracción de ADNp y (b) procedimiento del Kit Pure Yield™ Plasmid Miniprep System

### 3.5.2. Síntesis del péptido DS

La Fig. 3.4 muestra el diagrama general de síntesis del péptido DS. El Diagrama incluye los pasos desde la expresión del péptido hasta su detección y revelado con luminol.



**Figura 3.4.** Diagrama de síntesis del péptido DS a partir del plásmido pFN21K. El Diagrama incluye los pasos desde la expresión del péptido hasta su detección y revelado con luminol, en un análisis tipo Western.

#### a. Síntesis a partir del plásmido pF1A T7 Flexi®

Un pre-inóculo de *E. coli* fue preparado tomando una asada de la cepa T7 – modificada para sintetizar el péptido pF1A T7 Flexi® – la cual se inocula en 3.0 mL del medio de cultivo Luria-Bertani (LB). El cultivo fue incubado a 37 °C por 18 h en agitación a 150 rpm. La inducción se llevó a cabo distribuyendo 200 µL de pre-inóculo + 20 µL de ampicilina (100 µg/mL) en 20 mL de LB. El medio de cultivo fue incubado hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.4 – 0.6. Los valores de DO fueron medidos en un Espectro Cary 50 Probe UV-vis usando una longitud de onda  $\lambda = 600$  nm. Una vez alcanzada la DO, diferentes concentraciones de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) fueron agregadas para inducir la concentración del péptido. La concentración de IPTG fue calculada usando la Ecuación 1. La inducción se incubó a 37 °C por 3 h. 1.0 mL de la inducción fue tomado y centrifugado a 13000 rpm por 1 min., el sobrenadante fue descartado y fueron agregados al sedimento 100 µL de buffer de lisis. La muestra se hirvió por 10 min. 5.0 µL de muestra fueron cargados en un gel de poliacrilamida para determinar la expresión del péptido de interés. La muestra fue tratada con dodecil sulfato de sodio (SDS,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$ ) La electroforesis se llevó a cabo a 200 V por 40 min.

El fundamento de la electroforesis se basa en el movimiento de las partículas cargadas en un campo eléctrico, hacia un electrodo con carga opuesta. El anión del SDS se une con fuerza a las

proteínas por adsorción no específica; cuanto mayor es la proteína, más cantidad del anión adsorberá. El SDS desnaturaliza por completo a las proteínas, rompiendo todas las interacciones no covalentes. Como resultado, las proteínas adquieren una carga negativa a consecuencia de la adsorción del anión  $\text{SO}_3^-$ . La movilidad de las macromoléculas depende de su carga, forma y tamaño. Sin embargo, dado que todas las proteínas de la muestra tienen casi la misma forma y carga, el tamaño de las proteínas se convierte en el factor determinante para su separación.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

**Ecuación 3.1**

donde:

$C_1$  = concentración de IPTG deseada

$V_1$  = volumen del medio LB

$C_2$  = concentración del stock de IPTG

$V_2$  = volumen necesario de IPTG para alcanzar la concentración deseada

#### *b. Síntesis a partir del plásmido pFN21K*

Con el objetivo de llevar a cabo la expresión y producción de proteínas recombinantes, células derivadas de ovario de hámster chino, *Cricetulus griseus* (células CHO) fueron transferidas con el vector pFN21K construido especialmente para expresar el péptido deseado. 300 000 células CHO/pozo fueron sembradas en placas de seis pozos para cultivo celular en 1 mL de medio de crecimiento completo (F-12K), e incubadas a una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  y a 37 ° C. 24 horas después, las células CHO se transfectaron haciendo uso del kit Xfe<sup>TM</sup> Transfection Reagent, siguiendo las instrucciones del fabricante y empleando 5  $\mu\text{g}$  de plásmido. El cultivo celular transfectado fue incubado durante 24 h en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  y a 37 ° C, después de los

cuales el medio fue sustituido por medio celular nuevo y se incubó a las mismas condiciones de CO<sub>2</sub> y temperatura. Se verificó la transfección positiva de las células CHO y se procedió a la extracción de proteína total. Las células CHO fueron lavadas dos veces con PBS frío estéril, a continuación fueron añadidos a cada pozo 80 µL de buffer de lisis con una concentración final de 2X. El complejo lisado fue recuperado en tubos de 1.5 mL y la proteína se centrifugó a 14,000 rpm a 4 °C por 20 min. El sobrenadante fue recuperado. Un análisis tipo Western blot fue utilizado para verificar la expresión del péptido con ayuda de anticuerpos monoclonales. El primer paso de este análisis consistió en la separación de macromoléculas proteicas mediante geles de poliacrilamida al 10%. Posteriormente, las proteínas se transfieren a una matriz de nitrocelulosa, la cual fue bloqueada con una solución de caseína al 1% en amortiguador salino de Tween20 al 0.1%, Tris 100 mM, pH 7.5, NaCl 0.9% (TTBS). Posteriormente, se llevó a cabo una serie de lavados utilizando solución amortiguadora de fosfatos (PBS): KHPO<sub>4</sub> 1.06 mM, NaCl 155.17 mM y NaPO<sub>4</sub> 2.97 mM, pH 7.4. La detección del péptido deseado se realizó adicionando como anticuerpo primario anti-HaloTag® y como anticuerpo secundario anti-gallina, acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP). El revelado en una placa fotográfica para la detección del péptido se llevó a cabo mediante la adición de luminol.

### 3.5.3. Carga/liberación del péptido

#### *a. Carga BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub>-pFIAT7 Flexi®*

10 mg de polvo de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> fueron puestos en contacto con 4.0 mL del péptido DS producido a partir del plásmido pF1A T7 Flexi® mediante agitación lenta a temperatura ambiente durante 2 h. Los polvos de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> fueron recuperados del péptido tomando 5.0 µL de la suspensión a los cuales se les agrego 5.0 µL de agua desionizada + 5.0 µL de buffer de lisis. La mezcla se llevó a ebullición por 10 min para su posterior carga en un gel de poliacrilamida para realizar un análisis tipo Western.



*b. Carga BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub>-pFN21K*

10 mg de polvo de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> fueron puestos en contacto con 4.0 mL de una solución acuosa del péptido DS-HaloTag mediante agitación lenta a temperatura ambiente. Una alícuota de la solución fue tomada a tiempos predeterminados para medir la DO<sub>600</sub>. La disminución de DO indica que el péptido DS-HaloTag se ha absorbido en los sistemas nanoestructurados de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub>.

3.5.4. Liberación del péptido DS de los sistemas nanoestructurados de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub>

Los polvos de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> fueron recuperados de la solución acuosa que contenía el péptido DS-HaloTag. A continuación fueron colocados en medio F12K e incubados a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Para verificar la liberación del péptido Halo-DS, a tiempos predeterminados una alícuota del medio fue tomada y medida la DO<sub>600</sub>.

## CAPÍTULO 4

---

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSION.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en el diseño y síntesis de los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  fabricados a partir de un diseño experimental factorial  $2^f$  y sintetizados a través del método sol-gel y secado por aspersion. A partir de los resultados obtenidos en la caracterización estructural, morfológica, fisicoquímica y magnética de los sistemas de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ , así como las pruebas biológicas que incluyen el estudio de carga y liberación del péptido DS utilizado como fármaco modelo, se discute la capacidad de estos sistemas para ser usados como sistemas de liberación de fármaco.

### 4.1. DISEÑO FACTORIAL $2^f$

La Tabla 4.I muestra el total de 8 experimentos llevados a cabo cuando se realizó el diseño experimental  $2^f$ , así como los valores obtenidos para el diámetro promedio de agregado de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ , área superficial específica BET, volumen de mesoporo y diámetro promedio de macroporo de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ , el volumen de poro y el tamaño de aglomerado promedio para todos los experimentos. Se observa un efecto sobre el volumen de poro y el tamaño de los agregados nanoestructurados macroporosos de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . Los diámetros promedio de los agregados esféricos obtenidos después del proceso de secado por aspersion y calcinados a  $700\text{ }^\circ\text{C}$  variaron de  $1.50$  a  $1.73\text{ }\mu\text{m}$ . Las partículas nanoestructuradas superparamagnéticas de óxido de hierro desde  $2.9\text{ nm}$  hasta  $3.5\text{ }\mu\text{m}$  han sido sintetizadas por varios autores. La mayoría de las aplicaciones son dependientes del tamaño. En este trabajo se ha elegido sintetizar agregados esféricos macroporosos de tamaño micrométrico con la finalidad de aumentar la carga útil en los sistemas de liberación de fármacos, asegurando también con ello la estabilidad de los agregados durante el transporte en el torrente sanguíneo. Además, se ha tomado en cuenta que el tamaño más grande de agregado obtenido aquí, sea capaz de ser inyectado aún en los capilares (los cuales miden alrededor de  $5$  a  $10$  micrómetros de diámetro).

Un análisis estadístico de variancia (ANOVA) fue llevado a cabo para establecer que los factores A, B y C, correspondientes a la presión ( $P$ ), temperatura ( $T$ ) y %PS, respectivamente, así como sus interacciones, AB, AC, BC y ABC, afectan la morfología y el tamaño del agregado. Para este tipo de modelo, la estadística de prueba ( $F_0$ ) para cada efecto principal e interacción pueden construirse dividiendo el cuadrado medio (MS) correspondiente del efecto o interacción por el cuadrado medio del error. Mientras que el estadístico de referencia ( $F_T$ ) es obtenido a partir de la literatura. El número de grados de libertad (GL) de cualquier efecto principal es el número de niveles del factor menos uno, y el número de GL de una interacción es el producto del número de GL asociados con los componentes individuales de la interacción. Cuando  $F_0 > F_T$ , los efectos individuales o sus interacciones muestran un efecto significativo en las variables de respuesta.

De acuerdo al análisis ANOVA en la Tabla 4.II, el cual analiza el diámetro de agregado promedio, el único factor que tienen un efecto significativo sobre el tamaño del agregado es la presión de aire del aspersor. Mientras que un efecto mínimo puede estar dado por la temperatura o, por la combinación de los factores presión-temperatura y temperatura-porógeno.

De la misma manera, un análisis ANOVA en la Tabla 4.II, donde se muestra el análisis de área superficial específica BET de los agregados nanoestructurados, muestra que los factores que tienen un efecto significativo sobre BET están dados por la concentración del template por sí sola, además de la interacción entre los factores presión-template y temperatura-template.

Además, un análisis ANOVA fue llevado a cabo para analizar el volumen de mesoporos de los agregados nanoestructurados obtenidos. La Tabla 4.II muestra que los efectos que tienen un efecto significativo sobre el volumen de mesoporos son la presión por sí sola y, la interacción de los factores presión-template y temperatura-template.

Finalmente, un análisis ANOVA fue llevado a cabo para analizar el diámetro de macroporo. La Tabla 4.II muestra que ningún factor tiene un efecto significativo sobre el tamaño de macroporo. Pudiera ser considerado que los factores que tienen un mínimo efecto sobre el tamaño de

macroporo son la temperatura por si sola y, las interacciones de los factores presión-temperatura y temperatura-porógeno. Se concluye que el tamaño de macroporo es determinado principalmente por el tamaño del PS. En este trabajo, las esferas del agente porógeno de PS usadas fueron de 200 nm de diámetro promedio.

**Tabla 4.I** Variables de respuesta ( $\phi_{\text{agregado}}$ ,  $S_{\text{BET}}$ ,  $V_{\text{mesoporo}}$ ,  $\phi_{\text{macroporo}}$ ) del diseño experimental fraccionario 2<sup>f</sup> como resultado del efecto de los factores P, T y %PS.

<sup>1</sup> No. Exp	<sup>2</sup> Factor			<sup>3</sup> $\phi_{\text{agregado}}$	<sup>4</sup> $S_{\text{BET}}$	<sup>5</sup> $V_{\text{mesoporo}}$	<sup>6</sup> $\phi_{\text{macroporo}}$
	P	T	%PS				
1	-	-	-	1.69	27.05	0.0743	194.6
2	-	+	-	1.73	24.56	0.0639	234.0
3	+	-	-	1.71	34.20	0.1686	236.2
4	+	+	-	1.58	21.99	0.0238	221.3
5	-	-	+	1.50	20.31	0.0463	220.6
6	-	+	+	1.64	20.64	0.0085	243.5
7	+	-	+	1.72	14.81	0.1015	208.5
8	-	-	+	1.73	11.16	0.0143	197.1

1 = Número de experimento; 2 = Los factores de presión (P, Kg/cm<sup>2</sup>), temperatura (T, °C) y porcentaje en peso del poliestireno (%PS) usado como agente porógeno muestran dos niveles: nivel bajo (-) y nivel alto (+) correspondientes a 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> y 2.0 Kg/cm<sup>2</sup>, 180 °C y 200 °C y, 30% y 50%, respectivamente. 3:  $\phi_{\text{agregado}}$  (μm) = diámetro promedio de agregado de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub>,  $S_{\text{BET}}$  (m<sup>2</sup>/g) = área superficial específica BET,  $V_{\text{mesoporo}}$  (cm<sup>3</sup>/g) = volumen de mesoporo,  $\phi_{\text{macroporo}}$  (nm) = diámetro promedio de macroporo de los agregados de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub>.

**Tabla 4.II.** Análisis de variancia ANOVA.

		ANOVA				
EFECTO	FACTOR	<sup>1</sup> SS	<sup>2</sup> GL	<sup>3</sup> MS	<sup>4</sup> F <sub>0</sub>	<sup>5</sup> F <sub>T</sub>
Ø <sub>agregado</sub>	A	0.49	1	0.0150	5.74	5.32
	B	0.39	1	0.0095	3.63	
	AB	-0.35	1	0.0076	2.93	
	C	-0.05	1	0.0001	0.05	
	AC	0.15	1	0.0014	0.53	
	BC	0.31	1	0.0060	2.29	
	ABC	0.17	1	0.0018	0.69	
	ERROR	0.041	8	0.0026		
TOTAL	0.083	15				
S <sub>BET</sub>	A	-22.35	1	31.220	2.300	5.32
	B	-16.53	1	17.070	1.128	
	AB	-25.29	1	39.970	2.94	
	C	-55.01	1	189.10	13.93	
	AC	-3887	1	94.420	6.958	
	BC	-42.35	1	112.00	8.260	
	ABC	-0.590	1	0.0021	0.001	
	ERROR	217.13	8	13.57		
TOTAL	701.08	15				
V <sub>mesoporo</sub>	A	-0.79	1	0.063	8.66	5.32
	B	-0.50	1	0.168	3.98	
	AB	0.35	1	0.023	1.74	
	C	0.46	1	0.049	2.98	
	AC	-0.65	1	0.008	5.81	
	BC	-0.66	1	0.101	6.02	
	ABC	0.59	1	0.014	4.79	
	ERROR	0.073	8	0.0046		
TOTAL	0.227	15				
Ø <sub>macroporo</sub>	A	6.00	1	2.250	0.01	5.32
	B	-65.6	1	268.9	2.34	
	AB	-76.6	1	366.7	3.19	
	C	17.6	1	19.36	0.16	
	AC	-38.4	1	92.16	0.80	
	BC	-75.4	1	355.32	3.09	
	ABC	48.0	1	144.00	1.25	
	ERROR	1837.2	8	114.83		
TOTAL	3086.0	15				

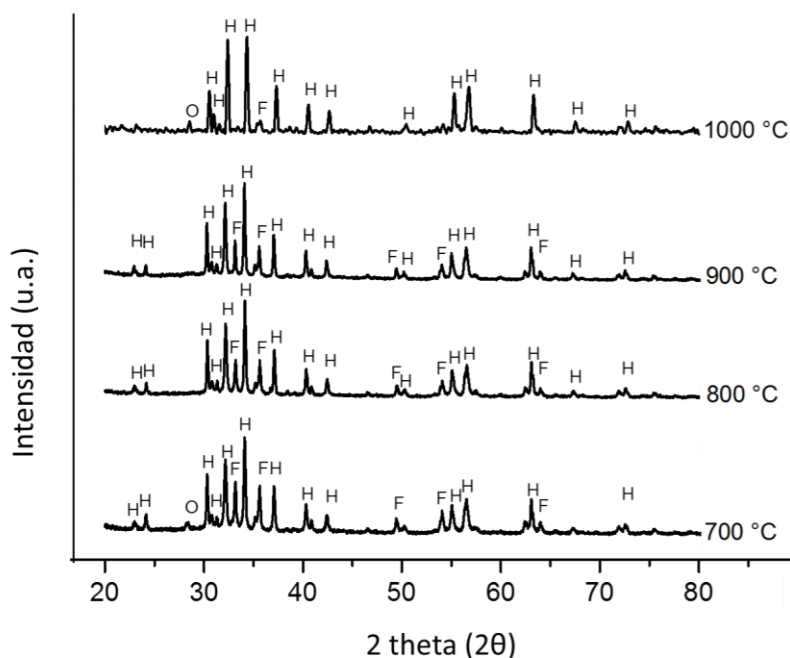
<sup>1</sup>SS = suma de cuadrados, <sup>2</sup>GL = grados de libertad, <sup>3</sup>MS = cuadrado promedio, <sup>4</sup>F<sub>0</sub> = valor estadístico de prueba F,

<sup>5</sup>F<sub>T</sub> = valor estadístico de referencia

## 4.2. CARACTERIZACIÓN

### 4.2.1. Difracción de rayos X

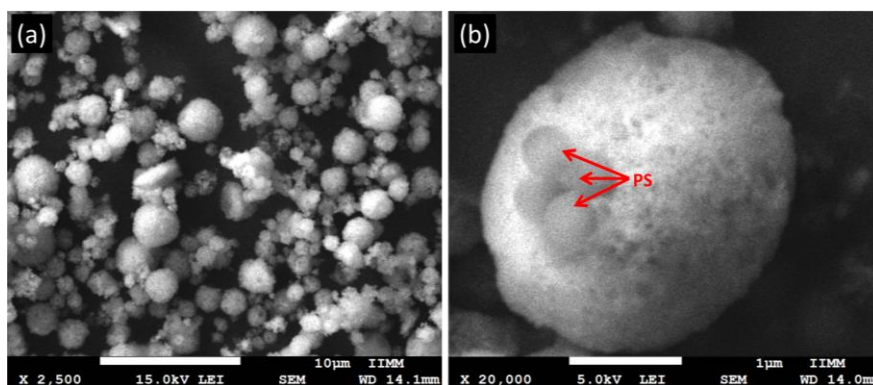
La Fig. 4.1 presenta los espectros de XRD de las muestras obtenidas a temperaturas de calcinación de 700, 800, 900 y 1000 °C. La indexación de los espectros de XRD, indicó la coexistencia de las fases hexaferrita H =  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ , monoferrita O =  $\text{BaFe}_2\text{O}_4$  y hematita F =  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  en todas las muestras. La fase H hexaferrita tiene una celda unitaria hexagonal (tarjeta Crystallography Open Database, COD, 1008841) con parámetros de red  $a = b = 0.589$  nm y  $c = 2.318$  nm; la fase monoferrita O tiene una celda unitaria ortorrómbica (tarjeta COD 4107896) con parámetros de red  $a = 1.899$  nm,  $b = 0.538$  nm,  $c = 0.844$  nm; y la fase hematita F tiene una celda unitaria hexagonal (tarjeta COD 9015964) con parámetros de red  $a = b = 0.503$  nm y  $c = 1.374$  nm. Como puede observarse, el contenido de la fase H aumenta con la temperatura y simultáneamente disminuye la fase F.



**Figura 4.1.** Espectro DRX del polvo de las esferas de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  obtenidas después del proceso de secado por aspersión y calcinado a diferentes temperaturas. Este presenta las fases H =  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  (tarjeta Crystallography Open Database, COD, 1008841), F =  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (tarjeta COD 9015964)

#### 4.2.2. Microscopía electrónica de barrido

La Fig. 4.2(a) muestra una imagen de SEM representativa de los agregados esféricos de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  de los polvos obtenidos después del proceso de secado por aspersión y antes de ser sometido a un tratamiento térmico. Una amplificación a 20000 X (Fig. 4.2(b)) muestra un agregado de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  en el cual pueden ser observadas las esferas de poliestireno (PS) antes de ser eliminadas durante el tratamiento térmico.



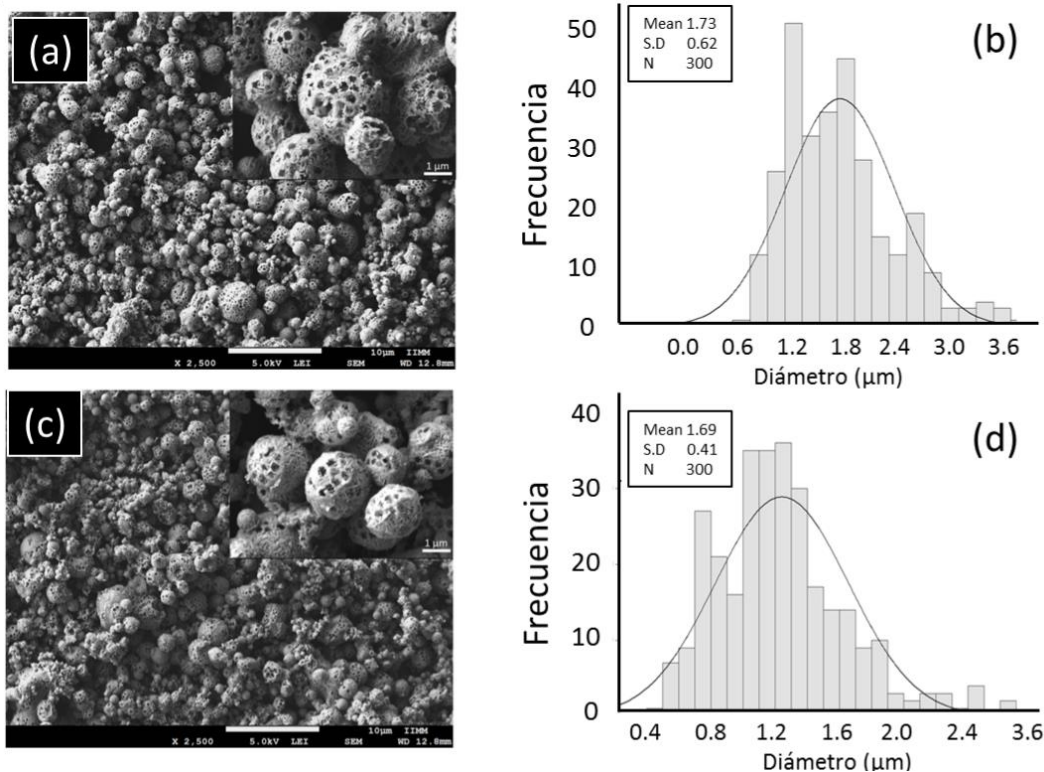
**Figura 4.2.** Imágen SEM de (a) agregados esféricos de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  antes de ser tratados térmicamente y (b) una amplificación a 20000 X que muestra un agregado de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  en el cual pueden ser observadas las esferas de poliestireno (PS) antes de ser eliminadas.

La Fig. 4.3(a) y Fig. 4.3(c) muestra imágenes de SEM representativas de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . Las imágenes fueron tomadas con electrones secundarios (SE) a 5 KV. Se puede observar que los agregados porosos nanoestructurados presentan una morfología esférica. Los insertos en la Fig. 4.3(a) y Fig. 4.3(c) muestran una amplificación de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . Nótese que las esferas son macroporosas y policristalinas, constituidas por cristales alargados o fibras de tamaño micrométrico formando una estructura tipo nido. La macroporosidad fue producto de la pirolisis de las esferas de poliestireno durante el tratamiento térmico. Sin embargo, no existe evidencia clara en los espectros de DRX (Fig. 4.1) de crecimiento preferencial de ninguna de las fases.



Las Fig. 4.3(b) y Fig. 4.3(d) muestra los histogramas de distribución de tamaño de agregado correspondiente a las Fig. 4.3(a) y Fig. 4.3(c), respectivamente. Los agregados tienen un diámetro promedio de aprox.  $1.7 \mu\text{m}$ , el cual, como se mencionó anteriormente cumple con el requisito de ser menor de  $5.0 \mu\text{m}$  para poder ser introducido en una suspensión inyectable. Los agregados esféricos observados en las muestras son prácticamente del mismo tamaño, puesto que el tamaño de estos agregados es resultado del tamaño de la gota producida en la boquilla del equipo de secado, pero también puede estar influenciado por la reología de la suspensión alimentada. La distribución de tamaño de agregado fue determinada a partir de imágenes SEM mediante análisis estadístico usando el software linear Lynx. Los histogramas describen el comportamiento en cuanto a tendencia central, forma y dispersión del conjunto de datos analizados (agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ,  $N = 300$ ).

Además, se observa una morfología esférica homogénea con un tamaño de macroporo de aprox.  $200 \text{ nm}$  de diámetro con una desviación estándar de  $50 \text{ nm}$ . Este resultado es lógico si consideramos que la suspensión alimentada está constituida, además del gel, por las esferas de poliestireno monomodales, cuyo tamaño promedio es de  $223 \text{ nm}$ . Por lo tanto, estos materiales caen en la clasificación de materiales macroporosos de acuerdo a la IUPAC. Además, la distribución de los mesoporos de los agregados esféricos obtenidos fue determinada por la técnica BJH. En promedio, los mesoporos son del orden de  $12 \text{ nm}$  con una desviación estándar de  $2 \text{ nm}$ . Como se mencionó anteriormente, debido al diseño factorial  $2^f$ , un conjunto de 8 experimentos fue realizado. Todas las muestras tienen una estructura y morfología similar, por lo tanto, las imágenes representativas para cada una de las concentraciones de PS, 30% y 50% en peso, respectivamente, son mostradas. La muestra en la Fig. 4.3(a) fue sintetizada con una temperatura interna de  $200 \text{ }^\circ\text{C}$  y una presión de  $2.0 \text{ Kg/cm}^2$ , correspondiente a los parámetros de secado por aspersión, y a una concentración de esferas de poliestireno de 50%. La muestra en la Fig. 4.3(c) fue sintetizada con una temperatura interna de  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  y una presión de  $1.5 \text{ Kg/cm}^2$  correspondiente a los parámetros de secado por aspersión, y una concentración de esferas de poliestireno de 30%. La diferencia principal entre las imágenes de las Fig. 4.4(3) y Fig. 4.4(3) es la distribución de tamaño de poro.

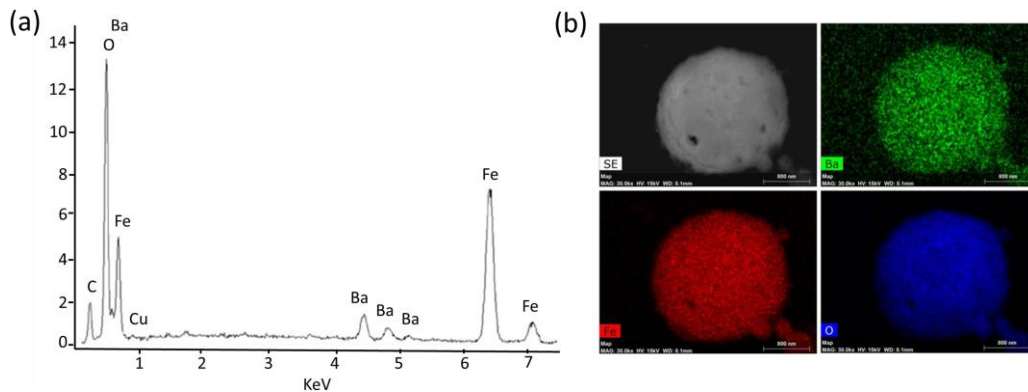


**Figura 4.3.** Imágenes de SEM de los agregados de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> y sus correspondientes histogramas de distribución de tamaño. (a) Muestra con 50% de PS bajo condiciones de secado por aspersión de 200 °C y 2.0 Kg/cm<sup>2</sup> y su correspondiente distribución de tamaño de partícula (b). (c) Muestra con 30% de PS bajo condiciones de secado por aspersión de 180 °C y 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> y su correspondiente distribución de tamaño de partícula (d). Las muestras fueron calcinadas a 700 °C.

Una variedad de diferentes morfologías han sido reportadas en la literatura. Por ejemplo, Okuyama y cols. [75] han reportado la síntesis de partículas esféricas completamente densas, partículas esféricas rugosas, partículas huecas, partículas tipo dona, partículas porosas, partículas encapsuladas y una mezcla de partículas. Chiemi y cols. [51] han reportado la síntesis de partículas núcleo-coraza. Además, otras morfologías tales como nanoalambres, nanocilindros, nanotubos y nanopartículas tipo gusano han sido reportadas en la literatura. En este trabajo se han obtenido agregados nanoestructurados de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> con una morfología esférica. Una ventaja de las partículas esféricas es su importancia práctica debido a sus propiedades reológicas cuando se

comparan con otras morfologías. Por ejemplo, cuando se encuentran en los vasos sanguíneos, el flujo de los microagregados de forma esférica en el torrente sanguíneo se ve mejorado.

El análisis EDS (Fig. 4.4(a)) y su respectivo mapeo químico (Fig. 4.4(b)) realizado en el SEM indicó que los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  están compuestos, como era de esperarse, por los elementos químicos Ba, Fe, y O. El pico de C es producido por la cinta doble cara de carbono usada como adhesivo en soporte. Este resultado demuestra que la composición de las esferas obtenidas contiene los mismos elementos que fueron introducidos en la síntesis y no presentan contaminación.

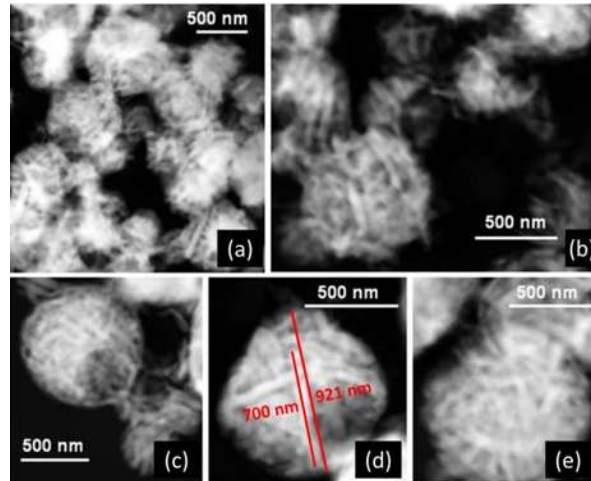


**Figura 4.4.** (a) Espectro EDS de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  el cual indica la presencia de los elementos Ba, Fe y O. El C es producido por la cinta doble cara de carbono usada como adhesivo en soporte. (b) Mapeos químicos de EDS de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ; Imagen SEM en el modo de electrones secundarios. Las imágenes de Ba (verde), Fe (rojo) y O (azul) indican su distribución homogénea y que estos elementos son los únicos presentes en las muestras.

#### 4.2.3. Microscopía electrónica de transmisión

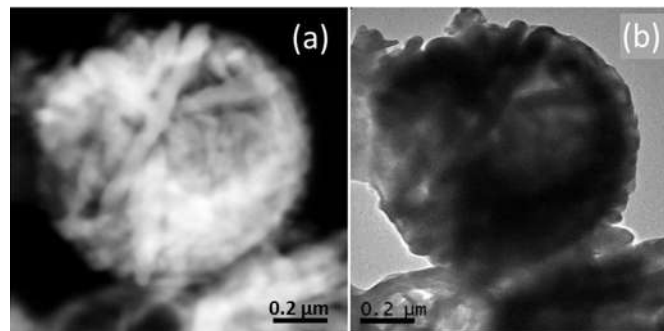
La Fig. 4.5 presenta las imágenes de STEM-ADF de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  calcinadas a  $700\text{ }^\circ\text{C}$ . Estas imágenes confirman que las esferas están conformadas principalmente por cristales alargados tipo platelets. Estos cristales son tan alargados que llegan a alcanzar una longitud del tamaño de la esfera. Por ejemplo, en la Fig. 4.5(d) se observa una esfera de aproximadamente  $921\text{ nm}$  de diámetro y la longitud del cristal más largo es de  $700\text{ nm}$  aproximadamente. El tamaño

promedio de las esferas fue de  $1.7 \pm 0.4 \mu\text{m}$  y de los cristales alargados de  $299.1 \pm 80.1 \text{ nm}$  en longitud y  $34.1 \pm 7.7 \text{ nm}$  en espesor.



**Figura 4.5.** Imágenes de STEM-ADF de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . Las esferas están conformadas principalmente por cristales alargados.

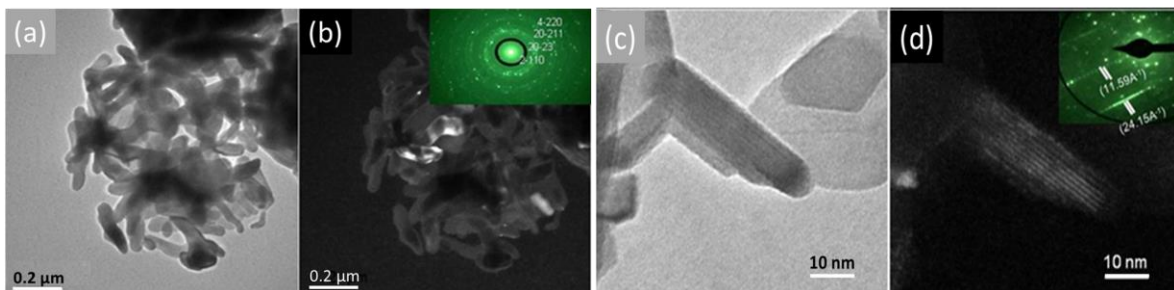
La Fig. 4.6 muestra imágenes de STEM-ADF (Fig. 4.6(a)) y de TEM (Fig. 4.6(b)) de una esfera de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  de aproximadamente  $1 \mu\text{m}$  de diámetro. Estas imágenes permiten comparar el contraste presentado por los cristales que conforman las esferas por estas técnicas. Nótese que la esfera presenta un cristal alargado de aproximadamente  $850 \text{ nm}$  de largo, y cuyo contraste es mejor observado por STEM-ADF.



**Figura 4.6.** Imágenes de una misma esfera de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  en el modo (a) STEM-ADF y (b) TEM, las cuales permiten comparar el contraste de los cristales que la conforman.

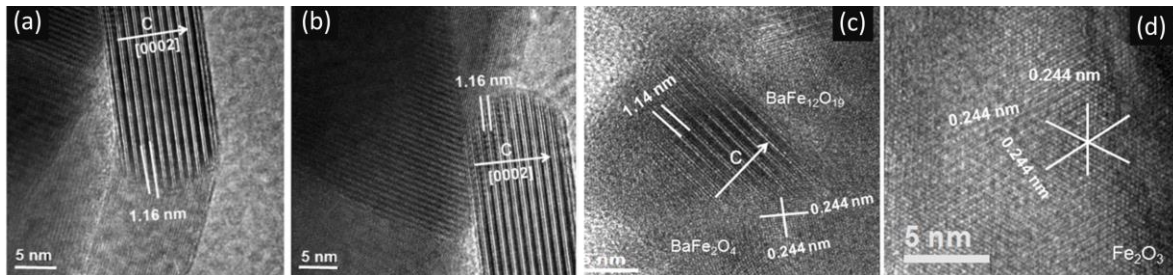
Es importante indicar que el uso del limpiador ultrasónico permitió obtener las muestras analizadas por TEM en este trabajo. El limpiador produce una vibración de 42 KHz a una potencia de 70 W y genera alternativamente ondas de alta y baja presión que transmiten sonidos de alta y baja frecuencia. La baja presión genera burbujas microscópicas que explotan rápidamente, liberando así la energía. Este proceso denominado cavitación, puede llevar a la desintegración de los materiales que conforman las esferas de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . El calor permite acelerar el proceso.

En la Fig. 4.7 se presentan las imágenes de TEM en el modo de campo claro (Fig. 4.7(a) y Fig. 4.7(c) y en el modo de campo oscuro (Fig. 4.7(b) y Fig. 4.7(d) del material que conforman los agregados después de haber sido desaglomerados por el tratamiento ultrasónico al que fueron sometidas. Este material fue, por lo tanto, estructuralmente estudiado por difracción electrónica de área selecta (SAEDP). El inserto en la Fig. 4.7(b) presenta el patrón SAEDP de anillos provenientes del material presentado en la Fig. 4.7(a), mientras que el inserto en la Fig. 4.7(d) presenta el patrón SAEDP del cristal alargado mostrado en la Figura 4.7(c). La indexación de estos patrones indicó que todo el material corresponde a la estructura hexagonal de la  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  con parámetros de red  $a = b = 0.589 \text{ nm}$  y  $c = 2.318 \text{ nm}$  (tarjeta Crystallography Open Database, COD, 1008841).



**Figura 4.7.** Imágenes de TEM en campo claro (a y c) y en campo oscuro (b y d) del material que conforman las esferas después de haber sido desbaratadas por el tratamiento ultrasónico. El inserto en (b) presenta el patrón SAEDP proveniente del material presentado en (a). El inserto en (d) presenta el patrón SAEDP del cristal alargado presentado en (c).

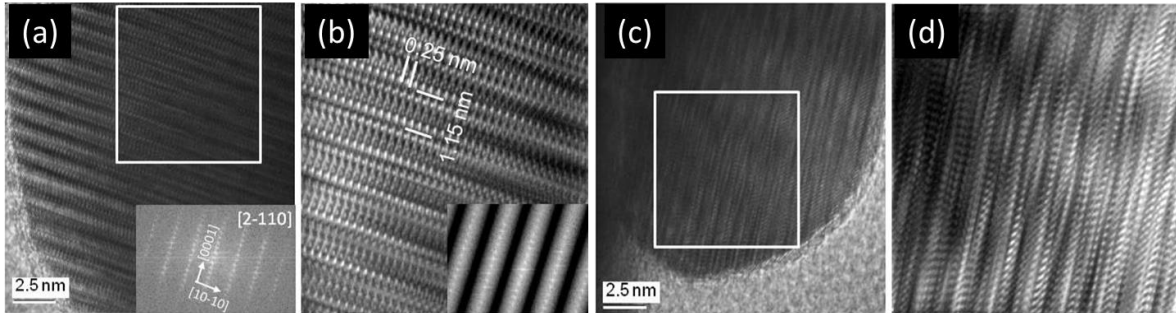
La Fig. 4.8(a) y Fig. 4.8(b) muestran imágenes HRTEM de uno de los cristales alargados individuales que conforman los agregados porosos de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  obtenidos. Además, la coexistencia de las fases entre los cristales de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  y los cristales de  $\text{BaFe}_2\text{O}_4$  son mostrados en la Fig. 4.8(c). Por otra parte, la Fig. 4.8(d) muestra la coexistencia de las fases entre los cristales de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  y los cristales de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .



**Figura 4.8.** Imágenes HRTEM de los cristales que conforman los agregados porosos de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . (a) y (b) corresponden a cristales individuales de la fase  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . (c) Coexistencia entre las fases  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  y  $\text{BaFe}_2\text{O}_4$ . (d) Coexistencia entre las fases  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  y  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .

Las fibras fueron también observadas por HRTEM para analizar la estructura y el ordenamiento que presentan los átomos que conforman sus cristales. La Fig. 4.9(a) presenta la imagen de HRTEM de uno de los cristales alargados. El inserto en esta figura presenta la correspondiente Transformada Rápida de Fourier (FFT) del cristal, la cual indica que el eje de zona corresponde al eje de la zona en la dirección  $[2-110]$ . En la Fig. 4.9(b) se presenta la imagen digitalmente procesada correspondiente al área del recuadro indicado en la Fig. 4.9(a), y la cual fue obtenida usando el filtro indicado por el inserto. A parte del arreglo presentado, esta imagen indica que el eje de crecimiento de los cristales alargados es en la dirección  $[10-10]$ . En el estudio por HRTEM no solo se observan cristales alargados perfectamente formados, sino que una gran mayoría presenta defectos, principalmente fallas de apilamiento. La Fig. 4.9(c) presenta una imagen de HRTEM de otro de los cristales alargados, en la cual se observa una gran cantidad de defectos.

La imagen presentada en la Fig. 4.9(d) corresponde a la imagen digitalmente procesada del área indicada en el recuadro presentado en la Fig. 4.9(c).



**Figura 4.9.** (a) Imagen de HRTEM de uno de los cristales alargados que conforman las esferas de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . El inserto presenta la correspondiente FFT, la cual indica que el eje de zona corresponde al eje en la dirección  $[2-110]$ . (b) Imagen digitalmente procesada correspondiente al área del recuadro indicado en (a). El filtro usado para el procesamiento es indicado en el inserto. (c) Imagen de HRTEM de otro de los cristales alargados con defectos. (d) Imagen digitalmente procesada del área indicada en el recuadro en (c).

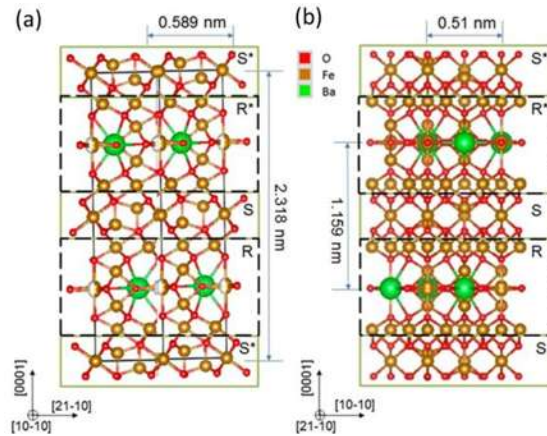
Usando los valores de las posiciones xyz reportadas para  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  con grupo espacial  $P3/mmc$  [27] se obtuvo la celda unitaria y se simuló digitalmente las imágenes de HRTEM. La Fig. 4.10 presenta la celda unitaria obtenida en las direcciones  $[10-10]$  (Fig. 4.10(a) y  $[21-10]$  (Fig. 4.10(b)).

La estructura de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  se puede construir usando tres unidades básicas [30-32]: S, R y T. La unidad S a su vez presenta dos sub-unidades:  $S^0$ , con una carga eléctrica neutra y con fórmula química  $\text{Me}_2^{2+}\text{Fe}_4^{3+}\text{O}_8$  (donde Me representa metales divalentes tales como  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), y  $S^{2+}$ , con carga eléctrica  $2+$  y con fórmula química  $(\text{Fe}_6^{3+}\text{O}_8)^{2+}$ . La unidad R presenta carga eléctrica  $2-$  y con fórmula química  $(\text{Ba}^{2+}\text{Fe}_6^{3+}\text{O}_{11})^{2-}$ . La unidad T presenta carga eléctrica neutra y con fórmula química  $\text{Ba}_2^{2+}\text{Fe}_8^{3+}\text{O}_{14}$ . Estas unidades se unen para dar lugar a la estructura de diferentes óxidos ferromagnéticos. Por ejemplo, al unir la unidad  $S^{2+}$  con la unidad R, se obtiene la secuencia de apilamiento RS, la cual presenta carga eléctrica neutra y con fórmula química  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . Así, la celda unitaria de la  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  se obtiene con la secuencia  $\text{SRS}^*\text{R}^*$ , donde \* dignifica una rotación de  $180^\circ$  alrededor del eje c. La Fig. 4.10 presenta las



unidades S, S\*, R y R\* de la celda unitaria de la BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> observadas en las direcciones [21-10] y [10-10], respectivamente.

Vale la pena comentar que, si se designa como la unidad M a BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub>, y definimos a ST, con fórmula química Ba<sub>2</sub><sup>2+</sup>Me<sub>2</sub><sup>2+</sup>Fe<sub>12</sub><sup>3+</sup>O<sub>22</sub>, como la unidad Y, las hexaferritas pueden representarse como apilamientos de las unidades S, M y Y [64]. Por lo tanto, la combinación de las unidades S, R y T da origen al apilamiento que generan las diferentes estructuras observadas en las ferritas [65,66], y es natural deducir la existencia de las estructuras tipo politipo con la misma composición química en estos compuestos. En nuestro caso, los patrones de difracción SAEDP obtenidos en este trabajo no indican la presencia de estructuras tipo politipo ya que no se presentaron reflexiones provenientes de súper-redes.

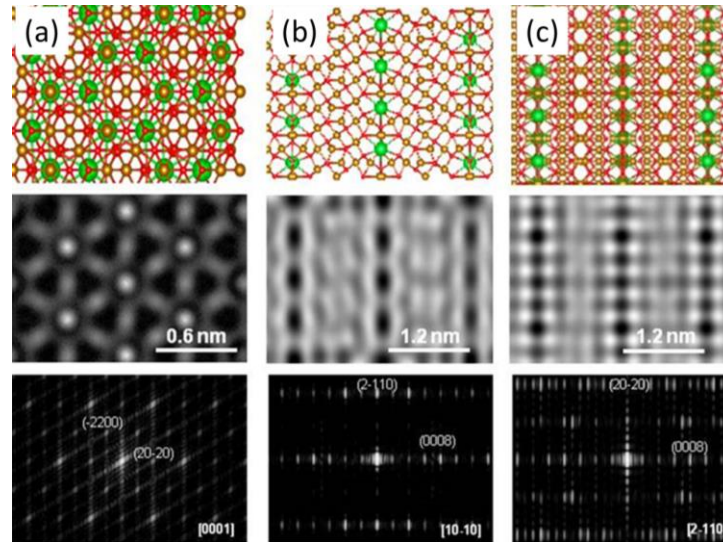


**Figura 4.10.** Celda unitaria de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> obtenidas usando los valores indicados en [27] y observada en la dirección [10-10] (a) y en la dirección [21-10] (b). También se presentan las unidades S y R. El plano que contiene a Ba es un plano espejo. Ba en verde, Fe en amarillo y O en rojo

La Fig. 4.11 muestra la simulación digital de las imágenes de HRTEM y sus correspondientes patrones de difracción de área selecta en la dirección [0001] (Fig. 4.11(a), en la dirección [10-10] (Fig. 4.11(b), y en la dirección [2-1-10] (Fig. 4.11(c). En estas Figuras se presentan las posiciones de los átomos de Ba (en verde), Fe (en amarillo), y O (en rojo) dentro de la celda unitaria hexagonal de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> en proyección a lo largo de las direcciones [0001], [10-10] y [2-1-10], respectivamente. Las condiciones de simulación fueron: V = 200 KV con desenfoque de Scherzer en -54.85 nm, y 4x4x4 celdas. Nótese que las líneas oscuras corresponden a posiciones de los

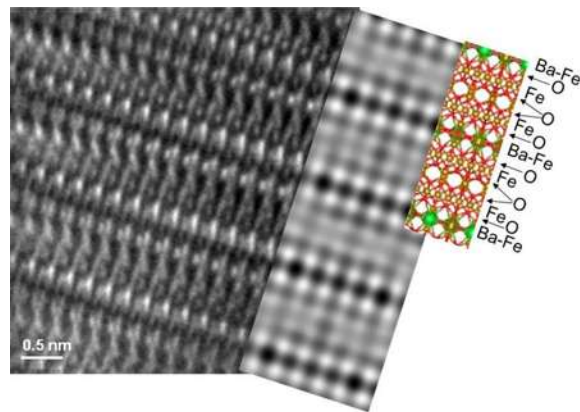


átomos de Ba con los átomos de Fe. Los resultados indicaron que los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  producidos consisten de varios pequeños cristales alargados, platelets, cuyos arreglos atómicos presentan en algunos casos un perfecto arreglo (regiones libres de defectos), pero también se observaron desajustes en el apilamiento (mismatches) en otros casos.



**Figura 4.11.** Simulación computacional de imágenes de HRTEM en las direcciones [0001] (a), [10-10] (b), y [2-1-10] (c). Se presenta la proyección de la celda  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  en las direcciones indicadas, la simulación de su imagen en el desenfoco de Scherzer, y su correspondiente patrón de difracción del área selecta simulado. Las condiciones de simulación fueron:  $V = 200$  KV, desenfoco de Scherzer en  $-54.85$  nm y  $4 \times 4 \times 4$  celdas. Ba en verde, Fe en amarillo, y O en rojo.

La Fig. 4.12 muestra la imagen de HRTEM experimental en la dirección [2-110] de uno de los cristales alargados que conforman los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  junto con la imagen computacional simulada en la misma dirección. En este caso, la imagen de HRTEM no presenta defectos (al menos no observables) y las franjas presentan una periodicidad de  $1.159$  nm, que corresponden a la mitad de la periodicidad a lo largo del eje c. También se incluye las posiciones de la superposición de los átomos de Ba con los átomos de Fe.

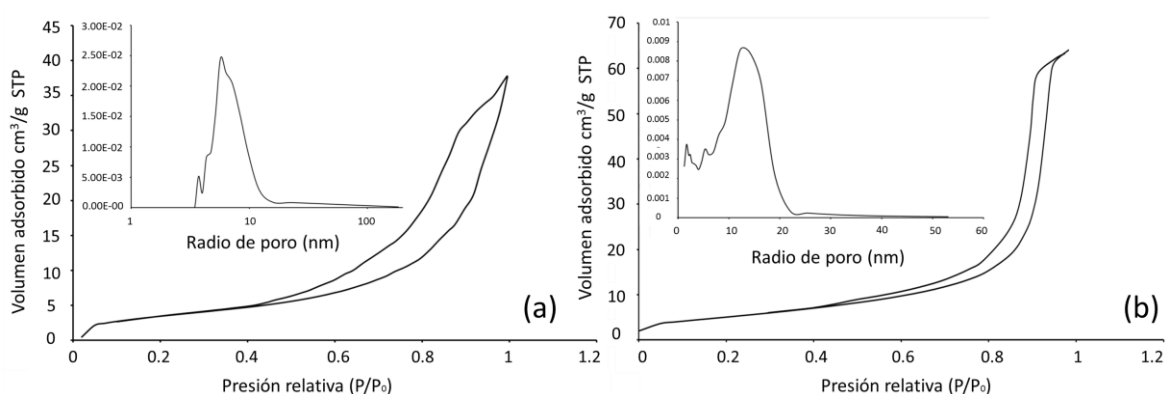


**Figura 4.12.** Imagen de HRTEM en la dirección [1-100] de uno de los cristales alargados que conforman los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  y la imagen computacionalmente simulada en la misma dirección. En este caso la imagen de HRTEM no presenta defectos. También se incluyen las posiciones de los átomos en la celda unitaria. Ba en verde, Fe en amarillo y O en rojo.

#### 4.2.4. Isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno

La Fig. 4.13 muestra las isotermas típicas de adsorción/desorción para las muestras de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  calcinadas a  $700\text{ }^{\circ}\text{C}$  con concentraciones de PS de 30 y 50 %, respectivamente. La muestra en la Fig. 4.13(a) fue sintetizada con una temperatura interna de  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una presión de  $2.0\text{ Kg/cm}^2$  correspondiente a los parámetros de secado por aspersión, y una concentración de esferas de poliestireno de 50%. La muestra en la Fig. 4.13(b) fue sintetizada con una temperatura interna de  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una presión de  $1.5\text{ Kg/cm}^2$  correspondiente a los parámetros de secado por aspersión, y una concentración de esferas de poliestireno de 30%. De acuerdo a la clasificación BET, las isotermas corresponden a una isoterma típica tipo II. Este tipo de isoterma se caracteriza por rápido aumento inicial del volumen de gas adsorbido con el incremento en la presión relativa, cambiando a un incremento lento. El punto de inflexión corresponde tanto a la finalización del recubrimiento de la mono capa y el llenado de los poros por condensación capilar. El resto de la curva corresponde a la formación de la multicapa. Este tipo de isoterma es usualmente encontrado en partículas mesoporosas. El área superficial es calculada a partir de las isotermas usando el método BET a una presión relativa por debajo de 0.3. A partir de la ecuación BET, el área superficial específica  $S_{\text{BET}}$  de las partículas porosas de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  fue determinada.  $S_{\text{BET}}$  de

los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  varió de 11.16 hasta 27.05  $\text{m}^2/\text{g}$ . (Tabla IV). Dos tipos de poro son observados en los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ : mesoporos y macroporos. Los mesoporos se presentan en los espacios entre las partículas primarias, y son el resultado de la pirolisis de las micelas formadas por el surfactante. Los macroporos son obtenidos como resultado de la pirolisis del poliestireno. Los insertos en la Fig. 4.13(a) y Fig. 4.13(b) muestran la distribución de tamaño de los mesoporos obtenidos por el método BET de adsorción de  $\text{N}_2$ . El diámetro promedio de mesoporo varió entre 3.4 nm y 12 nm aproximadamente.

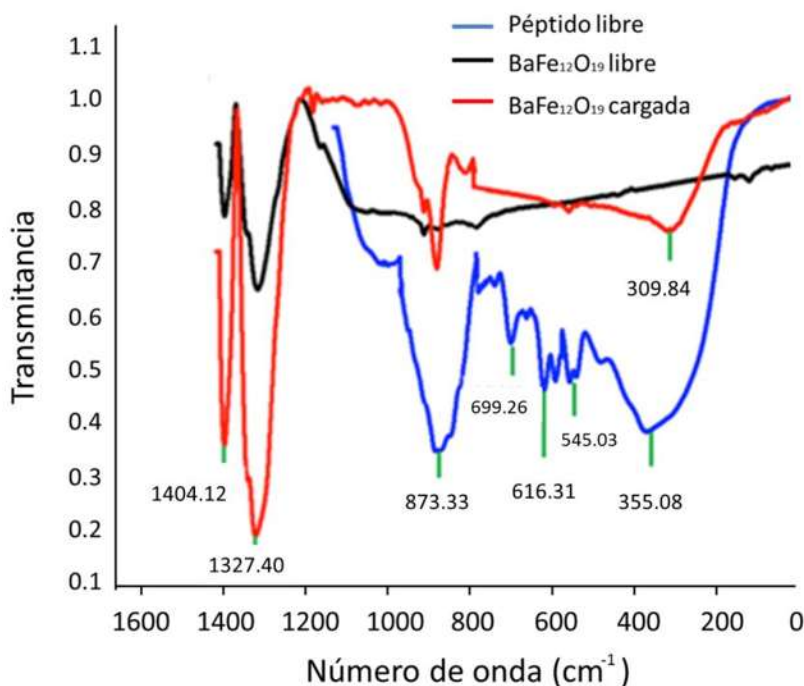


**Figura 4.13.** Isothermas de adsorción/desorción BET para (a) muestra con 50% de esferas de PS bajo condiciones de secado por aspersión de 200 °C y 2.0  $\text{Kg}/\text{cm}^2$ , y (b) muestra con 30% de esferas de PS bajo condiciones de secado por aspersión de 180 °C y 1.5  $\text{Kg}/\text{cm}^2$ . Las muestras fueron calcinadas a 700 °C.

#### 4.2.5. Espectroscopía infrarroja

El espectro FTIR de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  calcinados a 700 °C mostrado en la Fig. 4.14 evidencia de las bandas de vibración típicas para la  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  estequiométrica a 1327.40  $\text{cm}^{-1}$  y 1404.12  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales son asignadas a los modos de vibración Fe-O de los sitios tetraédricos y octaédricos en  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . Las posiciones de estas bandas dependen de la estequiometría de la  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . Las posiciones de las bandas a 355.08  $\text{cm}^{-1}$ , 545.03  $\text{cm}^{-1}$ , 616.31  $\text{cm}^{-1}$ , 699.26  $\text{cm}^{-1}$  y 873.33  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a los enlaces/grupos funcionales del péptido DS. La interacción entre  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  y el polímero induce un cambio en los picos característicos de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  a número de

onda mayores como una función de la relación surfactante/polímero. La presencia de nuevas bandas en el espectro correspondiente a la  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  en  $309.84\text{ cm}^{-1}$  y  $873.33\text{ cm}^{-1}$  indica la adsorción del péptido. La región de  $600$  a  $1000\text{ cm}^{-1}$  contiene los grupos funcionales correspondientes a los enlaces C-C, C-O y C-N. Así mismo, la región entre  $750$  y  $900\text{ cm}^{-1}$  incluyen grupos aromáticos, por lo tanto, los grupos funcionales correspondientes a la fenilalanina o al triptófano pueden corresponder a los observados en el espectro IR. [84]

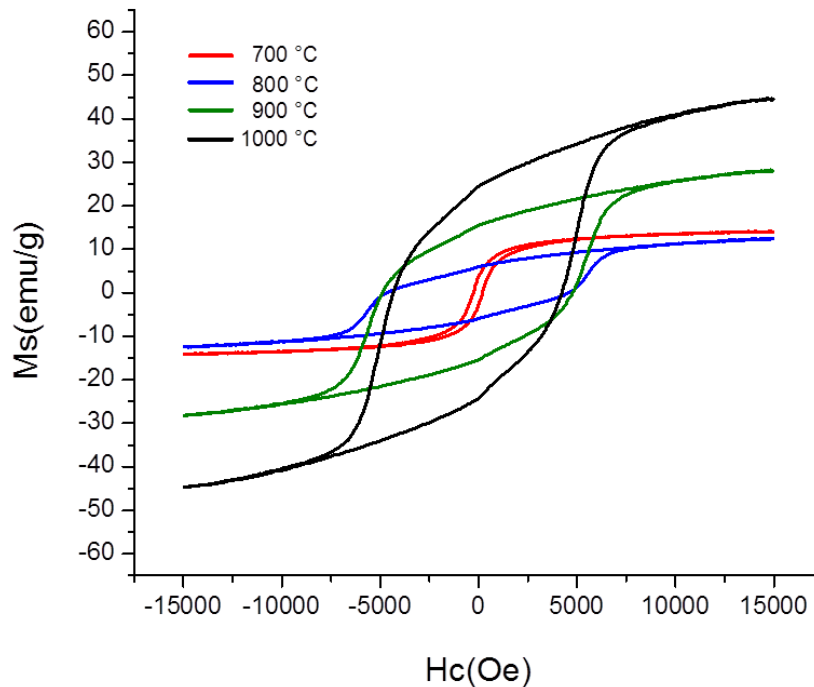


**Figura 4.14.** Espectro Infrarrojo (IR) que muestra los enlaces/grupos funcionales a números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) específicos correspondientes al péptido DS-HaloTag libre y, los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  libres y cargados con el péptido.

#### 4.2.6. Propiedades magnéticas

Una manera de medir las propiedades magnéticas es a través de las curvas de histéresis, las cuales permiten la evaluación de las propiedades macroscópicas tales como la saturación magnética,  $M_s$ , remanencia magnética,  $M_r$ , y coercitividad,  $H_c$ . Estas propiedades definen el carácter magnético de los materiales sintetizados. La Fig. 4.15 muestra las curvas de histéresis a diferentes

temperaturas de calcinación. La Tabla 4.III muestra las propiedades magnéticas de todas las muestras. En general,  $M_s$ ,  $M_r$  y  $H_c$  muestran un incremento como una función de la temperatura de calcinación, y  $H_c$  incrementa con la temperatura en todos los casos. El valor más bajo de  $M_r$  se obtuvo para la muestra calcinada a 700 °C. Además, hay un cambio claro en el comportamiento magnético asociado con las temperaturas del tratamiento térmico. El cambio tiene que estar relacionado con el porcentaje del contenido de las diferentes fases presentadas en las muestras, y también tiene que estar relacionado al tamaño de los cristales que constituyen los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . A partir de las curvas de histéresis mostradas en la Fig. 4.20 y basado en los valores de coercitividad mostrados en la Tabla 4.III se observa que únicamente el material obtenido a 700 °C se comporta como un material magnético semi-duro; mientras que para todas las demás temperaturas, desde 800 a 1000 °C, el material muestra un comportamiento magnético duro.



**Figura 4.15.** Curvas de histéresis de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  calcinados a diferentes temperaturas. Los valores de las muestras fueron tomadas a temperatura ambiente y 5000 Oe.

**Tabla 4.III.** Propiedades magnéticas de los agregados porosos de hexaferrita de bario.

Muestra	Propiedades magnéticas			
	Temperatura de calcinación (°C)	$M_s$ (emu/g)	$M_r$ (emu/g)	$H_c$ (Oe)
1	700	14.24	3.79	194.650
2	800	12.49	5.92	4631.60
3	900	28.26	15.2	4791.46
4	1000	45.11	24.1	4277.50

El análisis de la composición estructural de los agregados indican que las fases monoferrita (O) y hematita (F) están presentes. Sin embargo, la fase hexagonal H es la fase mayoritaria a la temperatura de calcinación de 1000 °C. Como se muestra en la Tabla 4.III, un cambio significativo ocurre como una función de la temperatura de calcinación en las propiedades magnéticas de las muestras. Es evidente que el cambio está relacionado con la presencia de las diferentes fases. La mejor combinación de las propiedades magnéticas fue:  $M_s = 45.11$  emu/g (1000 °C) y  $H_c = 4791.48$  Oe (900 °C).

Estos valores de magnetización son cercanos a los obtenidos por Xu y cols [23], quienes sintetizaron esferas mesoporosas huecas de  $BaFe_{12}O_{19}$  usando el método de pirolisis por aspersión, obteniendo un valor de  $M_s = 50.4$  emu/g para muestras calcinadas a 1000 °C. González-Carreño y cols [25] obtuvieron un valor  $M_s = 50.0$  emu/g para esferas huecas de  $BaFe_{12}O_{19}$  calcinadas a la misma temperatura, obtenidas a partir de pirolisis por aerosol. La diferencia en los valores de magnetización obtenidos por éstos autores y los valores obtenidos en éste trabajo puede ser debida principalmente a la estructura de la  $BaFe_{12}O_{19}$ , dado que, en todos los casos, la morfología de la  $BaFe_{12}O_{19}$  fue esférica; sin embargo, la  $BaFe_{12}O_{19}$  obtenida en este trabajo presento una estructura porosa, mientras que la estructura de obtenida por Xu y González-Carreño obtuvieron una estructura hueca.

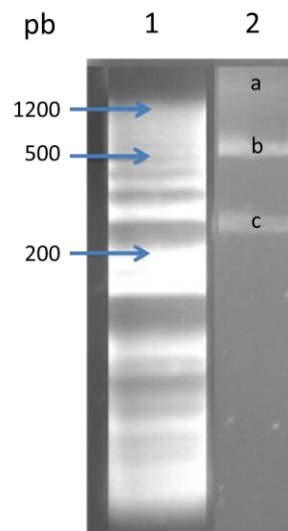
Por otra parte, no únicamente la estructura y morfología de las  $BaFe_{12}O_{19}$  afecta las propiedades magnéticas, sino también el método de preparación. Por ejemplo, An y cols. [42] sintetizaron

BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> con una morfología esférica a través de un método ultrasónico asistido por sales. En este caso, los valores de magnetización obtenidos por los autores fue  $M_s = 61.9$  emu/g ( $T = 950$  °C), lo cual dista del valor obtenido en el presente trabajo de investigación.

### 4.3. PROPIEDADES BIOLÓGICAS

#### 4.3.1. Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo para verificar la presencia del gen de interés en los plásmidos replicados en la cepa T7 de la bacteria *E. coli* a partir de la cual se sintetizó el péptido DS. La Fig. 4.16 obtenida con el Fotocodificador EL LOGIC 200 muestra la extracción de ADN de naturaleza plasmídica de la cepa T7 de *E. coli*. Se obtuvo una extracción exitosa del plásmido pF1A T7 con un rendimiento de 350 ng/mL

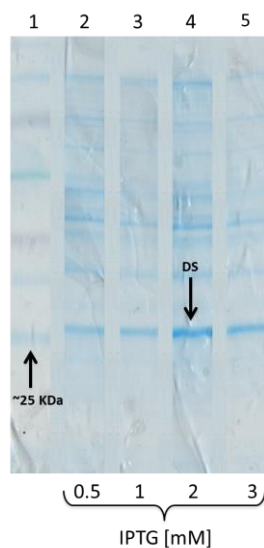


**Figura 4.16.** Extracción de ADN plasmídico: La columna 1 es referida al marcador Kb Plus DNA Ladder de peso molecular conocido (pares de bases, pb). El marcador se compone de 20 bandas de ADN de alta pureza, de doble cadena que abarca 100 pb hasta 12000 pb. La columna 2 representa el ADNp de la cepa NEB (New England Biolab) T7 DS. Además, puede ser observado en la columna 2 la presencia de tres bandas: a) es referida al ADNp relajado, b) describe el ADNp enrollado, y c) explica el ADNp súper-enrollado.

#### 4.3.2. Síntesis, inducción y expresión del péptido DS

##### a. Síntesis a partir del plásmido pF1A T7 Flexi®

La Fig. 4.17 muestra un análisis electroforético en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) que revela la expresión del péptido DS. En la Fig. 4.17 la columna 1 es referida al marcador Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder. Las columnas 2-5 muestran los efectos de las concentraciones del inductor IPTG: 0.5, 1, 2 y 3 mM. Cada una de las bandas observadas en el gel SDS-PAGE representa una proteína distinta. En las columnas 2-5 se observa una banda a la altura de aproximadamente 26 KDa, lo cual indica la expresión del péptido DS y que está de acuerdo con los valores de la literatura. Sin embargo, la intensidad de la banda en la columna 4 es más intensa, lo cual indica que una concentración 2 mM de IPTG tiene una mayor eficiencia en la inducción del péptido DS. Por otra parte, un aumento en la concentración de IPTG a 3 mM inhibe la expresión del péptido DS como se puede observar en la columna 5.

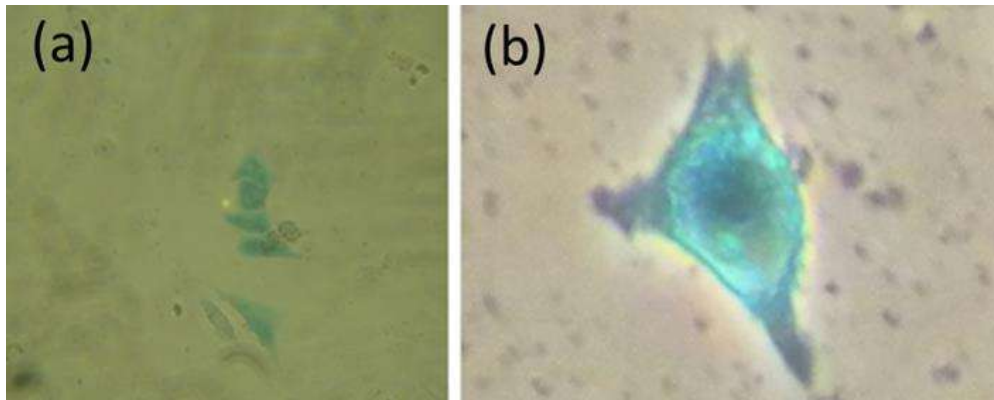


**Figura 4.17.** Separación de proteínas por electroforesis en gel SDS-PAGE



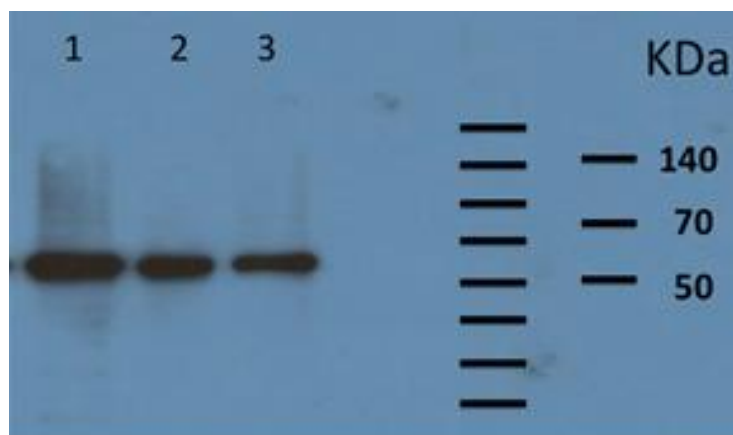
*b. Síntesis a partir del plásmido pFN21K*

La Fig. 4.18(a) y Fig. 4.18(b), muestra imágenes de microscopía óptica a diferentes magnificaciones. Las células CHO normalmente ancladas a la superficie, tienen forma fibroblastoide y pueden adaptarse a crecer en suspensión, adquiriendo entonces una forma esférica. Las células transfectadas son fáciles de detectar ya que éstas adquieren una coloración azul debido a la integración de un plásmido que contiene un gen reportero el cual está vinculado a una secuencia regulatoria en el cultivo celular. Estos genes otorgan características que facilitan su expresión, identificación y medición. La expresión del gen reportero puede ser observada en la Fig. 4.18. Las células CHO son teñidas al momento de añadir una molécula orgánica X-gal que degrada la beta-galactosidasa presente en las células CHO.



**Figura 4.18.** Imágenes del microscopio óptico en las cuales se puede observar la expresión de un gen reportero indicando las células CHO han sido transfectadas.

La Fig. 4.19, muestra un análisis tipo Western blot. En la placa fotográfica se observa la proteína de interés DS-HaloTag a una altura de ~61 KDa, sintetizada a partir del plásmido pFN21K. El volumen final en los carriles 1-3 fue de 19.8  $\mu\text{L}$  con una concentración de proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de 2.9, 2.8, y 2.7, respectivamente. De acuerdo a la literatura el peso molecular del péptido DS es ~26 KDa y el peso molecular de HaloTag es ~34 KDa. Por lo que el peso de 61 KDa observado en la placa fotográfica corresponde al peso molecular de la proteína de fusión DS-HaloTag



**Figura 4.19.** Análisis tipo Western blot. La proteína de interés DS-HaloTag aparece a una altura de 61 ~KDa.

#### 4.3.3. Caracterización del péptido DS

La correspondiente caracterización del péptido DS es mostrada en la Tabla 4.IV, la cual incluye características tales como la longitud y peso del péptido, punto isoeléctrico, residuos hidrofóbicos e hidrofílicos, residuos cargados y distribución de los aminoácidos presentes (Tabla 4.V y Fig. 4.20)

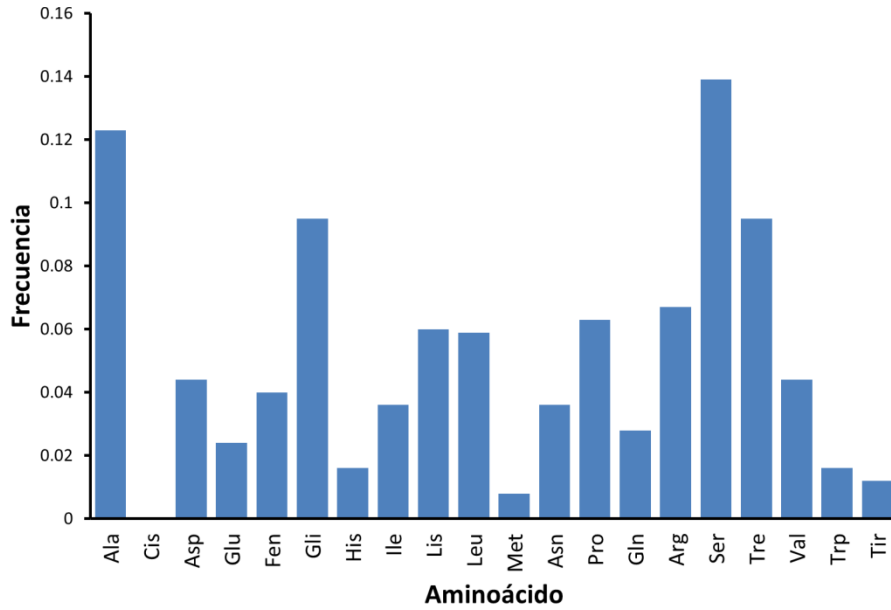
**Tabla 4.IV.** Información de secuencia.

Información de secuencia			
Secuencia	Proteína		
Longitud	252		
Organismo	Dominio de unión a Su(H) sin intron		
Nombre	DS sin intrón marco de traducción +1		
Peso	26.371 KDa		
Punto isoeléctrico	10.75		
Índice alifático	60.556		
Residuos de aminoácidos			
Hidrofobicidad	Cantidad	Tipo de carga	Cantidad
Hidrofóbico (A, F, G, I, L, M, P, V, W) <sup>1</sup>	121	Negativa (D, E) <sup>1</sup>	17
Hidrofílico (C, N, Q, S, T, Y) <sup>1</sup>	78	Positiva (R, K) <sup>1</sup>	32

<sup>1</sup> = Abreviación de los aminoácidos con una sola letra

**Tabla 4.V.** Tabla de distribución de aminoácidos.

Aminoácido	Cantidad	Aminoácido	Cantidad
Alanina (A)	31	Metionina (M)	2
Cisteína (C)	0	Asparagina (N)	9
Ácido aspártico (D)	11	Prolina (P)	16
Ácido glutámico (E)	6	Glutamina (Q)	7
Fenilalanina (F)	10	Arginina (R)	17
Glicina (G)	24	Serina (S)	35
Histidina (H)	4	Treonina (T)	24
Isoleucina (I)	9	Valina (V)	11
Lisina (K)	15	Triptofano (W)	4
Leucina (L)	14	Tirosina (Y)	3



**Figura 4.20.** Histograma de distribución de aminoácidos.

A nuestro mejor conocimiento, el péptido DS (Dominio de unión a supresor de Hairless [Su(H)]) no ha sido probado como fármaco modelo en sistemas DDS. Sin embargo, cientos de péptidos derivados a partir de proteínas presentes principalmente en el citosol, mitocondria y/o núcleo han sido identificados y probados [11]. Li [13] produjo el péptido LL-37 antimicrobiano en *E. coli*, el

cual exhibe diversas propiedades inmunomoduladoras tales como la habilidad de mediar la quimiotaxis, acelerar la angiogénesis y promover la cicatrización.

En las últimas décadas, el desarrollo de terapias a partir de péptidos ha llevado a un número sin precedentes de aprobaciones en el mercado. Kaspar y cols. [37] describen las direcciones futuras en el desarrollo de terapias basadas en péptidos. Algunos péptidos aprobados en 2012 por la FDA son: linaclotide, utilizado para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales; lucinactant, usado para prevenir el síndrome respiratorio; peginesatide, usado para el tratamiento de anemia, entre otros.

#### 4.4. PRUEBAS DE CARGA/LIBERACIÓN

En la Fig. 4.21 se observa como disminuyen los valores de densidad óptica ( $DO_{600}$ ) en la interacción  $BaFe_{12}O_{19}$ -DS-HaloTag a medida que el tiempo transcurre. La disminución de  $DO_{600}$  indica que el péptido DS-HaloTag es absorbido sobre la superficie de los sistemas nanoestructurados de  $BaFe_{12}O_{19}$ . Como puede ser observado en la Figura 45, los valores de  $DO_{600}$  se mantienen constante en  $\sim 0.243$  en un tiempo de 140 min, lo cual indica que en este punto los sistemas nanoestructurados de  $BaFe_{12}O_{19}$  han alcanzado su saturación y por lo tanto, no pueden absorber más cantidad de péptido DS-HaloTag. A partir de la gráfica se determinó la concentración de péptido DS-HaloTag absorbido por los sistemas nanoestructurados de  $BaFe_{12}O_{19}$ . Sabiendo que la concentración inicial ( $C_1$ ) del péptido DS-HaloTag fue de  $2.4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  y calculando la concentración remanente ( $C_2$ ) del péptido DS-HaloTag en la solución acuosa, lo cual corresponde al momento de saturación de los sistemas nanoparticulados de  $BaFe_{12}O_{19}$  (140 min.) a una longitud de onda  $\lambda = 595 \text{ nm}$ , a partir de la ecuación de regresión polinomial de orden 2,  $y = 2E-05x^2 - 0.0069x + 0.7866$ , y con un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.96021$  se obtiene una concentración  $C_2 = 0.268 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; por lo tanto, la concentración absorbida de péptido DS-HaloTag por los sistemas nanoestructurados de  $BaFe_{12}O_{19}$  corresponde a  $C_1 - C_2 = 2.13 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Así, el porcentaje de péptido DS-HaloTag puede ser calculado a partir de la siguiente expresión:

$$C_{ab} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_1} \times 100$$

Ecuación 4.1

donde:

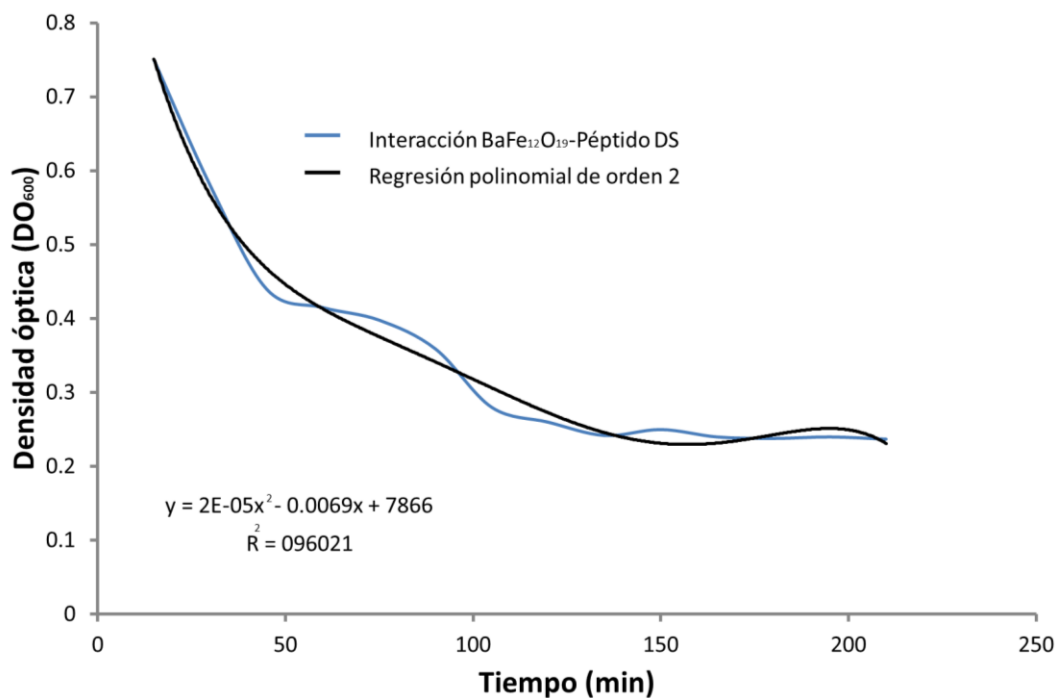
$C_{ab}$  = % absorción de DS-HaloTag sobre los sistemas de  $BaFe_{12}O_{19}$

$C_1$  = concentración inicial de DS-HaloTag

$C_2$  = concentración remanente de DS-HaloTag en solución acuosa

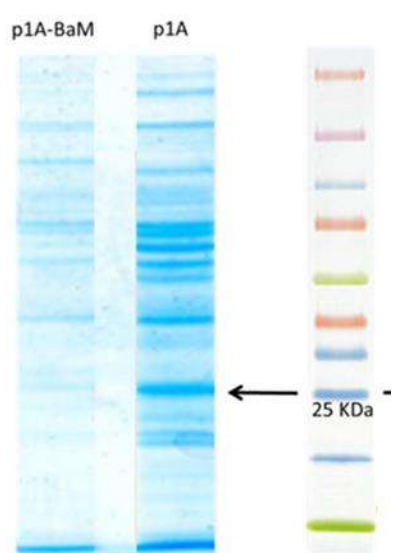
Por lo tanto:

$C_{ab} = 87.5 \%$



**Figura 4.21.** Interacción  $BaFe_{12}O_{19}$ -DS-HaloTag. La disminución en los valores de DO a medida que el tiempo transcurre indica la absorción del péptido por los agregados de  $BaFe_{12}O_{19}$ .

Una vez saturados los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ , se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución acuosa que contiene el péptido DS, a los cuales se les agrego 5.0  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis. La mezcla se llevó a ebullición por 10 min, para ser cargada en un gel de poliacrilamida. La Fig. 4.22 muestra una electroforesis de un gel SDS-PAGE llevada a cabo a 200 V por 40 min. La Fig. 4.28(a) muestra la interacción entre los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  y el plásmido pFN1A T7 Flexi® y advierte como la concentración de la proteína (columna izquierda) decrece (la intensidad de las bandas se ve disminuida), lo cual indica que el péptido DS es absorbido por los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ .

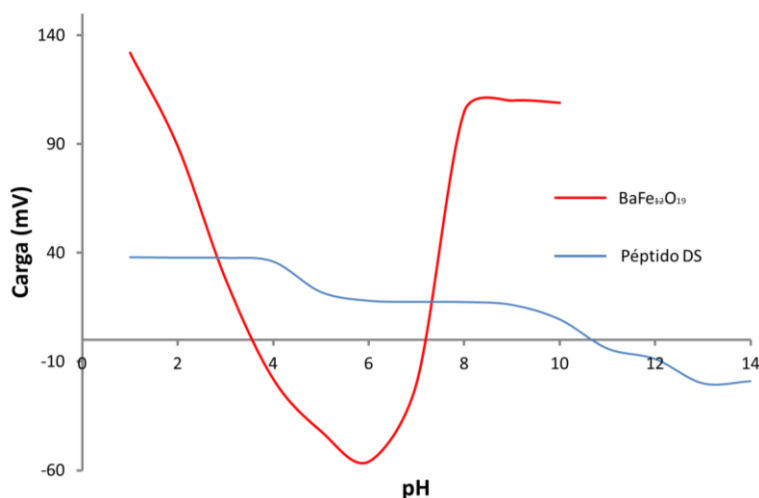


**Figura 4.22.** Análisis visual SDS-PAGE de la interacción  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ -DS-HaloTag que muestra cómo disminuye la cantidad de proteína libre en el medio.

Adicionalmente, el análisis FTIR mostrado en la Fig. 4.14 confirma que el péptido DS-HaloTag fue absorbido por los sistemas nanoparticulados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . El espectro IR mostrado en la Fig. 4.19 exhibe los enlaces/grupos funcionales del péptido DS a  $355.08\text{ cm}^{-1}$ ,  $545.03\text{ cm}^{-1}$ ,  $616.03\text{ cm}^{-1}$ ,  $699.26\text{ cm}^{-1}$  y  $873.33\text{ cm}^{-1}$ . Puede ser observado que el enlace/grupo funcional a  $873.33\text{ cm}^{-1}$  aparece en los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  cargados con el péptido, lo que confirma su absorción por el sistema; así mismo, el enlace/grupo funcional que aparece a  $309.84$

$\text{cm}^{-1}$  en los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  pudiera corresponder al observado en el péptido DS-HaloTag por la proximidad que éste presenta. Por otra parte, los enlaces/grupos funcionales a  $545.03 \text{ cm}^{-1}$ ,  $616.31 \text{ cm}^{-1}$  y  $699.26 \text{ cm}^{-1}$  que no aparecen en los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  cargados con el péptido pudieran corresponder a la parte de la proteína de bajo peso molecular, lo cual puede estar de acuerdo con los resultados mostrados en la Figura, puesto que el gel de poliacrilamida (10%) revela que en la interacción  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ -DS-HaloTag los péptidos que en su mayoría son absorbidos, son aquellos que corresponden a un peso molecular grande.

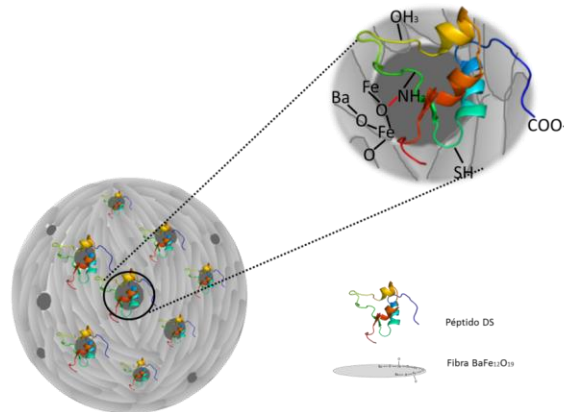
La absorción del péptido DS-HaloTag sobre los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  puede ser explicada a partir del hecho de que el potencial zeta (Fig. 4.23) del sistema nanoestructura de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ,  $\zeta \text{ BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ , tiene un valor negativo, a un pH de 7.4 (pH al cual se llevó a cabo la interacción), mientras que la carga superficial del péptido DS,  $\zeta \text{ DS}$ , al mismo pH tiene un valor positivo.



**Figura 4.23.** Carga superficial (mV) en función del pH para el péptido DS-HaloTag y los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ .

Además, el péptido DS presenta residuos de aminoácidos (aa) hidrofóbicos (Alanina (A), Fenilalanina (F), Glicina (G), Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Prolina (P), Valina (V), Triptófano (W)) e hidrofílicos (Cisteína (C), Asparagina (N), Glutamina (Q), Serina (S), Treonina

(T), Tirosina (Y)); y tomando en cuenta que  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  en solución acuosa puede formar hidroxilos (grupos OH) que pueden reaccionar con los radicales (R) de los aminoácidos, se propone un modelo (Fig. 4.24) de las posibles interacciones entre los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  y el péptido DS-HaloTag.

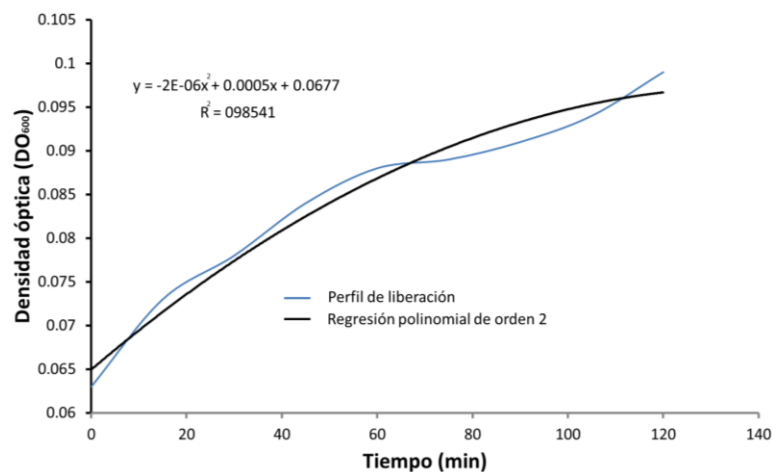


**Figura 4.24.** Modelo propuesto para las posibles interacciones  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ -DS-HaloTag

La Fig. 4.25 muestra el perfil de liberación del péptido DS-HaloTag de los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  cuando éstos fueron colocados en medio de cultivo F12K bajo una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a 37 °C. Es bien sabido que entre mayor sea la diferencia de potencial zeta,  $\zeta$ , coexistirá una mayor atracción entre partículas de carga superficial opuesta. Por lo tanto, como puede ser observado en la gráfica de carga superficial, los valores de pH a los cuales se promovería una mayor absorción de péptido DS-HaloTag sobre los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  estarían en pH 5.8-6. Sin embargo, se decidió trabajar a un valor de pH 7.4, debido a que la solución acuosa en la cual se encuentra el péptido DS-HaloTag originalmente tiene este valor. Otras razones por las cuales se optó trabajar con este valor, es que al pH 7.4 sigue existiendo una carga superficial opuesta entre el péptido DS-HaloTag y los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ , mientras que una disminución en el valor de pH pudiera provocar una desnaturalización de la proteína. Una vez incubado en medio F12K bajo



condiciones de 5% CO<sub>2</sub> y temperatura de 37 °C, el CO<sub>2</sub> tiene la función de contrarrestar la alcalinización del medio debido a la actividad metabólica propia de las células en cultivo, y una variación de pH hacia lo ácido o lo básico hace que el péptido sea liberado por parte de los sistemas nanoparticulados de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub>. El medio F12K es un medio celular que fue desarrollado principalmente para células de hepatocito humano, así también para células de hígado de rata y pollo en un ambiente de suero reducido. Para el presente estudio se trabajó con medio F12K incompleto libre de células con la finalidad de verificar que el péptido DS-HaloTag fuera liberado precisamente al hecho de que el CO<sub>2</sub> acidifica el medio causando variaciones en el potencial zeta,  $\zeta$ , de cada uno de los integrantes de la mezcla, es decir, los sistemas nanoestructurados de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> y el péptido DS-HaloTag.



**Figura 4.25.** Perfiles de liberación del péptido DS-HaloTag que muestra un aumento de la DO<sub>600</sub> a medida que transcurre el tiempo (t). El aumento en los valores de la DO<sub>600</sub> indica que el péptido DS-HaloTag es liberado de los sistemas nanoestructurados de BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub>.

El uso de un diseño experimental fraccionario  $2^f$  nos permite evaluar el efecto que tienen determinados parámetros sobre una variable de respuesta. Específicamente, para este trabajo de

investigación, las variables  $\phi_{\text{agregado}}$ ,  $S_{\text{BET}}$ ,  $V_{\text{mesoporo}}$  y  $\phi_{\text{macroporo}}$  fueron evaluadas a partir del efecto de la temperatura y presión en el proceso de secado por aspersión, y la concentración de agente porógeno utilizado durante la síntesis sol-gel. A partir de los datos estadísticos arrojados por el análisis de varianza ANOVA, se establece qué parámetros tienen un efecto significativo sobre la variable de respuesta. De esta manera, el diseño experimental fraccionario  $2^f$  nos permitirá optimizar el proceso de síntesis de los agregados nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  para obtener la morfología y estructura deseada, lo cual, a su vez, tendrá un efecto sobre las propiedades físicas, químicas y magnéticas del producto final.

El uso de las técnicas XRD, SEM, TEM, BET, FTIR y VSM proporcionó detalles necesarios en cuanto a la caracterización estructural, morfológica y magnética de los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . Así, a partir de los espectros de XRD fue observada la presencia de tres fases: la fase hexagonal  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ , la monoferrita de bario  $\text{BaFe}_2\text{O}_4$  y la fase hematita  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , cuya coexistencia fue confirmada por TEM. Las propiedades magnéticas ( $M_s$ ,  $M_r$  y  $H_c$ ) determinadas a partir de las curvas de histéresis obtenidas a partir de un VSM, son afectadas por la morfología y estructura macro-mesoporosa (observada por SEM y BET), así como la mezcla de fases presentes en los agregados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . Las propiedades magnéticas, sobre todo un comportamiento superparamagnético, es perseguido para aplicaciones biomédicas tal como los sistemas DDS, debido a que esta característica permite dirigir y focalizar un fármaco a un sitio específico de acción mediante la aplicación de un campo magnético externo. Por lo tanto, la concentración y número de dosificaciones puede ser reducida, disminuyendo los efectos secundarios no deseados.

Las características obtenidas en el presente trabajo de investigación hacen de los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  un candidato como sistema de liberación de fármacos. Esto fue corroborado al evaluar la capacidad de carga de los sistemas de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  al ser cargados con el péptido DS usado como fármaco modelo. La capacidad de carga, así como el perfil de liberación del péptido fueron evaluados por técnicas de espectroscopia UV-vis, FTIR, SDS-PAGE, potencial zeta y análisis tipo Western blot. El porcentaje de absorción del péptido fue del péptido fue de 87.5%.

## CAPÍTULO 5

---

---

## CONCLUSIONES

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

- 1- Agregados esféricos nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  de 1.7  $\mu\text{m}$  con tamaño de macroporo de 223 nm y tamaño de mesoporo entre 3.4 y 12 nm fueron diseñados y sintetizados exitosamente usando un diseño experimental  $2^f$  a través del método sol-gel y secado por aspersión.
- 2- Mediante un análisis estadístico de varianza ANOVA se determinó que la presión ( $P$ ) es el único factor significativo que afecta el tamaño de agregado de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . Por otra parte, ningún parámetro evaluado en el diseño  $2^f$  tuvo un efecto significativo sobre el tamaño de macroporo. Sin embargo, el área superficial específica BET se vio afectada por la concentración de agente porógeno ( esferas de PS) así como las combinaciones presión-porógeno y temperatura porógeno. Por último, los factores que mostraron un efecto significativo sobre el volumen de mesoporo fueron la presión, y las combinaciones entre presión-porógeno y temperatura porógeno.
- 3- La saturación magnética  $M_s$  de los agregados  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  varió entre 14.24-45.11 emu/g y los valores de coercitividad  $H_c$  estuvieron entre 194.65-4277.50 Oe. Mostrando un comportamiento magnético semiduro con valores de  $M_s = 14.24$  y  $H_c = 194.63$  Oe para la muestra calcinada a 700 °C.
- 4- A partir del plásmido pF1A T7 de la cepa T7 de *E. coli*, fue posible sintetizar el péptido DS mediante la inducción con IPTG 2mM. Por otra parte, también fue posible la síntesis del péptido DS a través de la transfección de células CHO en cultivo celular con el vector pFN21K. Así mismo, fue posible la inmunodetección del péptido DS mediante la utilización de anticuerpos monoclonales anti-HaloTag. El péptido DS tiene gran probabilidad de bloquear el dominio intracelular de Notch (NICD) que es un activo en células cancerígenas.
- 5- La capacidad de absorción del péptido DS sobre los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  fue del 87.5%.

## TRABAJO A FUTURO Y RECOMENDACIONES

La capacidad de carga y perfil de liberación del péptido DS fue probado en el presente trabajo de investigación. Por lo tanto, la formulación empleada para el diseño y síntesis de los sistemas nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ , hacen de estos sistemas un candidato para ser aplicados como sistemas de liberación de fármaco. Sin embargo, debido a que la biocompatibilidad es un requisito fundamental para ser aplicados en los sistemas biológicos, es imprescindible realizar estudios de citotoxicidad, ya sea *in vitro* o *in vivo*; por ejemplo, los ensayos MTT, los cuales se basan en la capacidad de las células viables para reducir y convertir la sal de tetrazolio. Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, compuesto relativamente incoloro, en formazan, una sustancia fuertemente lipofílica de color morado. El ensayo MTT es considerado como una prueba de viabilidad que trabaja eficientemente en la mayoría de los casos, por lo tanto, es frecuentemente usada por si sola para evaluar la citotoxicidad *in vitro*, particularmente para evaluación de citotoxicidad en las nanopartículas.

Así mismo, se recomienda realizar estudios sobre la modificación superficial de los agregados nanoestructurados de  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ; por ejemplo, a través de la PEGilación, el cual es un proceso de unión tanto covalente como no covalente de polietilenglicol (PEG) hacia la molécula o estructura a modificar. O bien, la modificación superficial pudiera llevarse a cabo empleando algún otro tipo de molécula, ya sean polímeros, proteínas, ADN, etc. Así, la modificación superficial reducirá la inmunogenicidad y antigenicidad de la  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  empleado como sistema portador de fármaco. Además, la modificación superficial, permitirá enmascarar a la  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ , lo que le permitirá evadir el sistema retículo endotelial y aumentar el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo; por lo tanto, llegando a su sitio de acción con mayor facilidad.

## REFERENCIAS

- [1] M. Hałupka-Bryl, M. Bednarowicz, B. Dobosz, R. Krzymiński, T. Zalewski, B. Wereszczyńska, G. Nowaczyk, M. Jarek, Y. Nagasaki. Doxorubicin loaded PEG-b-poly(4-vinylbenzylphosphonate) coated magnetic iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 384 (2015) 320–327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2015.02.078>
- [2] Y. Ding, S. Z. Shen, H Sun, K. Sun, F. Liu, Y. Qi, J. Yan. Design and construction of polymerized-chitosan coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles and its application for hydrophobic drug delivery. *Materials Science and Engineering C* 48 (2015) 487–498. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.036>
- [3] X. Wang, C. Wang, S. Anderson, X. Zhang. Microfabricated iron oxide particles for tunable, multispectral magnetic resonance imaging. *Materials Letters* 110 (2013) 122–126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2013.08.004>
- [4] H. Shokrollahi, A. Khorramdin, Gh. Isapour, Magnetic resonance imaging by using nano-magnetic Particles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.06.023>
- [5] P. Periyathambi, W. S. Vedakumari, S. K. Baskar, S. Bojja, T. P. Sastry, Osteogenic potency of magnetic fibrin nanoparticles - a novel perspective in bone tissue engineering, *Materials Letters*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2014.10.045>
- [6] M. Muthunayanan, P. In-Kyu, C. Chong-Su, Surface modification of iron oxide nanoparticles by biocompatible polymers for tissue imaging and targeting, *Biotechnology Advances* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.03.005>
- [7] A. B. Salunkhe, V. M. Khot, J. M. Ruso, S.I. Patil, Water dispersible superparamagnetic cobalt iron oxide nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.06.057>
- [8] P. I. P. Soares, C. A. T. Laia, A. Carvalho, L. C. J. Pereira, J. T. Coutinho, I. M. M. Ferreira, C. M. M. Novo, J. P. Borges, Iron oxide nanoparticles stabilized with a bilayer of oleic acid for magnetic hyperthermia and MRI applications, *Applied Surface Science* <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.04.181>
- [9] S. Prijic, L. Prosen, M. Cemazar, J. Scancar, R. Romih, J. Lavrencak, V. B. Bregar, A. Coer, M. Krzan, A. Znidarsic, G. Sersa. Surface modified magnetic nanoparticles for immuno-gene therapy of murine mammary adenocarcinoma. *Biomaterials* 33 (2012) 4379-4391. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.061>
- [10] Neuberger T, Schöpf B, Hofmann H, Hofmann M, von Rechenberg B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J Magn Magn Mater* 2005; 293:483–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.01.064>
- [11] E. S. Ferro, V. Rioli, L. M. Castro, L. D. Fricker. Intracellular peptides: From discovery to function. *EuPA OPEN PROTEOMICS* 3 (2014) 143-151. <http://dx.doi.org/10.1016/euprot.2004.02.009>

- [12] A. Figuerola, R. Di Corato, L. Manna, T. Pellegrino. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacological Research* 62 (2010) 126-143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2009.12.012>
- [13] Y. Li. Production of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli* using a thioredoxin-SUMO dual fusion system. *Protein Expression and Purification* 87 (2013) 72-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2012.10.008>
- [14] Y. Li, Z. Y. Fu, B. L. Su, Hierarchically Structured Porous Materials for Energy Conversion and Storage. *Advanced Functional Materials* 22 (2012) 4634–4637. <http://dx.doi.org/10.1002/adfm.201200591>
- [15] Y-K. Seo, J. W. Yoon, J. S. Lee, Y. K. Hwang, C.-H Jun, J-S Chang, S. Wuttke, P. Bazin, A. Vimont, M. Daturi, S. Bourrelly, P. L. Llewellyn, P. Horcajada, C. Serre, G. Férey. Energy-Efficient Dehumidification over Hierarchically Porous Metal–Organic Frameworks as Advanced Water Adsorbents. *Advanced Materials* 24(6):806-10. <http://dx.doi.org/10.1002/adma.201104084>
- [16] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, T. Sen. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (2011) 24-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addj.2010.05.006>
- [17] M. Ma, Y. Zhang, W. Yu, H-Y Shen, H-Q Zhang, N. Gu. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 212 (2003) 219-226. [www.elsevier.com/locate/colsurfa](http://www.elsevier.com/locate/colsurfa)
- [18] A. K. Gupta, M. Gupta. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26 (2005) 3995–4021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>
- [19] Y. Ichihyanagi, M. Kubota, S. Moritake, Y. Kanazawa, T. Yamada, T. Uehashi. Magnetic properties of Mg-ferrite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 310 (2007) 2378–2380 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.10.737>
- [20] B. Chertok, B. A. Moffat, A. E. David, F. Yu, C. Bergemann, B. D. Ross, V. C. Yang. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials* 29 (2008) 487–496 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.050>
- [21] V. I. Shubayev, T. R. Pisanic, S. Jin. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009) 467–477 <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.007>
- [22] J. Chomoucka, J. Drbohlavova, D. Huska, V. Adam, R. Kizek, J. Hubalek. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research* 62 (2010) 144–149 <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2010.01.014>
- [23] W.-L. Tung, S.-H. Hu, D.-M. Liu. Synthesis of nanocarriers with remote magnetic drug release control and enhanced drug delivery for intracellular targeting of cancer cells. *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 2873–2882. <http://dx.doi.org/10.1016/actbio.2011.03.021>
- [24] Y. Lin, Y. Wei, Y. Sun, J. Wang. Synthesis and magnetic characterization of magnetite obtained by monowavelength visible light irradiation. *Materials Research Bulletin* 47 (2012) 614–618. <http://dx.doi.org/10.1016/j.materresbull.2011.12.042>

- [25] O.V. Yelenich, S.O. Solopan, T.V. Kolodiaznyi, V.V. Dzyublyuk, A.I. Tovstolytkin, A.G. Belous. Superparamagnetic behavior and AC-losses in NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Solid State Sciences* 20 (2013) 115-119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2013.03.013>
- [26] G-H An, T-Y Hwang, J. Kim, JinBae Kim, N Kang, S Kim, Y-M Choi, Y-H Choa. Barium hexaferrite nanoparticles with high magnetic properties by salt-assisted ultrasonic spray pyrolysis. *Journal of Alloys and Compounds* 583 (2014) 145–150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2013.08.105>
- [27] Chiemi Oka, Kazunori Ushimaru, Nanao Horiishi, Takeharu Tsuge, Yoshitaka Kitamoto. Core–shell composite particles composed of biodegradable polymer particles and magnetic iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 381 (2015) 278–284. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2015.01.005>
- [28] C. Montferrand, L. Hu, I. Milosevic, V. Russier, D. Bonnin, L. Motte, A. Brioude, Y. Lalatonne. Iron oxide nanoparticles with sizes, shapes and compositions resulting in different magnetization signatures as potential labels for multiparametric detection. *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 6150–6157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.025>
- [29] T. Lam, P. Pouliot, P. K. Avti, F. Lesage, A. K. Kakkar. Superparamagnetic iron oxide based nanoprobe for imaging and theranostics. *Advances in Colloid and Interface Science* 199–200 (2013) 95–113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2013.06.007>
- [30] Y. Chen, K. Ai, J. Liu, G. Sun, Q. Yin, L. Lu. Multifunctional envelope-type mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive drug delivery and magnetic resonance imaging. *Biomaterials* 60 (2015) 111-120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.003>
- [31] P. B. Santhosh, N. P. Ulrih. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics. *Cancer Letters* 336 (2013) 8–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.04.032>
- [32] Y. Cohen, S. Y. Shoushan. Magnetic nanoparticles-based diagnostics and theranostics. *Current Opinion in Biotechnology* 24 (2013) 1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.01.006>
- [33] S. N. Tabatabaei, H. Girouard, A-S Carret, S. Martel. Remote control of the permeability of the blood–brain barrier by magnetic heating of nanoparticles: A proof of concept for brain drug delivery. *Journal of Controlled Release* 206 (2015) 49–57 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.027>
- [34] D. Arcos, M. Vallet-Regí. Bioceramics for drug delivery. *Acta Materialia* 61 (2013) 890–911. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actamat.2012.10.039>
- [35] T. Yadavalli, S. Ramasamy, G. Chandrasekaran, I. Michael, H. A. Therese, R. Chennakesavulu. Dual responsive PNIPAM–chitosan targeted magnetic nanoparticles for targeted drug delivery. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 380 (2015) 315–320 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.09.035>
- [36] F. W. Cooke, J. E. Lemons, B. D. Ratner. Properties of materials in Biomaterials Science: An introduction to Materials in Medicine, Ratner, B.D., Homan A.S. Schoen, F.J. Lemons, J.E., (eds) Academic Press, New York, NY (1996) 11-35



- [37] A. A. Kaspar, J. M. Reichert. Future directions for peptides therapeutics development. *Drug Delivery Today* 18 (2013) 807-817. <http://dx.doi.org/10.1016/j.2013.05.011>
- [38] A. Tomitaka, T. Koshi, S. Hatsugai, T. Yamada, Y. Takemura. Magnetic characterization of surface-coated magnetic nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 323 (2011) 1398–1403 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2010.11.054>
- [39] C. S.S.R. Kumar, F. Mohammad. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (2011) 789-808. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.008>
- [40] A. M. Grumezescu. *Nanobiomaterials in Drug Delivery Applications of Nanobiomaterials*. William Andrew, Elsevier inc. 2016. Typeset by MPS Limited, Chennai, India. Chapter 1. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-42866-8.00001-0>
- [41] A. Bangham, The 1st Description of Liposomes—a Citation Classic Commentary on Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids by Bangham, A.D., Standish, M.M., and Watkins, J.C. *Current Contents/Life Sciences* 1989:14-14.
- [42] G. Gregoriadis, The carrier potential of liposomes in biology and medicine. II, *The New England Journal of Medicine*, vol. 295, no. 14, pp. 765–770, 1976. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM197609302951406>
- [43] L. Zhang and S. Granick, “How to stabilize phospholipid liposomes (using nanoparticles),” *Nano Letters*, vol. 6, no. 4, pp. 694–698, 2006. <http://dx.doi.org/10.1021/nl052455y>
- [44] V. P. Torchilin, “Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 4, no. 2, pp. 145–160, 2005. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1632>
- [45] C. Riggio, E. Pagni, V. Raffa, A. Cuschieri. Nano-Oncology: Clinical Application for Cancer Therapy and Future Perspectives. *Journal of Nanomaterials* (2011) 1-10. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/164506>
- [46] K. Hu, J. Li, Y. Shen et al., “Lactoferrin-conjugated PEG-PLA nanoparticles with improved brain delivery: in vitro and in vivo evaluations,” *Journal of Controlled Release*, vol. 134, no. 1, pp. 55–61, 2009.
- [47] J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, J. Sung, G. Luther, F. X. Gu, E. Levy-Nissenbaum, Aleksandar F. Radovic-Moreno, R. Langer, O. C. Farokhzad. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*, vol. 28, no. 5, pp. 869–876, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.047>
- [48] J. M. Chan, L. Zhang, K. P. Yuet et al., PLGA-lecithin- PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials*, vol. 30, no. 8, pp. 1627–1634, 2009.
- [49] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, and Z. Zhang, “Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, no. 15, pp. 1650–1662, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.001>
- [50] C. Oerlemans, W. Bult, M. Bos, G. Storm, J. F. W. Nijssen, and W. E. Hennink, Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release, *Pharmaceutical Research*, vol. 27, pp. 2569–2589, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-010-0233-4>

- [51] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nature Nanotechnology*, vol. 2, no. 12, pp. 751–760, 2007. <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2007.387>.
- [52] M. Reis, *Fundamentals of Magnetism*. Academic Press (2013) 74–92 Chapter 7. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-405545-2.00007-2>
- [53] P. K. Misra, *Diamagnetism and Paramagnetism Physics of Condensed Matter* (2012) 369–407. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384954-0.00012-8>
- [54] N. Magnani, *Ferromagnetism, Encyclopedia of Condensed Matter Physics* (2005) 201-210. <http://dx.doi.org/10.1016/B0-12-369401-9/01115-3>
- [55] H.R. Khana, *Ferromagnetism, Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)* Academic Press (2003) 759–768. <http://dx.doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00240-4>
- [56] D. Wagner, *Ferromagnetism, Introduction to the Theory of Magnetism International Series of Monographs in Natural Philosophy* (1972) 149–266. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-016595-0.50009-3>
- [57] L.D. Landau, E.M. Lifshitz, *Electrodynamics of Continuous Media (Second Edition Revised and Enlarged) Electrostatics of Continuous Media volume 8 in Course of Theoretical Physics* (1984) 130–179. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-030275-1.50011-4>
- [58] C-W Chen, Chapter 2– *Ferromagnetism and Ferrimagnetism. Magnetism and Metallurgy of Soft Magnetic Materials* (1977) 15–60 <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7204-0706-8.50009-5>
- [59] P.W. Selwood, *Superparamagnetism, Chemisorption and Magnetization* Academic Press (1975), 17–29. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-636560-3.50005-2>
- [60] Robert C. Pullar. Hexagonal ferrites: A review of the synthesis, properties and applications of hexaferrite ceramics. *Progress in Materials Science* 57 (2012) 1191-1334. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2012.04.001>
- [61] C. Sudakar, G. N. Subbanna, R. R. N. Kutty, Wet chemical synthesis of multicomponent hexaferrites by sol-to-crystallite conversion and their magnetic properties. *J. Magn. Magn. Materials* 263, 253-268 (2003).
- [62].Alexandru Mihai Grumezescu, *Nanobiomaterials in Drug Delivery Applications of Nanobiomaterials*. Copyright © 2016 Elsevier Inc. All rights reserved
- [63] Mangui Han, Yu Ou, Wenbing Chen, Longjiang Deng. Magnetic properties of Ba-M-type hexagonal ferrites prepared by the sol–gel method with and without polyethylene glycol added. *Journal of Alloys and Compounds* 474 (2009) 185–189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2008.06.047>
- [64] A. Szulc, L. Pulaski, D. Appelhans, B. Voit, B. Klajnert-Maculewicz. Sugar-modified poly(propylene imine) dendrimers as drug delivery agents for cytarabine to overcome drug resistance. *International Journal of Pharmaceutics* (2016). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.063>

- [65] X. Song, J-l. Zhu, Y. Wen, F. Zhao, Z-X. Zhang, J. Li, Thermoresponsive Supramolecular Micellar Drug Delivery System Based on Star-Linear Pseudo-block Polymer Consisting of  $\beta$ -Cyclodextrin-Poly(Nisopropylacrylamide) and Adamantyl-Poly(ethylene glycol), *Journal of Colloid and Interface Science* (2016), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2016.11.056>
- [66] S. Z. Vahed, R. Salehi, S. Davaran, S. Sharifi, Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells, *Materials Science & Engineering C* (2016), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.073>
- [67] S. Duggan, W. Cummins, O. O' Donovan, H. Hughes, E. Owens , Thiolated polymers as mucoadhesive drug delivery systems. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.01.008>
- [68] C. Oka, K. Ushimaru, N. Horiishi, T. Tsuge, Y. Kitamoto. Core-shell composite particles composed of biodegradable polymer particles and magnetic iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 381 (2015) 278–284. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2015.01.005>
- [69] S. Chandra, G. Noronha, S. Dietrich, H. Lang, D. Bahadur. Dendrimer Magnetic nanoparticles as multiple stimuli responsive and enzymatic drug delivery vehicle. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 380 (2015) 7–12. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.10.096>
- [70] M. Darroudi, M. Hakimi, E. Goodarzi, R. K. Oskuee. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Green preparation, characterization and their cytotoxicity effects. *Ceramics International* 40 (2014) 14641–14645. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.06.051>
- [71] T. Lam, P. Pouliot, P. K. Avti, F. Lesage, A. K. Kakkar. Superparamagnetic iron oxide based nanoprobes for imaging and theranostics. *Advances in Colloid and Interface Science* 199–200 (2013) 95–113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2013.06.007>
- [72] S. Huang, C. Li, Z. Cheng, Y. Fan, P. Yang, C. Zhang, K. Yang, J. Lin. Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@mesoporous silica composites for drug delivery and bioadsorption. *Journal of Colloid and Interface Science* 376 (2012) 312–321 doi. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2012.02.031>
- [73] S.F. Medeirosa, A.M. Santosa, H. Fessi, A. Elaissari. Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics* 403 (2011) 139–161 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.011>
- [74] J. Chomoucka, J. Drbohlavova, D. Huska, V. Adam, R. Kizek, J. Hubalek. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research* 62 (2010) 144–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2010.01.014>
- [75] A. B. D. Nandiyanto, K. Okuyama. Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges. *Advanced Powder Technology* 22 (2011) 1-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apt.2010.09.011>
- [76] J. Liu, Y. Cai, Y. Deng, Z. Sun, D. Gu, B. Tu, D. Zhao. Magnetic 3-D ordered macroporous silica templated from binary colloidal crystals and its application for effective removal of microcystin. *Microporous and Mesoporous Materials* 130 (2010) 26–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.10.008>

- [77] E. Santamaría, A. Maestro, M. Porras, J.M. Gutiérrez, C. González. Controlled release of ibuprofen by meso-macroporous silica. *Journal of Solid State Chemistry* 210 (2014) 242–250. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssc.2013.11.031>
- [78] S. Wang. Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials* 117 (2009) 1–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.07.002>
- [79] M. Mustapić, M.S. Al Hossain, J. Horvat, P. Wagner, D.R.G. Mitchell, J.H. Kim, G. Alici, Y. Nakayama, B. Martinac, Controlled Delivery of Drugs Adsorbed onto porous Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Structures by Application of AC/DC Magnetic Fields, *Microporous and Mesoporous Materials* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.12.03>
- [80] H. Yang, S. Liao, C. Huang, L. Du, P. Chen, P. Huang, Z. Fu, Y. Li. Facile one-pot approach to the synthesis of spherical mesoporous silica nanoflowers with hierarchical pore structure. *Applied Surface Science* 314 (2014) 7–14. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.06.128>
- [81] D. Lewandowski, M. Cegłowski, M. Smoluch, E. Reszke, J. Silberring, G. Schroeder. Magnetic mesoporous silica Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@meso-SiO<sub>2</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@meso-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> as adsorbents for the determination of trace organic compounds. *Microporous and Mesoporous Materials* 240 (2017) 80-90. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.11.010>
- [82] U. Anjaneyulu and U. Vijayalakshmi, Preparation and Characterization of Novel sol-gel derived Hydroxyapatite/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> composites coatings on Ti-6Al-4V for biomedical applications, *Materials Letters*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2016.11.078>
- [83] G. J. Owens, R. K. Singh, F. Foroutan, M. Alqaysi, C-M Han, C. Mahapatra, H-W Kim, J. C. Knowles. Sol-gel based materials for biomedical applications. *Progress in Materials Science* 77 (2016) 1–79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.12.001>
- [84] Samuel Krimm. Interpreting Infrared Spectra of Peptides and Proteins. *ACS Publications* 3 (1999) doi: 10.1021/bk-2000-0750.ch002

## ANEXOS

### CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

#### CURRICULUM VITAE ÚNICO

TORRES CADENAS, SAMUEL

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

### ARTÍCULOS

- 2017; S. Torres-Cadenas, J. Reyes-Gasga, A. Bravo-Patiño, I. Betancourt, M.E. Contreras-García, Morphological and magnetic properties of sol-gel synthesized meso and macroporous spheres of barium hexaferrite ( $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ), *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* (2017), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2017.02.018>
- 2016; S. Torres, A. Bravo, M.E. Contreras.  $\text{BaO}6\text{Fe}_2\text{O}_3$  as DDS using tetracycline as model drug. *IOSR Journal of Engineering (IOSRJEN)* 11 (2016) 20-24. [http://www.iosrjen.org/pages/volume6-issue11\(part-1\).html](http://www.iosrjen.org/pages/volume6-issue11(part-1).html)
- 2016; S. Torres-Cadenas, A. Bravo-Patiño, J. Zarate-Medina, M.E. Contreras-García, Nest-Like Barium Hexaferrite Microspheres With Hierarchical Porous Structure for Drug Delivery, *Journal of Silicate Based and Composite Materials*

### PARTICIPACIONES EN CONGRESOS

- 2016; **Esferas Bioceramicas de  $\text{BaO} \cdot 6\text{Fe}_2\text{O}_3$  con Estructura Tipo Nido**, Nacional, **VIII Congreso Nacional de Cristalografía. II reunión de la Sociedad Latinoamericana de Cristalografía**, A Bravo-Patiño, V.S. López-Álvarez, M.E. Contreras-García, Mérida, Yucatán.
- 2016; **Nest-Like Barium Hexaferrite Microspheres With Hierarchical Porous Structure for Drug Delivery**, Extranjero, **4<sup>th</sup> International Conference on Competitive Materials and Technology Processes**, A. Bravo-Patiño, M. E. Contreras-García, Miskolc-Lillafured, Hungary.
- 2015;  **$\text{BaO} \cdot 6\text{Fe}_2\text{O}_3$  A Vehicle for Drug Delivery**, Extranjero, **14<sup>th</sup> International Union of Materials Research Societies-International Conference on Advanced Materials**, Alejandro Bravo Patiño, Humberto Contreras Cornejo, José Antonio Rodríguez Torres, María Eugenia Contreras García, Rep. Popular Democrática Corea.
- 2014;  **$\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  as Drug Delivery Vehicle: A Morphological and Structural Studio**, Nacional, **18<sup>th</sup> International Microscopy Congress**, Alejandro Bravo Patiño, Victor Sayil López Álvarez, María Eugenia Contreras García, México.

- 2014; **BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> Como Sistema Nanoestructurado para Liberación de Fármacos**, Nacional, **AMIDIQ “La Interdisciplinariedad en la Ingeniería Química”** Alejandro Bravo Patiño, José Antonio Rodríguez Torres, María Eugenia Contreras García, México.
- 2013; **BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> Nanoparticles – A scheme for Drug Delivery**, Internacional, **12<sup>th</sup> Inter-American Microscopy Congress**, Alejandro Bravo Patiño, José Antonio Rodríguez Torres, María Eugenia Contreras García, México.
- 2013; **Escuela de Materia Condensada y Nanociencia**, Nacional, **International Multidisciplinary Joint Meeting. Nanociencia and Condensed Matter Physis**, México.
- 2013; **IV Foro de Vinculación Universidad-Industria**, Nacional, **VIII Escuela de Materiales y Nanotecnología**, México.
- 2013; **Magnetic Nanoparticles Engineered To Drug Delivery**, Internacional, **XXII International Materials Research Congress**, Alejandro Bravo Patiño, María Eugenia Contreras García, México.
- 2013; **Microscopía Electrónica de Barrido con FE SEM y Técnicas EDS**, Extranjero, **12th Inter-American Microscopy Congress**, Colombia.

## Accepted Manuscript

Morphological and magnetic properties of sol-gel synthesized meso and macroporous spheres of barium hexaferrite ( $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ )

S. Torres-Cadenas, José Reyes-Gasga, A. Bravo-Patiño, I. Betancourt, M.E. Contreras-García

PII: S0304-8853(16)32862-1

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2017.02.018>

Reference: MAGMA 62474

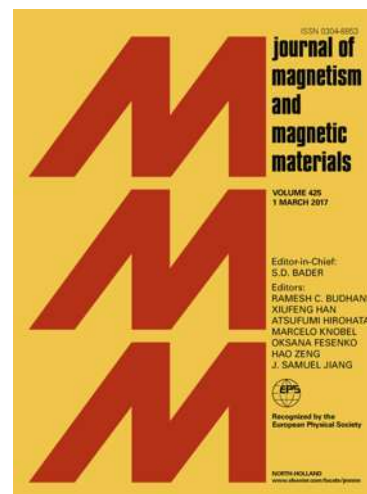
To appear in: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*

Received Date: 31 October 2016

Accepted Date: 11 February 2017

Please cite this article as: S. Torres-Cadenas, J. Reyes-Gasga, A. Bravo-Patiño, I. Betancourt, M.E. Contreras-García, Morphological and magnetic properties of sol-gel synthesized meso and macroporous spheres of barium hexaferrite ( $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ), *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* (2017), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2017.02.018>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



**MORPHOLOGICAL AND MAGNETIC PROPERTIES OF SOL-GEL SYNTHETIZED MESO AND MACROPOROUS SPHERES OF BARIUM HEXAFERRITE (BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub>)**

**S. Torres-Cadenas<sup>a</sup>, José Reyes-Gasga<sup>b,\*</sup>, A. Bravo-Patiño<sup>c</sup>, I. Betancourt<sup>d</sup>, M. E. Contreras-García<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Instituto de Investigaciones Metalúrgicas y Materiales, UMSNH, Edificio U, Ciudad Universitaria, Santiago Tapia 403, Colonia Centro 58030, Morelia, México. Email: [storres\\_c@hotmail.com](mailto:storres_c@hotmail.com), [eucontre@gmail.com](mailto:eucontre@gmail.com).

<sup>b</sup>Instituto de Física, UNAM, Circuito de la Investigación s/n, Ciudad Universitaria. 04510 Coyoacán, México, D.F., México. Email: [jreyes@fisica.unam.mx](mailto:jreyes@fisica.unam.mx)

<sup>c</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB) de la FMVZ, UMSNH, Posta Zootécnica, Km. 8.5 carretera Morelia-Zinapequaro, C.P. 58890 col. La Palma, Tarimbaro, Michoacán. México. Email: [brapal@hotmail.com](mailto:brapal@hotmail.com)

<sup>d</sup>Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, Ciudad de México, C.P. 04510, México. Email: [israelb@iim.unam.mx](mailto:israelb@iim.unam.mx)

**\*Corresponding Author**

Dr. José Reyes-Gasga  
Instituto de Física, UNAM,  
Circuito de la Investigación s/n,  
Ciudad Universitaria.  
04510 Coyoacán, México, D.F., México.  
Tel. (5255) 56225083  
Email: [jreyes@fisica.unam.mx](mailto:jreyes@fisica.unam.mx)



**Highlights**

- 1.5  $\mu\text{m}$  porous spheres of  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  were synthesized by the sol-gel method.
- Surfactant Tween20 ( $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ ) enabled the creation of the mesoporous structure.
- Polystyrene spheres (PS) were used as the template for the formation of macropores.
- Spheres resembled a nest or ball-of-yarn type of elongated  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  crystals.
- Magnetic properties are evaluated as function of the calcination temperature.

**Abstract**

Porous spherical aggregates of barium hexaferrite ( $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ) with 1.5  $\mu\text{m}$  in diameter were synthesized by the surfactant-assisted sol-gel method. The surfactant Tween20 ( $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ ), which enables mesoporous structures, as well as polystyrene spheres (PS), as the template agent for the formation of macropores, were used. Two synthetic routes (hereafter named A and B), whose difference was the absence or presence of PS, were followed for synthesis. X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) in high resolution mode (HRTEM) were used for characterization. Size and morphology of the spheres were similar in both cases and they resemble a nest or ball-of-yarn type structure. Pore size and  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  crystal size produced by the two routes are different. The magnetic properties of the spheres were evaluated using a vibrating sample magnetometer (VSM) as function of the calcination temperature. The spheres present ferromagnetic behavior in both routes.

**Key words:** Barium hexaferrite, Porous spherical aggregates, Surfactant-assisted sol-gel synthesis, Morphological properties, Magnetic properties.

## 1. Introduction

In recent decades, ceramic materials represent a prominent alternative in scientific and technological development in a wide range of research fields. Specifically, biomedical ceramic materials have been used in orthopedic applications, dental implants, tissue regeneration and as drug delivery systems [1]. Iron-oxide-based materials, including barium hexaferrite ( $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ), are good Drug Delivery System (DDS) candidates [2-4] because of their physical, chemical and magnetic properties. These magnetic properties are highly necessary for response to an external magnetic field to target, for example, the drug into a specific site in the human body. Moreover, the  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  magnetic microparticles with spherical morphology have different applications, such as permanent magnets [5], electronic devices [6], gas sensors [7], catalytic supports [8] and more recently in biomedical applications, such as advanced functional magnetic materials for the treatment of cancer through magnetic hyperthermia [9], contrast agents for MRI [10] and drug delivery systems [11].

A variety of methods have been used for the synthesis of iron-oxide-based bioceramics including co-precipitation, hydrolysis, hydrothermal synthesis, inverse microemulsion and the sol-gel method [12-14]. Of these methods, sol-gel has attracted special interest because it allows the development of new materials with good homogeneity and purity [15-17]. In addition, it is a relatively fast, simple and inexpensive method. Moreover, the kinetics of the chemical reactions carried out in the synthesis is easily controlled by low temperatures processing [17]. Unlike classical methods for powder ceramic processing of  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  that require high calcination temperatures (1200-1300 °C), sol-gel produces the  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  microparticles at rather low calcination temperature [18]. In addition, the use of surfactant-assisted sol gel synthesis allows more disperse systems, enabling the formation of a larger number of ordered structures and the surfactant allows the formation of micelles that also act as templates, resulting in the formation of mesopores after elimination of the surfactant by calcination during the thermal treatment.

Surfactant-assisted sol-gel synthesis, as structure-directing agents or dispersants, and templates, as macropore-forming agents, is investigated in this work for the production of ceramic microstructures designed with hierarchical porosity for biomedical applications that require highly specific surface areas and the unique design of materials capable of conducting fluids and interacting with cell tissues. Among the materials designed for these applications, pore size distribution and their interconnectivity determine the viability of the material for a such specific application.

Therefore, in the present study  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  spherical magnetic macro- and mesoporous microparticles were synthesized by the surfactant-assisted sol-gel method, as well as polystyrene spheres (PS) as templates for formation microspheres, and dried by spray drying. The morphological characterization and magnetic properties of the spheres are compared as a function of thermal treatment temperature.

## 2. Materials, method and experimental procedure

### 2.1 Materials

Commercial reagent grade products were used without purification. The reagents were from Aldrich: iron nitrate (III) nonahydrate  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , barium carbonate  $\text{BaCO}_3$ , and surfactant Tween20, and from Merck: ammonium hydroxide  $\text{NH}_4\text{OH}$ . The hydrophilic nonionic surfactant Tween20 ( $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ ) is an ester of polyoxyethylene sorbitan, with a molecular weight of 1225 Daltons calculated assuming 20 units of ethylene oxide, 1 sorbitol, and lauric acid as the primary fatty acid. Monodisperse Polystyrene microspheres (PS) synthesized in the laboratory were used as the pore-forming agent.

### 2.2 Synthesis of $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$

Spheres of barium hexaferrite were synthesized by the sol-gel method either assisted by surfactants (route A) or assisted by surfactants and templates (route

B). Figure 1 shows the flow diagram of routes A and B. Two suspensions were prepared in each route. The first was composed of  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{BaCO}_3$  salts with a stoichiometric molar ratio dissolved in deionized water. The second was formed by the surfactant Tween20 in aqueous solution. Both suspensions were mixed with constant magnetic stirring and, during the reaction, the pH of the slurry was adjusted to 8 with  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Route B included a third suspension consisting of 30 wt% polystyrene spheres in deionized water. The PS were monodispersed, with a mean diameter of 200nm. The PS suspension was added to the mixture with constant magnetic stirring for 1h.

The resulting suspension was subjected to spray drying, using a Mini Spray Dryer (Yamato, ADL31). The conditions in the spray drying equipment for both routes were determined by experimental design as: drying temperature ( $T = 175\text{ }^\circ\text{C}$ ) and drying pressure ( $P = 1.5\text{ Kg/cm}^2$ ).

Powders obtained after spray drying (xerogels) were subjected to thermal treatment for the elimination of organic agents, surfactant and template (in each case), structural water, the formation of oxides and crystallization. Four different temperatures were evaluated in both routes for thermal treatment: 700, 800, 900 and 1000  $^\circ\text{C}$ .

### *2.3 Structural, morphological, chemical and magnetic characterization*

Structural, chemical and morphological analysis of the spheres was performed by X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) in high resolution mode (HRTEM).

Samples were analyzed by X-ray diffraction on a Bruker diffractometer model D8 Advance using  $\text{Cu K}\alpha$  radiation (45 kV, 30 mA) to determine the crystal structures and phases presented. Samples were scanned from  $20^\circ$  to  $80^\circ$  in  $2\theta$  and a constant step of  $0.02^\circ/\text{seg}$ .

For microstructural characterization of the samples, the scanning electron microscope JEOL JSM-7600F and the transmission electron microscope FEG

Phillips Technai F20 were used. The SEM was coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy equipment (EDS).

The Digital Micrograph software (Gatan, Inc.) was used for image analysis, and the linear Lynx software (Verfügbare Software) was used for the statistical analysis of the data. Size distribution of the pores in the spherical aggregates was measured by the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) technique using a Quantachrome (St 1 on NOVA touch 1LX) instrument.

The analysis of the magnetic properties of the samples was performed using a vibrating sample magnetometer (VSM LDJ 9600) at room temperature, applying a constant magnetic field of 5000 Oe. Magnetic saturation ( $M_s$ ), remnant magnetization ( $M_r$ ) and coercivity ( $H_c$ ) values were obtained from the hysteresis curves.

### 3. Results

#### 3.1 X-ray diffraction

Figure 2 shows the x-ray diffraction spectra of the samples obtained from routes A and B at the calcination temperatures of 700, 800, 900 and 1000 °C, as indicated in Figure 1.

Indexing the x-ray spectra indicates the coexistence of hexaferrite H =  $BaFe_{12}O_{19}$ , monoferrite O =  $BaFe_2O_4$  and hematite F =  $Fe_2O_3$  in all samples. The phase H (hexaferrite) is hexagonal (Open Database Crystallography card, COD, No. 1008841) with lattice parameters  $a = b = 0.589$  nm and  $c = 2.318$  nm. The O (monoferrite) phase is orthorhombic (COD card No. 4107896) with lattice parameters  $a = 1.899$  nm,  $b = 0.538$  nm,  $c = 0.844$  nm. The F (hematite) phase is hexagonal (COD card No. 9015964) with lattice parameters  $a = b = 0.503$  nm and  $c = 1.374$  nm. It is noteworthy that at the calcination temperature of 1000 °C the major phase is H phase, in both routes.

As shown in Figure 2, the content of the H phase increases as the content of the F phase decreases with temperature in both routes. In route A, the O phase is present in all samples; in route B, the O occurs phase only in the sample treated at 700 °C. However, there is no clear evidence of preferential growth direction of any phase in the XRD spectra.

### *3.2 SEM images, EDS spectra and spheres and pores size*

SEM images indicate that all the samples obtained in routes A and B, calcined at different temperatures, are spherical and substantially the same size. Figure 3 shows the SEM image of the spheres obtained in route A and the insert, which shows a magnification of these spheres, indicates that the spheres are polycrystalline composed of mesopores and elongated nanometric crystals. Figure 4 shows the SEM image of the spheres obtained through route B and the insert shows that these spheres are also polycrystalline, composed of meso- and macropores and micrometric elongated crystals.

Figure 5 shows the size distribution of the spheres observed in the samples of routes A (Figure 5A) and B (Figure 5B) thermally treated at 700 °C, respectively. Although the average size is slightly different for the samples calcined at different temperatures, all these values are within the range indicated by the standard deviation, at about 1.5 microns. Therefore, all the spherical aggregates are practically the same size. The aggregate size is the result of the droplet size produced in the nozzle of the spray dryer, although the size can also be influenced by the rheology of the gel slurry fed to the spray dryer.

Figure 6 shows the size distribution of the pores in the spherical aggregates of routes A and B. For the mesoporous range, as mentioned above, this size distribution was measured by the BJH technique. In Figure 6A, for the samples of route A, the average diameter of the pores in these samples are on the order of  $5.7 \pm 2$  nm. Figure 6B shows the case of the mesopores observed in the spheres obtained by route B; they are on the order of  $12 \pm 5.5$  nm. The macropores in the

spheres of route B have an average size of about  $220 \pm 53$  nm (Figure 6C). This last result is logical because the suspension fed in route B consists of spheres of monomodal polystyrene whose average size is of about 250 nm, in addition to the gel.

The micrometric-size spheres obtained by route A and route B are both composed of elongated crystals, or fibers, but these crystals are of nanometric size for route A, while they are of  $35 \pm 7$  nm wide and  $300 \pm 80$  nm long for route B. The existence of an interconnected hierarchical pore structure in these spheres is evident.

EDS spectra from the spheres showed the characteristic peaks of barium (Ba), iron (Fe) and oxygen (O) (Figure 7) [19]. In these spectra, the Cu peak comes from the sample holder. Therefore, the composition of spheres obtained by both routes contains the same elements, as already shown by XRD. This results also confirm that no contamination was present in either route.

### 3.3 TEM images

Figure 8 shows some of the HRTEM images of the elongated crystals which conform the spheres obtained in routes A and B. Note the nanometric size of the elongated crystals of  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ . In some cases, the coexistence of crystals of  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  with crystals of  $\text{BaFe}_2\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  were observed. These images agree quite well with the results obtained by XRD and show the coexistence of a mixture of phases in the synthesized spheres in both routes.

### 3.4 Hysteresis loops and magnetic properties

One way to measure the magnetic properties is through the hysteresis loops, which affords the evaluation of macroscopic properties such as saturation magnetization,  $M_s$ , remanence magnetization,  $M_r$ , and coercive field. These properties define the soft or hard magnetic character of the synthesized materials.



Figure 9 shows the hysteresis loops at different calcination temperatures for the samples obtained by the route A (Figure 9A) and the route B (Figure 9B). The highest magnetization values are observed in the case of route B. Table 1 shows the magnetic properties of all the samples. In general,  $M_s$ ,  $M_r$  and  $H_c$  show an increment as a function of the calcination temperature, and coercivity ( $H_c$ ) increases with temperature in all the samples. The lowest value of  $M_r$  is obtained in the sample treated at 800 °C for route A. In route B, the lowest  $M_r$  value is obtained for the sample treated at 700 °C. There is also a clear change in the magnetic behavior associated with the temperatures of the calcination treatment. This change must be related to the percentage of content of the different phases presented in the samples, and it must also be related to the size of the crystals constituting the spherical aggregates.

From Figure 9A and based on the values of coercivity shown in Table 1, the samples obtained in the route A at temperatures of 700, 800 and 900 °C behave as semi-hard magnetic materials, whereas the one obtained at 1000 °C behaves as a hard magnetic material. The shape of the hysteresis loop in the sample at 900 °C is characteristic of a sample in which two phases coexist. On the other hand, Figure 9B indicates that only the material obtained at 700 °C through route B behaves as a semi-hard magnetic material; the others show hard magnetic material behavior. The semi-hard ferromagnetic behavior in these materials makes them good candidates for biomedical applications [20].

#### 4. Discussion

The results clearly indicate that we succeed in developing a route for the synthesis of porous spheres of barium hexaferrite with different pore sizes. The porous structures are of great interest in research because of their prominent applications in different fields of science [21]. For example, they can be used to charge an adequate amount of different types of molecules (i.e. drugs, proteins and/or peptides) within the interior of the pore (and also on the surface of the structure) thus acting as a drug carrier system [22]. Mesopores are useful in applications

where interaction with fluids is part of the integration process in which molecules will be exchanged in the system, as in the case of drug delivery. Macropores allow the adsorption of large molecules, such as proteins or peptides, or even cells that are currently of great interest in the development of new medical treatments based on the 'in situ' drug delivery such as magnetofection [23], gene therapy [24] and cell labeling [25].

In obtaining macropores, the surface charge of the PS spheres and steric factors play an important role in the self-assembly of  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  precursor ions into the PS particles [26]. Pores in the spherical aggregates are consequently produced when the system is subjected to thermal treatment (700, 800, 900 and 1000 °C) resulting in the pyrolysis of the surfactant and the PS. Thus, the  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  precursor ions are adsorbed into the PS surface, being embedded within the micrometer size spherical aggregate during the spray drying. This reaction can be considered a typical polymerization reaction, which means that polymerization takes place between  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  and PS particles contained in an aqueous phase [27]. As a result, the PS/ $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  hybrid particles are obtained.

In regard to magnetic behavior, the hysteresis loops indicate that materials produced at temperatures of 700, 800 and 900 °C in route A fall within the range of semi-hard magnetic materials, whereas at 1000 °C the material becomes a hard magnetic material. In the case of route B, the material behaves like a semi-hard magnetic material only at 700 °C. The obtained materials behave like hard magnetic materials from 800 °C to 1000 °C. Analysis of the structural composition of the spheres indicated that monoferrite (O) and hematite (F) phases are present. However, the H phase is the major phase at the calcination temperature of 1000 °C.

As shown in Table 1, a significant change occurred as function of calcination temperature in the magnetic properties of the samples. This change has also to be related to the presence of the different phases. Best combinations of magnetic properties were:  $M_s = 44.67$  emu/g and  $H_c = 4790.12$  Oe for route A; and  $M_s = 45.11$  emu/g and  $H_c = 4791.46$  Oe for route B, respectively.

The coexistence of the H, O and F phases has been reported as a general fact in obtaining barium hexaferrite [28]. The O phase presents an anomalous resonance near 400 °C that could indicate a phase with magnetic behavior [29]. The F phase has anti-ferromagnetic ordering [30], and thus, a characteristic low  $M_s$  (11.05 emu/g) [31-33]. Therefore, for route B, it is possible to attribute the observed  $M_s$  variations to the variable content of this phase, so that, the sample with greater amount of  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (at 700 °C) presents a very low value of  $M_s$ . Decreasing presence of  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (by progressively increasing the temperature), increases the proportion of the hexaferrite phase and consequently, the  $M_s$  values are significantly recovered. In route A, the larger value of  $M_s$  is coupled with a larger value of  $H_c$ , which must be attributed to the presence of a large amount of hexaferrite phase. By contrast, in the route B, the largest value of  $M_s$  of the sample sintered at 1000 °C does not imply a larger value of  $H_c$  (which is recorded for the sample sintered at 900 °C), which is most like due to significance differences in particle size between the two phases. Samples with  $H_c > 4000$  Oe can be considered as materials with hard magnetic behavior.

Therefore, it seems in this study, a larger amount of the  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  phase obtained at lower temperatures contributes to a decrement in the magnetic properties, resulting in semi-hard magnetic behavior, while an increment in hard magnetic behavior can mainly be attributed to a decrement in the amount of the  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  phase, as the  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  phase increases.

## 5. Conclusions

Porous spherical aggregates of barium hexaferrite ( $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ) of approximately 1.5  $\mu\text{m}$  in diameter and 200 nm pores were obtained by the sol-gel chemical synthesis method using polystyrene (PS) as the pore-forming agent. The morphology of the spheres resembles a nest or ball-of-yarn type structure in which the crystals belong to the barium hexaferrite phase, as the major phase, in coexistence with the monoferrite ( $\text{BaFe}_2\text{O}_4$ ) and hematite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) phases. However, the barium hexaferrite phase is the major phase at the calcination temperature of 1000 °C. The magnetic properties of the spheres indicate that the samples calcined at 700 °C present semi-hard magnetic behavior, suggesting they would be good candidates for use in biomedical applications.

## Acknowledgements

We thank to V. S. López Alvarez and A. Rodríguez Torres for the technical support. STC acknowledges the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) by scholarship and CIC-UMSNH for the financial support to this research.

## References

- [1] J. Chevalier, L. Gremillard, Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years, *J. Eur. Ceram. Soc.* 29 (2009) 1245–1255.
- [2] C. Oka, K. Ushimaru, N. Horiishi, T. Tsuge, Y. Kitamoto, Core–shell composite particles composed of biodegradable polymer particles and magnetic iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery, *J. Magn. Magn. Mater.* 381 (2015) 278–284.
- [3] S. Chandra, G. Noronha, S. Dietrich, H. Lang, D. Bahadur, Dendrimer-magnetic nanoparticles as multiple stimuli responsive and enzymatic drug delivery vehicle, *J. Magn. Magn. Mater.* 380 (2015) 7–12.
- [4] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, T. Sen, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 63 (2011) 24–46.
- [5] G.H. An, T.Y. Hwang, J. Kim, J.B. Kim, N. Kang, S. Kim, Y. M. Choi, Y.H. Choa, Barium hexaferrite nanoparticles with high magnetic properties by salt-assisted ultrasonic spray pyrolysis, *J. Alloy. Compd.* 583 (2014) 145–150.
- [6] M. Choi, S. Cho, Y. Song, S. Baek, H. Kim, J. Jung, H. Lee, C. Park, S. Park, Y. Kim, Synthesis and characterization of hollow BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> submicron spheres for advance functional magnetic materials, *Curr. Appl. Phys.* 14 (2014) 1208-1211.
- [7] X. Xu, J. Park, Y.K. Hong, A.M. Lane, Ethylene glycol assisted spray pyrolysis for the synthesis of hollow BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> spheres, *Mater. Lett.* 144 (2015) 119–122.
- [8] P. Ren, J.G. Guan, X.D. Cheng, Influence of heat treatment conditions on the structure and magnetic properties of barium ferrite BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> hollow microspheres of low density, *Mater. Chem. Phys.* 98 (2006) 90–94.
- [9] X. Xu, J. Park, Y.K. Hong, A.M. Lane, Synthesis and characterization of hollow mesoporous BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> spheres, *J. Solid State Chem.* 222 (2015) 84–89.

- [10] L. Junliang, L. Ping, Z. Xingkai, P. Dongjun, Z. Peng, Z. Ming, Synthesis and properties of single domain sphere-shaped barium hexa-ferrite nano powders via an ultrasonic-assisted co-precipitation route, *Ultrason. Sonochem.* 23 (2015) 46–52.
- [11] M. Choi, S. Cho, Y. Song, D. Choi, S. Park, Y. Kim, Novel synthesizing method of BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> micro rod and its superior coercivity with shape anisotropy, *Mater. Letter.* 139 (2015) 292–295.
- [12] G. Nabiyouni, D. Ghanbari, A. Yousofnejad, M. Seraj, A sonochemical-assisted method for synthesis of BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> nanoparticles and hard magnetic nanocomposites, *J. Ind. Eng. Chem.* 20 (2014) 3425–3429.
- [13] A.F. Arif, R. Balgis, T. Ogi, T. Mori, K. Okuyama, Experimental and theoretical approach to evaluation of nanostructured carbon particles derived from phenolic resin via spray pyrolysis, *Chem. Eng. J.* 271 (2015) 79–86.
- [14] G.G. Nedelcu, A. Nastro, L. Filippelli, M. Cazacu, M. Iacob, C. Oliviero Rossi, A. Popa, D. Toloman, M. Dobromir, F. Iacomì, Structural characterization of copolymer embedded magnetic nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 352 (2015) 109–116.
- [15] J.D. Wright and N.A.J.M. Sommerdijk, *Sol-Gel Materials Chemistry and Applications. Series Advanced Chemistry Texts*, CRC Press, USA, New York, 2005.
- [16] A.C. Pierre, *Introduction to Sol-Gel Processing*. Ed. Kluwer Academic Publishers, Boston/London, 2002.
- [17] Z. Min-Jian, X. Guo-Ging, M. Hong-Liang, Z. Jiong, Y. Zhong-Yue, H. Zheng-Ming, Influence of citric acid content on magnetic properties of BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> powder prepared by sol-gel auto-combustion method, *J. Shanghai University (English Edition)*, 11 (2007) 263–267.
- [18] A. Ataie, A. Mali, Characteristics of barium hexaferrite nanocrystalline powders prepared by a sol-gel combustion method using inorganic agent, *J. Electroceram.* 21 (2008) 357-360.

- [19] A. Ghasemi, R.S. Alam, A. Morisako, Preparation and magnetic properties of hexagonal barium ferrite films using BaM nanoparticles, *Physica B* 403 (2008) 2987-2990.
- [20] D. Niarchos. Magnetic MEMS: key issues and some applications, *Sensor. Actuat. A-Phys.* 109 (2003) 166-173.
- [21] A. Bayu, D. Nandiyanto, S.G. Kim, F. Iskandar, K. Okuyama, Synthesis of spherical mesoporous silica nanoparticles with nanometer-size controllable pores and outer diameters, *Micropor. Mesopor. Mater.* 120 (2009) 447–453.
- [22] K. Okuyana, M. Abdullah, I.W. Lenggoro, F. Iskandar. Preparation of functional nanostructured particles by spray drying, *Adv. Powder Technol.* 17 (2006) 587–611.
- [23] C. Plank, O. Zelohati, O. Mykhaylyk, Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospect, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 63 (2011) 1300-1331.
- [24] V.I. Shubayev, T.R. Pisanic, S. Jin, Magnetic nanoparticles for theragnostics, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 61 (2009) 467-477.
- [25] D. Arunbabu, T. Jana, Charged polystyrene nanoparticles: Role of ionic comonomers structures, *J. Colloid Interf. Sci.* 361 (2011) 534–542.
- [26] H. Zhoua, T. Shia, X. Zhoua, Preparation of polystyrene/SiO<sub>2</sub> microsphere via Pickering emulsion polymerization: Synergistic effect of SiO<sub>2</sub> concentrations and initiator sorts, *Appl. Surf. Sci.* 266 (2013) 33–38.
- [27] A. Javidan, M. Ramezani, A. Sobhani-Nasab, S.M. Hosseinpour-Mashkani, *J. Mater. Sci.: Mater. Electron.* 26 (2015) 3813-3818.
- [28] Y. Chung, S.K. Lim, C.K. Kim, Y.H. Kim, C.S. Yoon, Synthesis of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles embedded in polyimide, *J. Magn. Magn. Mater.* 272-276 (2004) E1167-E1168.
- [29] M. Tadić, N. Čitaković, M. Panjan, Z. Stojanović, D. Marković, V. Spasojević, Synthesis, morphology, microstructure and magnetic properties of hematite submicron particles, *J. Alloy. Compd.* 509 (2011) 7639–7644.
- [30] S. Kamali, N. Shahmiri, J.S. Garitaonandia, J. Ångström, M. Sahlberg, T. Ericsson, L. Häggström, Effect of mixing tool on magnetic properties of hematite nanoparticles prepared by sol–gel method, *Thin Solid Films* 534 (2013) 260–264.

[31] H. Hao, D. Sun, Y. Xu, P. Liu, G. Zhang, Y. Sun, D. Gao, Hematite nanoplates: Controllable synthesis, gas sensing, photocatalytic and magnetic properties, *J. Colloid Interf. Sci.* 462 (2016) 315–324.

[32] M. Chirita, I. Grozescu, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-nanoparticles, physical properties and their photochemical and photoelectrochemical applications. *Chem. Bull. "Politehnica" Univ. (Timisoara)* 54 (2009) 1-8.

[33] N.A. Frey, S. Peng, K. Cheng, S. Sun, Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage, *Chem. Soc. Rev.*, 38 (2009) 2532–2542.



### Captions for figures

**Figure 1.** Flowchart of routes A and B followed for the synthesis of the barium hexaferrite spheres. The main difference between the routes is that in route B the polystyrene spheres (PS) were added for generating macropores.

**Figure 2.** XRD spectra of the samples obtained by the route A (A) and the route B (B) at the indicated calcination temperature. H =  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ , O =  $\text{BaFe}_2\text{O}_4$ , F =  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Note that at 1000 °C the phase H is the major both cases.

**Figure 3.** SEM image of the spheres obtained in the synthesis route A. The spheres are polycrystalline, consisting of elongated crystals and nano-sized mesopores. The insert shows a magnified view.

**Figure 4.** SEM image of the spheres obtained in the synthesis route B. The spheres are polycrystalline with elongated crystals of micrometer size and with meso- and macro-mesoporous structure. The insert shows a magnified view.

**Figure 5.** A) Size distribution of the spheres in samples of route A. B) Size distribution of the spheres in samples of route B.

**Figure 6.** Size distribution of the mesopores of the spheres measured by the BJH technique. A) Route A:  $5.7 \pm 2$  nm. B) Route B:  $12 \pm 5.5$  nm. C) Size distribution of the macropores in the spheres of route B: on average they are on the order of  $220 \pm 53$  nm.

**Figure 7.** EDS spectra of the spheres obtained in the route A (A) and in the route B (B). The spectra are similar for both routes and correspond to the elements Ba, Fe and O.

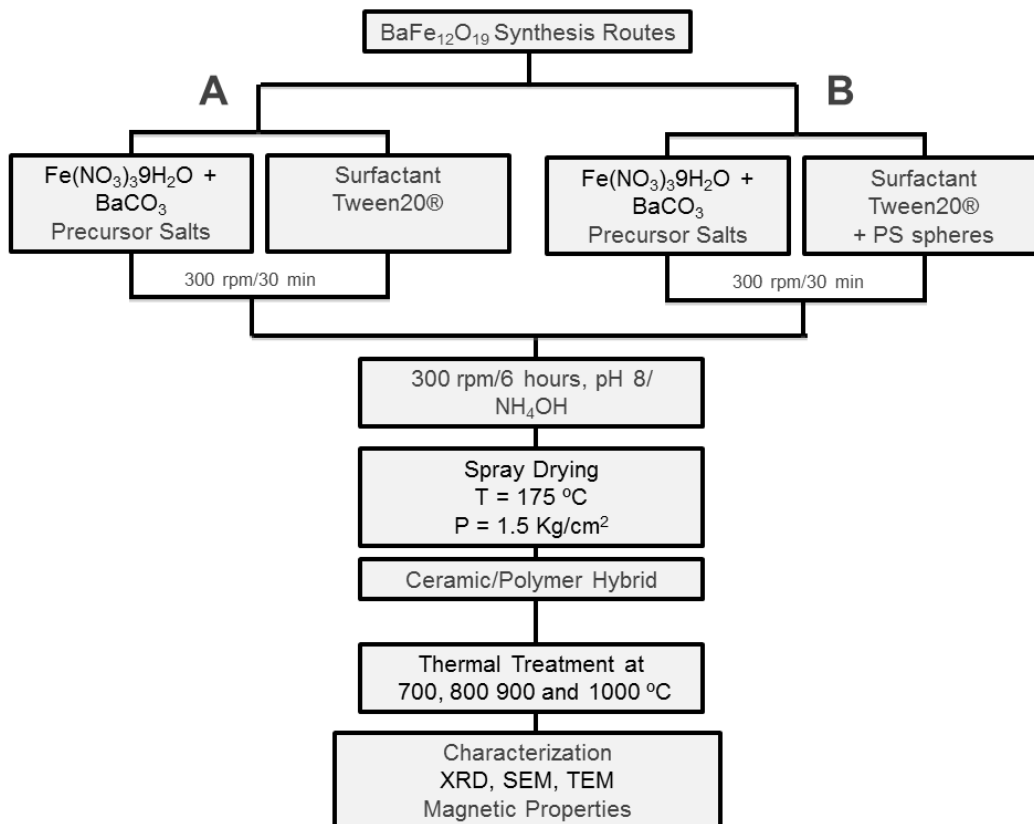
**Figure 8.** HRTEM images of the crystals of  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  that make up the spheres obtained in the routes A (A-B) and B (C-D).

**Figure 9.** Hysteresis loops registered in the samples obtained by route A (A) and route B (B) at different calcination temperatures. Note the difference in the magnetic behavior between the two routes in relation to the calcination temperature, reaching higher magnetization values in the case of route B.

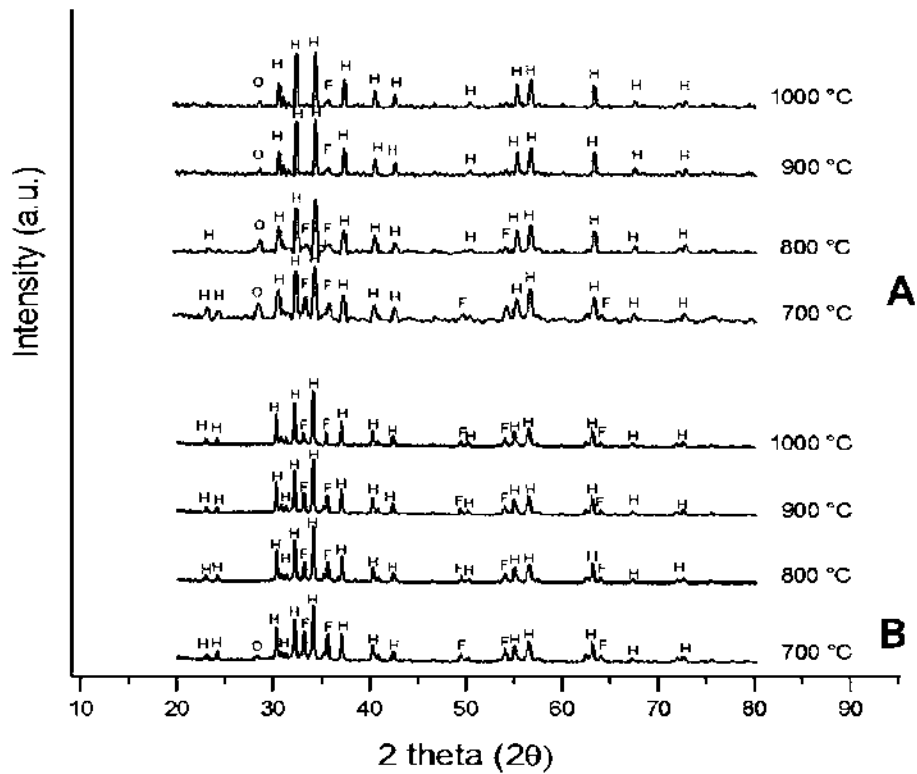
**Captions for table****Table 1.**

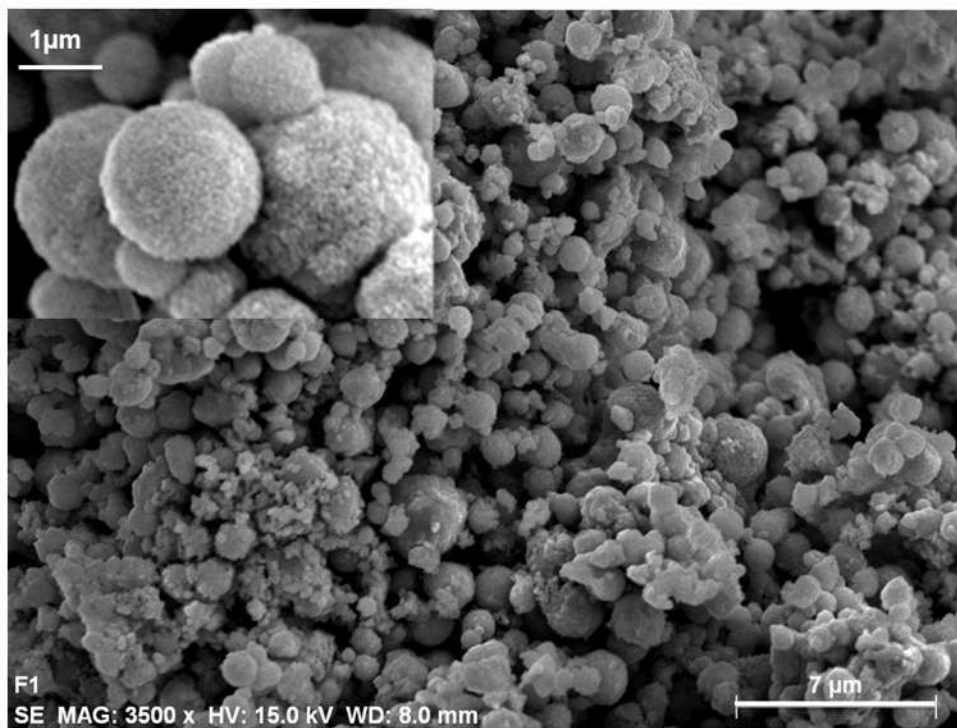
Magnetic properties of the samples calcined at different temperatures according to route A (A) and route B (B) The values were obtained from the hysteresis loops shown in Figure 9.

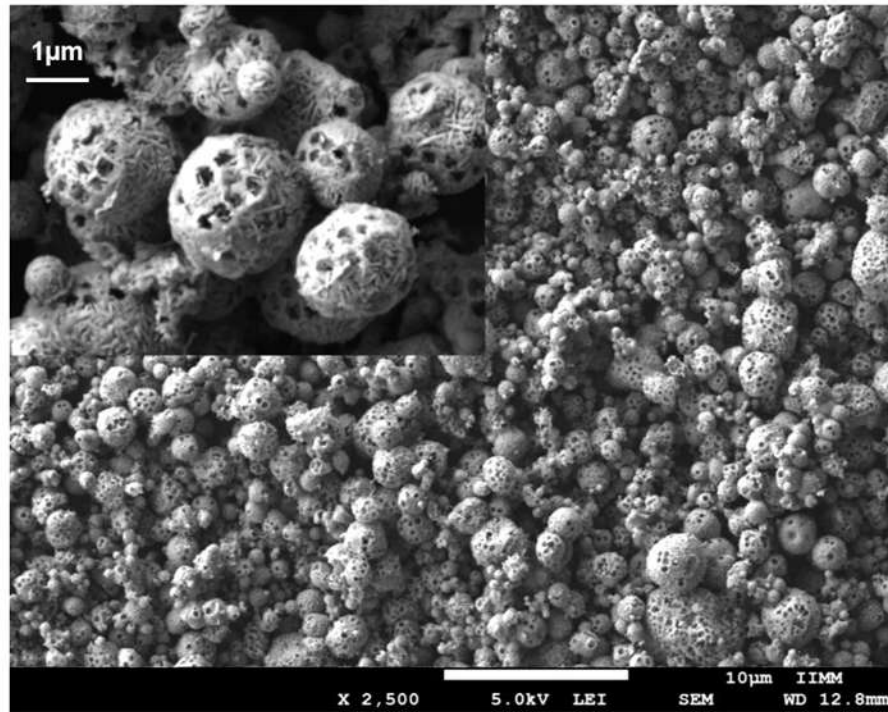
ACCEPTED MANUSCRIPT



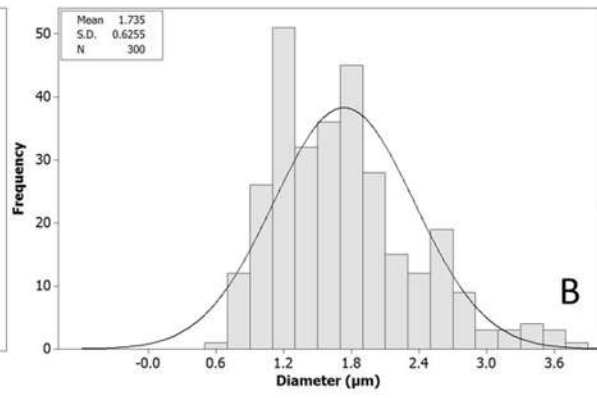
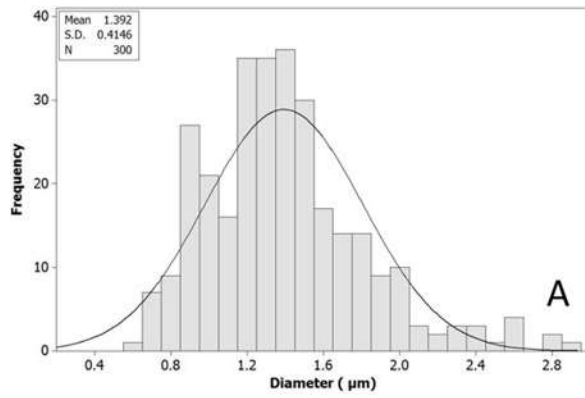
ACCEPTED



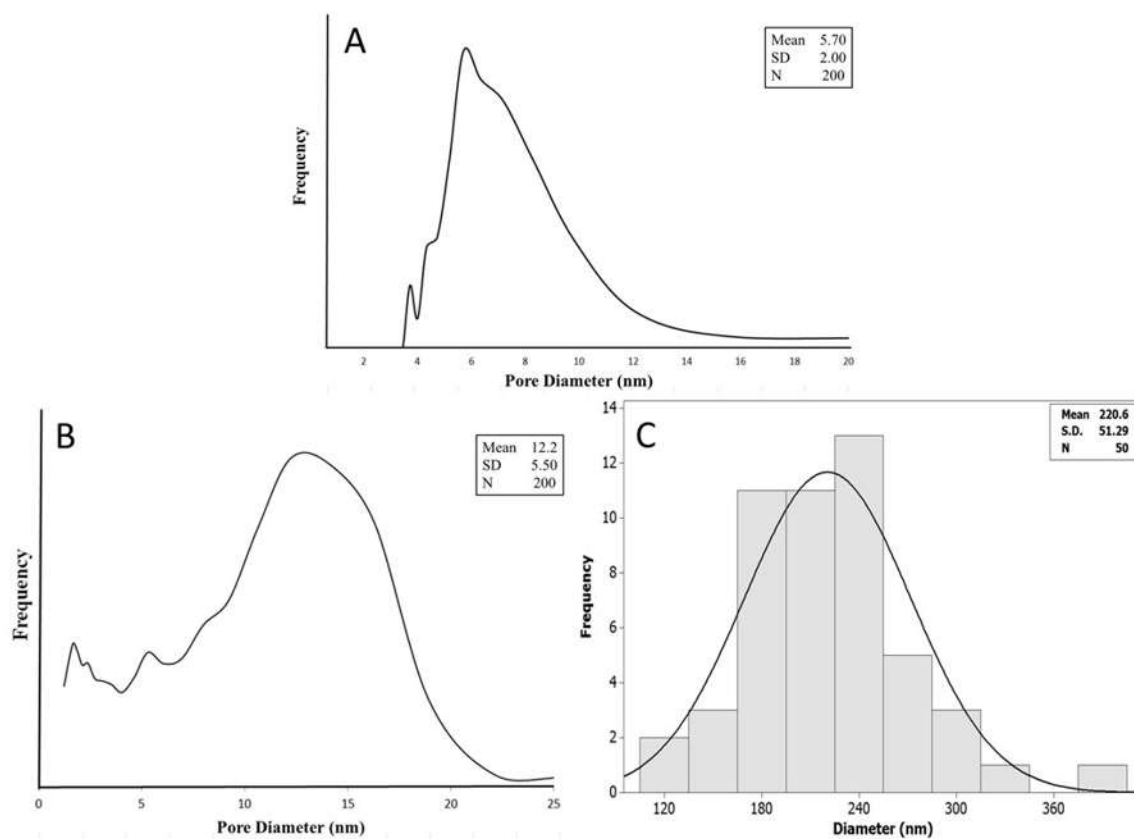




ACCEPTED

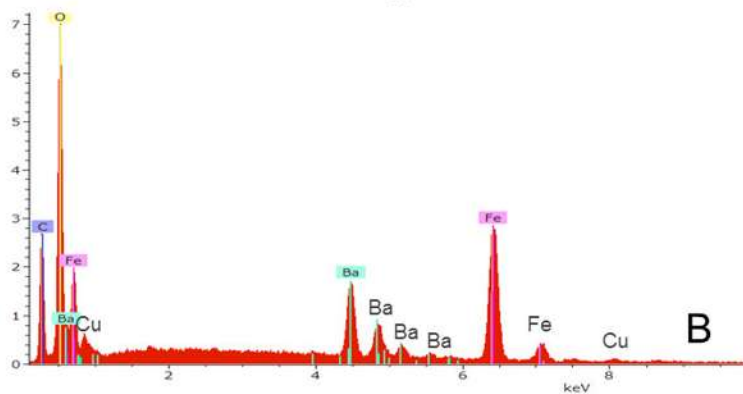
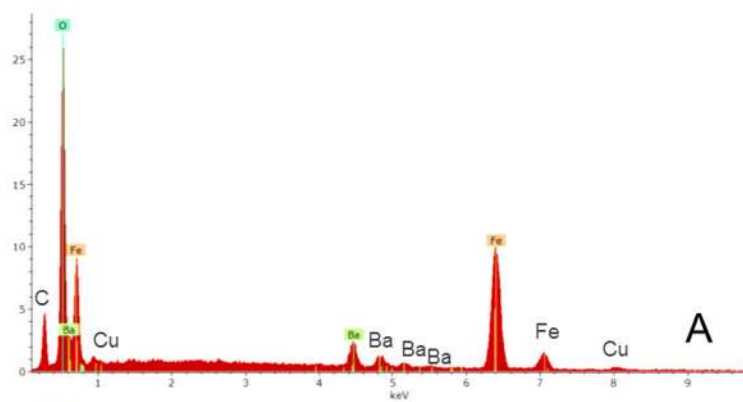


ACCEPTED

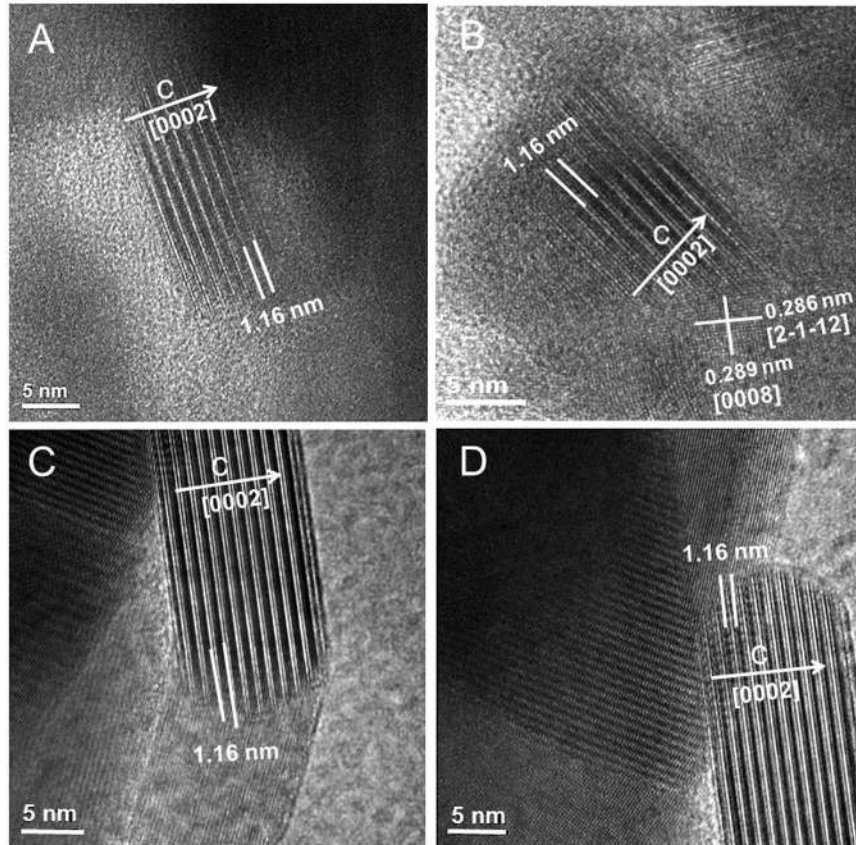


ACCEPTED

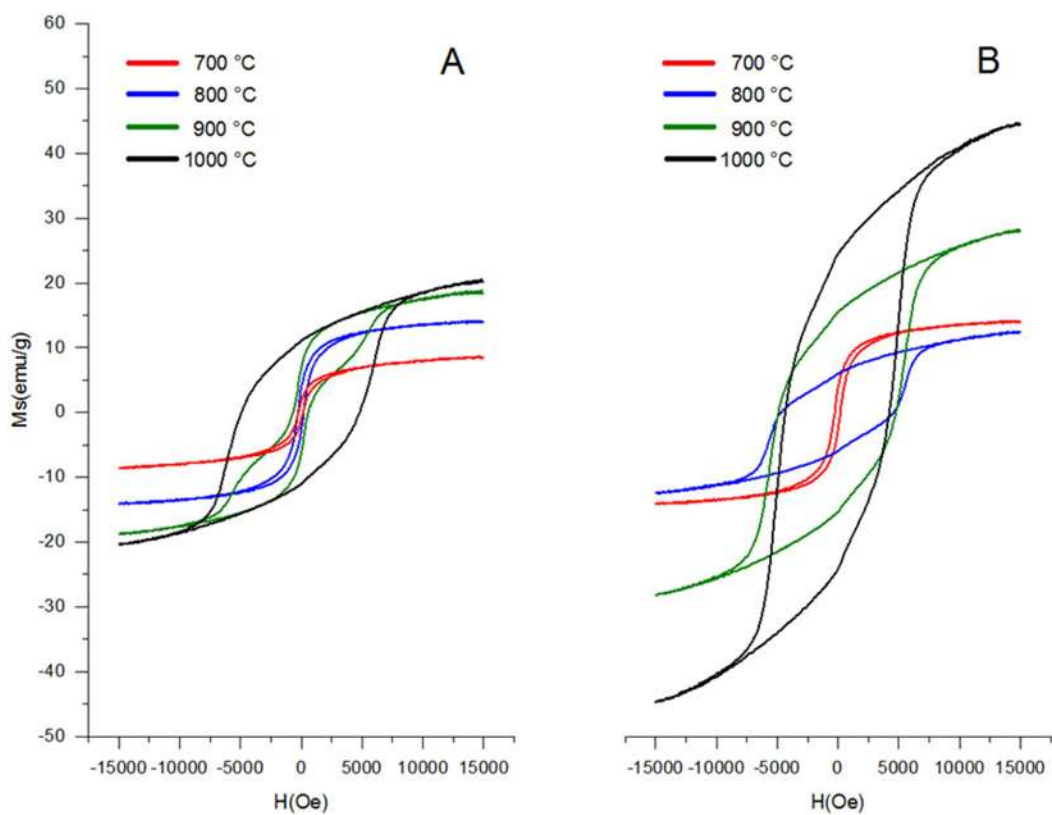




ACCEPTED



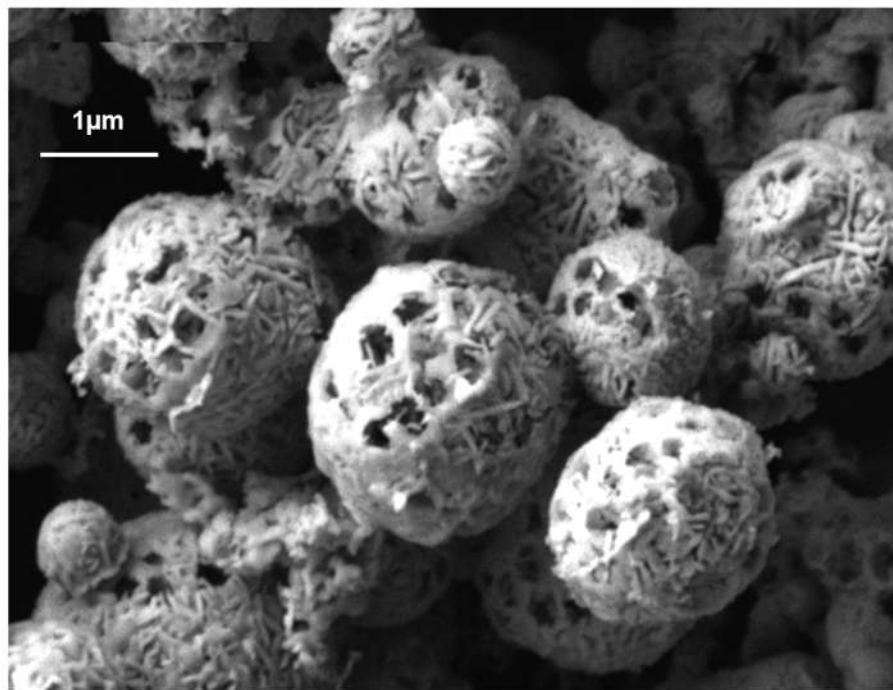
ACCEPTED



ACCEPTED

Table 1

<b>Magnetic Properties</b>				
Route	Calcination temperature (°C)	$M_s$ (emu/g)	$M_r$ (emu/g)	$H_c$ (Oe)
A	700	24.61	5.93	242.20
	800	17.28	2.73	234.51
	900	23.71	9.10	667.40
	1000	44.67	24.12	4790.12
B	700	14.24	3.79	194.65
	800	12.49	5.92	4631.60
	900	28.26	15.27	4791.46
	1000	45.11	24.10	4277.50



ACCEPTED

## MORPHOLOGICAL AND MAGNETIC PROPERTIES OF SOL-GEL SYNTHETIZED MESO AND MACROPOROUS SPHERES OF BARIUM HEXAFERRITE ( $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ )

S. Torres-Cadenas<sup>a</sup>, José Reyes-Gasga<sup>b,\*</sup>, A. Bravo-Patiño<sup>c</sup>, I. Betancourt<sup>d</sup>, M. E. Contreras-García<sup>a</sup>

### HIGHLIGHTS

- 1.5  $\mu\text{m}$  porous spheres of  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  were synthesized by the sol-gel method.
- Surfactant Tween20 ( $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ ) enabled the creation of the mesoporous structure.
- Polystyrene spheres (PS) were used as the template for the formation of macropores.
- Spheres resembled a nest or ball-of-yarn type of elongated  $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$  crystals.
- Magnetic properties are evaluated as function of the calcination temperature.

## BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> as DDS using tetracycline as model drug

S. Torres<sup>1</sup>, A. Bravo<sup>2</sup>, M.E. Contreras<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Instituto de Investigaciones Metalúrgicas y Materiales, UMSNH, Morelia, Michoacán, México)  
<sup>2</sup>(Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, UMSNH, Tarimbaro, Michoacán, México)

**Abstract:** - This paper focuses on the loading and release studies of tetracycline as model drug from spherical aggregates of micron size (approx. 1.2 μm in diameter) of barium hexaferrite (BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) synthesized from wet chemical sol-gel method via spray drying. BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aggregates were characterized using x-ray diffraction and scanning electron microscopy. The load capacity of BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> systems was reached at 40 minutes after contact with tetracycline drug. Release of tetracycline was confirmed from *E. coli* bacterial death when BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles were in contact with the bacteria.

**Keywords:** - Barium Hexaferrite, Drug Delivery System, Sol-Gel Method, Tetracycline.

### I. INTRODUCTION

In recent decades, the biomedical field has a great scientific leap; a variety of materials (for example, dendrimer, micelles, emulsions, liposomes, nanoparticle systems) [1] have been investigated as contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI), hyperthermia and drug delivery systems (DDS). Nanostructured magnetic materials are considered advanced materials for biomedical applications. Because of the prominent properties of these materials, treatments related to cancer treatment by conventional methods have been reduced; for example, the DDS are able to release the drug at a target site in a spatiotemporal manner while the concentration and number of doses of the drug is reduced. A growing interest for the use of magnetic materials based on iron oxide as DDS has been observed. In this paper loading capacity and release of tetracycline from nanostructured barium hexaferrite systems (BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) synthesized by the sol-gel and spray drying method was investigated.

### II. EXPERIMENTAL

#### BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> synthesis

Nanostructured magnetic spherical aggregates of barium hexaferrite (BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) were synthesized by molecular self-assembly by chemical sol-gel method and spray drying. In brief, salts of iron (III) nitrate nonahydrate Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich) and barium carbonate BaCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich) were dissolved in deionized water by magnetic stirring (300 rpm) for 30 min. in a molar ratio of 1:12. A second suspension formed by surfactant Tween20 (Merck) was dispersed in deionized water for 30 min. at 300 rpm. Both suspensions were mixed again by constant magnetic stirring for 6 hours. The pH of the resulting mixture was adjusted to pH 8 using ammonium hydroxide NH<sub>4</sub>OH. Then, the resulting mixture was fed a tubular drying chamber of a Mini Spray Dryer (Yamato, ADL31) through a flow of hot air as carrier gas. The process of spray drying was initiated by the generation of droplets from the colloidal suspension followed by the atomization of the liquid at a temperature T = 175 °C and a pressure P = 1.5 kg/cm<sup>2</sup>, resulting in the production of powders compounds of solid particles. Then the powder was collected by a cyclone and subjected to heat treatment of 800 °C at a heating rate of 3 °C/min for 2 hours for further characterization. Finally, the loading and release capability from the BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> systems was tested using antibiotic tetracycline as model drug.

#### BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Characterization

The powders heat treated at 800 °C after the process of spray drying were characterized using x-ray diffraction on a Bruker model D8 Advance using radiation Cu Kα (45 kV, 30 mA) and scanning electron microscopy field emission (FESEM) using a microscope JEOL JSM-7600F.

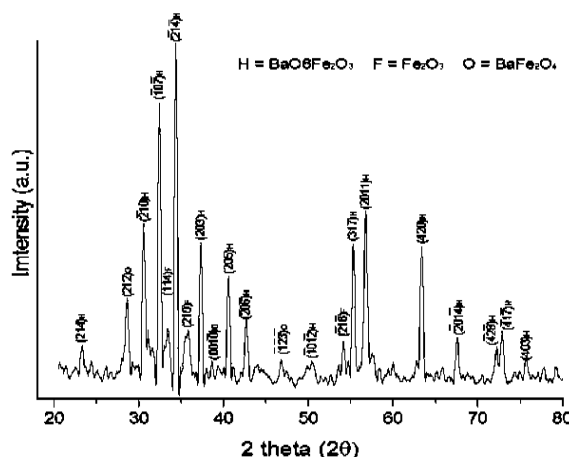
#### Loading and release study of tetracycline

The load capacity of BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> systems were determined by placing 1 mg of BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> powder in contact with a standard solution of tetracycline (10 mg/mL) in constant magnetic stirring. Tetracycline is a broad-spectrum antibiotic used to treat a number of bacterial infections, which acts by inhibiting protein synthesis. An aliquot of the tetracycline solution containing particles BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> was taken at 5 minute intervals, first allowing the precipitation of powders BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Then we analyzed the changes in optical density (OD) of the tetracycline solution using a UV-vis spectrophotometer (Cary 50 Probe spectrum, UV-vis spectra). The decrease in OD values indicated that the tetracycline was adsorbed on BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles. The

optical density measurements were taken until observing stabilization in the OD reading. Thus, indicating the maximum load of tetracycline on BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles. To perform the release studies of tetracycline from BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> systems we continued as indicate below. A hoe of the *XL1-Blue strain of Escherichia coli (Stratagene) [recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, lac19ZDM15, Tn10 cam (TCRs)]* which was distributed on LB agar solid was taken and it incubated overnight at 37 °C. Then a young colony was selected and inoculated into 2 mL of LB liquid medium incubating at 37 °C overnight at 150 rpm. Then 49 mL of LB liquid were placed in a 250 mL Erlenmeyer flask, it was added 1 mL of pre-inoculum and the BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles charged with tetracycline. A first reading of optical density was taken at OD<sub>600</sub>, which is the OD at time zero. The medium was incubated at 37 °C at 150 rpm (LAB-LINE®, incubator shaker) and at predetermined times 1 mL aliquots were taken to measure the OD<sub>600</sub> until stabilization in the OD<sub>600</sub> values. For reference in the interpretation of results, two controls were prepared. The first composed solely of LB liquid medium plus pre-inoculated. The second composed from LB liquid, pre-inoculum plus uncharged BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles. For both controls was carried out the same procedure as the test.

### III. RESULTS AND DISCUSSION

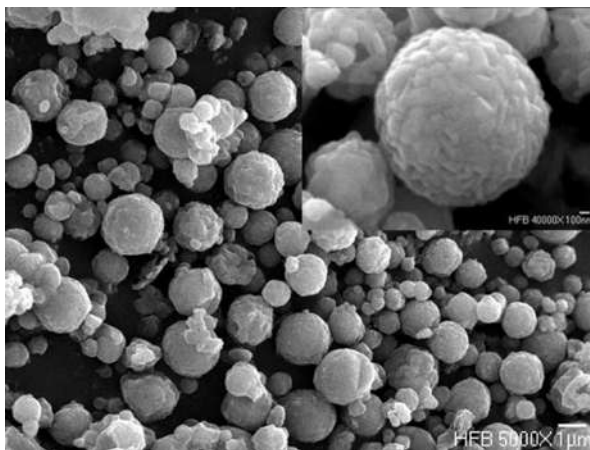
The pattern of x-ray diffraction for the sample calcined at 800 °C shown in Figure 1 indicates that the sample thus obtained is composed of a mixture are crystalline phases; mostly barium hexaferrite BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> with a hexagonal structure, together with hematite Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> having an hexagonal structure and to a lesser amount barium monoferrite BaFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> with an orthorhombic structure. Several authors [3-10] have reported the synthesis of BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> at different temperatures in which coexist a mixture similar to the phases obtained in this research or the presence of one or more different phases to those shown here. The difference in the presence of the different phases as well as the weight ratio of the phases present can be influenced by factors such as the synthesis method, type of precursor salts and their molar ratio, temperature and residence time heat treatment, among others. In general, an increase in the calcination temperature leads to increased sample crystallization and greater purity of the BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> phase as has been shown elsewhere. However, although higher temperatures can be obtained BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> higher purity, higher temperatures produce larger particle size resulting in obtaining a hard magnetic material with magnetic properties unsuitable for biomedical applications in which a superparamagnetic behavior is required because this does not retain magnetism after removal of the magnetic field [11-14].



**Fig. 1** X-ray diffraction pattern for a sample calcined at 800 °C. The XRD pattern shows the presence of three crystalline phases: H = BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, F = Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and O = BaFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

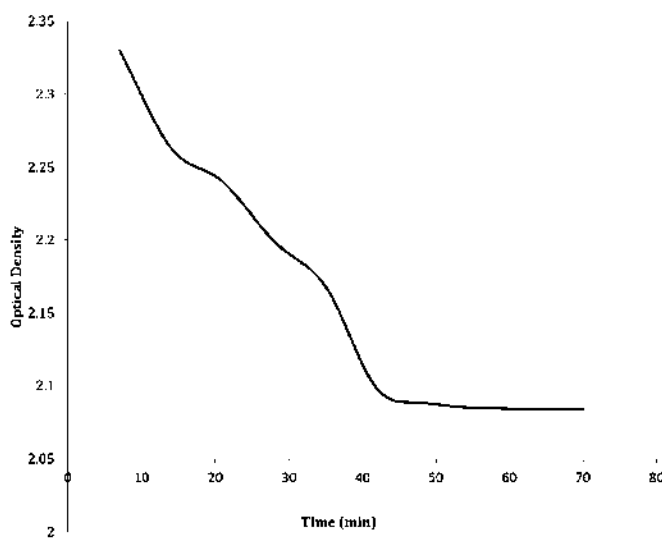
Figure 2 shows a representative SEM image in which nanostructured spherical aggregates are observed (approx. 1.2 μm in diameter). The insert in the image shows that the aggregates are formed by nanometer-sized particles (< 100 nm)





**Fig. 2** shows a representative SEM image in which nanostructured spherical aggregates are observed (approx. 1.2  $\mu\text{m}$  in diameter).

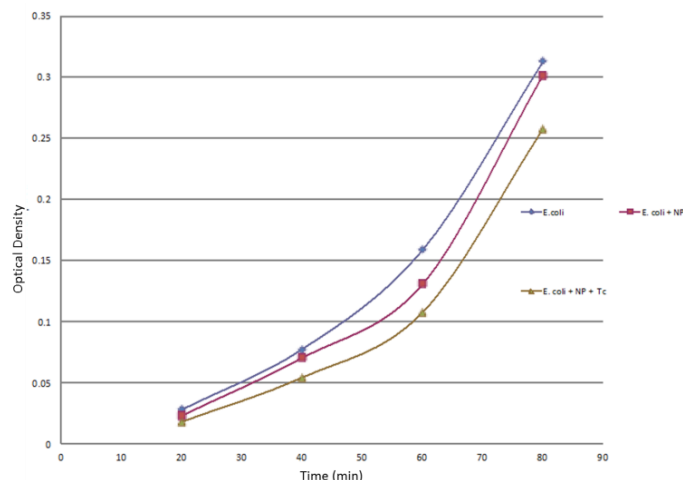
The load capacity of BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> powders was observed when analyzing the decrease in the OD values from the tetracycline solution in contact with BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles. The tetracycline concentration of 10 mg/mL ensures killing bacteria when in contact. Figure 3 shows the decrease in OD values when the tetracycline solution kept in contact with the BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles. This indicates that tetracycline was adsorbed by particles of BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Furthermore, it can be seen from the graph that at 60 min the BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles have adsorbed all possible tetracycline, reaching their saturation.



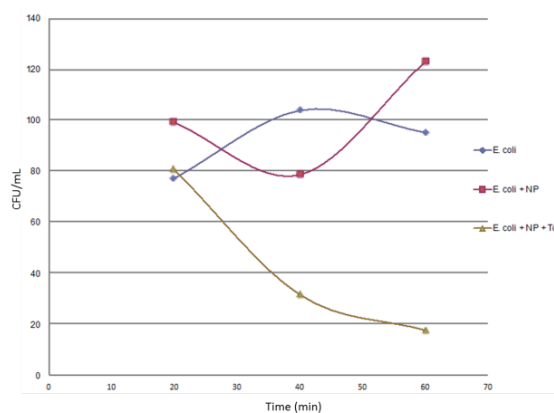
**Fig. 3** variation in optical density values indicating the absorption of tetracycline on BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> systems

After the BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles were loaded with tetracycline, these were placed in a culture medium for *E. coli* in order to test the release of tetracycline. Figures 4 and 5 show the effect of the BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles loaded with tetracycline on growth of bacteria. The decrease in the OD of the culture medium of *E. coli* indicates inhibition and death of the bacteria. In Figure 4, a decrease in OD values were seen when the bacteria was in contact with the BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles loaded with tetracycline as well as the uncharged BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles. However, the decrease in OD was more remarkable when the bacteria come in contact with BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles loaded with tetracycline. Figure 5 shows the growth curve expressed in colony forming units CFU, evaluated as a number of CFU kinetics versus time. The kinetic behavior corresponds to a normal growth reaching a maximum at 40 minutes and decreasing thereafter. This curve is modified in media containing the BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles with and without tetracycline. In the presence of particles of BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

the bacteria have a completely different behavior, decreasing the CFU initially to have a minimum 40 minutes and then gradually increase. When in the media containing the BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles loaded with tetracycline, the behavior of the growth curve changes completely, since from the first minutes an effect suggesting inhibition and death of the bacteria is presented suggesting that the release tetracycline is given in a gradual way.



**Fig. 4** variation in optical density values due to the effect of the BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles loaded with tetracycline on growth of bacteria



**Fig. 5** variation in CFU of *E. coli* due to the effect of BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles loaded with tetracycline on growth of bacteria

#### IV. CONCLUSION

BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> spherical aggregates in micrometer size were successfully synthesized from a chemical wet sol-gel method via spray drying. Loading and release studies of tetracycline as a model drug shows that the BaO·6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> systems can be a good candidates as drug delivery systems.

#### V. ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) by scholarship and CIC-UMSNH for the financial support to this research.

#### REFERENCES

- [1] M. Arruebo, R. Fernández-Pacheco, M. R. Ibarra, and J. Santamaría. Magnetic nanoparticles for drug delivery, *Nanotoda*, (2), 2007, 22-32.
- [2] B. Felice, M. P. Prabhakaran, A. P. Rodríguez, S. Ramakrishna. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective, *Materials Science and Engineering C*, (41), 2014, 178-195.
- [3] T. González-Carreño, M.P. Morales, C.J. Serna. Barium ferrite nanoparticles prepared directly by aerosol pyrolysis. *Materials Letters*, (43), 2000, 97–101.

- [4] P. Ren, J. Guan, X. Cheng. Influence of heat treatment conditions on the structure and magnetic properties of barium ferrite BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> hollow microspheres of low density. *Materials Chemistry and Physics*, (98), 2006, 90–94.
- [5] A. Ataie and A. Mali, Characteristics of barium hexaferrite nanocrystalline powders prepared by a sol-gel combustion method using inorganic agent. *J. Electroceramic*, (21), 2008, 357-360.
- [6] A. Ghasemi, R. S. Alam, A. Morisako, Preparation and magnetic properties of hexagonal barium ferrite films using BaM nanoparticles. *Physica B*, (403), 2008, 2987-2990.
- [7] M. Choi, S. Cho, Y. Song, S. Baek, H. Kim, J. Jung, H. Lee, C. Park, S. Park, Y. Kim. Synthesis and characterization of hollow BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> submicron spheres for advance functional magnetic materials, *Current Applied Physics*, (14), 2014, 1208-1211.
- [8] X. Cai, J. Wang, G. Liang, J. Guo, Y. Hou, H. Gao, L. Yu. Effect of NaNO<sub>3</sub> foaming agent on barium ferrite hollow microspheres prepared by self-reactive quenching technology. *Journal of Alloys and Compounds*, (636), 2015, 348–356.
- [9] X. Xu, J. Park, Y. Hong, A. M. Lane. Ethylene glycol assisted spray pyrolysis for the synthesis of hollow BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> spheres. *Materials Letters*, (144), 2015, 119–122.
- [10] M. Choi, S. Cho, Y. Song, D. Choi, S. Park, Y. Kim. Novel synthesizing method of BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub> micro rod and its superior coercivity with shape anisotropy. *Materials Letters*, (139), 2015, 292–295.
- [11] A. K. Gupta, M. Gupta. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, (26), 2005, 3995–4021.
- [12] V. I. Shubayev, T. R. Pisanic, S. Jin. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, (61), 2009, 467–477.
- [13] N. A. Frey, S. Peng, K. Cheng and S. Sun. Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage. *Chem. Soc. Rev.*, (38), 2009, 2532–2542.
- [14] N. Trana and T. J. Webster. Magnetic nanoparticles: biomedical applications and challenges. *J. Mater. Chem.*, (20), 2010, 8760–8767
- [15] A. Figuerola, R. Di Corato, L. Manna, T. Pellegrino. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacological Research*, (62), 2010, 126–143.

Publisher: Szilikátipari Tudományos Egyesület  
1034 Budapest, Bécsi út 122-124.  
Telephone/fax: 06-1/201-9360  
E-mail: info@szte.org.hu  
WEB: www.szte.org.hu  
Editor-in-Chief: Dr. Borosnyói Adorján  
E-mail: epitoanyag@szte.org.hu  
WEB: [www.epitoanyag.org.hu](http://www.epitoanyag.org.hu)

---

## Acceptance of Manuscript

**Dear authors,**

We are happy to inform you that the Editorial Board of **építőanyag** – Journal of Silicate Based and Composite Materials has made a decision on the following manuscript:

S. Torres-Cadenas, A. Bravo-Patiño, J. Zarate-Medina, M.E. Contreras-García

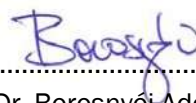
Nest-like BaO•6Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> microspheres with hierarchical porous structure for drug delivery

Suggestion: accepted for publication

Your manuscript is now with the Editorial Office. We call your attention that publication of the paper will be possible after the approval of the final proof of the manuscript.

Thank you for submitting your scientific results to **építőanyag** – Journal of Silicate Based and Composite Materials. We wish further success for your research activities.

Budapest, 5 January 2017



.....  
Dr. Borosnyói Adorján  
Editor-in-Chief