



TRABAJO FIN DE GRADO
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS RECUBIERTAS DE SÍLICE Y SURFACTANTE PARA
LA CAPTURA Y ELIMINACIÓN DE MICROPARTÍCULAS Y
MICROPLÁSTICOS DE AGUAS CONTINENTALES**

BELÉN MIÑANA BLASCO

Tutor

Francisco Javier Gómez Pérez

Área de Química Física

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso Académico 2024 – 2025

Índice

1. Resumen.....	4
1.- Abstract	4
2. Introducción	5
2.1. Importancia y aplicaciones de las nanopartículas.....	5
2.1.1. Nanopartículas de Fe ₃ O ₄	5
2.1.2. Remediación ambiental.....	5
2.1.3. Otras aplicaciones.....	6
2.2 Contaminantes	8
2.2.1. Metales pesados.....	8
2.2.2. Micro-/nanopartículas de plástico.....	8
3. Antecedentes	10
3.1. Invención de la técnica	10
3.2. Desarrollo y actualidad.....	10
4. Objetivos.....	11
5. Materiales y Métodos	12
5.1. Síntesis de las partículas de magnetita recubiertas de sílice, Fe ₃ O ₄ @SiO ₂	12
5.2. Recubrimiento de las partículas magnetita, Fe ₃ O ₄ , CON CTAB.	13
5.2. Caracterización de las partículas de magnetita recubiertas con CTAB.	13
5.2.2. Concentración de Fe ₃ O ₄	13
5.2.2. Tamaño de las partículas de Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @CTAB.....	14
5.2.3. Potencial Z	15
5.3. Efecto de la radiación de ultrasonidos sobre la aglomeración de las partículas.....	15
5.4. Azul de tripano (TB) como colorante modelo: adsorción a Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @CTAB.	16
5.5. Diferentes clases de ligandos	17
5.6. Metodología de trabajo.....	18
6. Resultados y Discusión	21
6.1. Adsorción del azul tripano (TB) sobre partículas de magnetita.	21

6.1.1. Efecto del tiempo de almacenamiento de las partículas en su capacidad de adsorción. ...	21
6.1.2. Efecto de la fuerza iónica sobre la capacidad de adsorción de las partículas.	22
6.2. Adsorción de lisozima (LZM) sobre partículas de magnetita.	24
6.3. Adsorción de albúmina sérica bovina (BSA) sobre partículas de magnetita.	26
6.3.1. Adsorción de la BSA a las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$ en ausencia de sal.	26
6.3.2. Efecto de la fuerza iónica sobre la capacidad de adsorción de las partículas.	27
6.4. Adsorción de azul de tripano encapsulado en partículas de sílice sobre partículas de magnetita.	31
6.5. Adsorción de Latex Beads sobre partículas de magnetita.....	33
7. Conclusiones.....	36
8. Proyección futura	37
9. Bibliografía.....	38



1. Resumen

La presencia de contaminantes en aguas continentales y marinas debidos mayoritariamente al desarrollo industrial ha alcanzado niveles alarmantes que amenazan la supervivencia de ecosistemas distribuidos por todo el planeta. En particular, la utilización generalizada de plásticos y la cada vez mayor proliferación en el uso de micro y nanopartículas de muy distinta naturaleza exige del desarrollo de estrategias capaces de eliminar estos contaminantes de forma selectiva y cuantitativa. El presente Trabajo Fin de Grado propone la utilización de micropartículas de magnetita recubiertas del detergente catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio, CTAB, como medio de capturar nano y micropartículas tanto hidrofílicas (derivadas de sílice) como hidrofóbicas (microplásticos). La capacidad de estas partículas para adsorber de forma efectiva tanto ligando solubles (proteínas y colorantes) como partículas insolubles ha sido analizada y estrategias en el diseño de nuevas generaciones de partículas magnéticas que mejoren su capacidad han surgido tras un análisis crítico de los resultados obtenidos.

1.- Abstract

The presence of contaminants in continental and marine waters, mainly due to industrial development, has reached alarming levels that threaten the survival of ecosystems distributed throughout the planet. In particular, the widespread use of plastics and the increasing proliferation in the use of micro and nanoparticles of very different nature requires the development of strategies capable of eliminating these contaminants selectively and quantitatively. This Final Degree Project proposes the use of magnetite microparticles coated with the cationic detergent cetyltrimethylammonium bromide, CTAB, as a means of capturing nano- and microparticles, both hydrophilic (derived from silica) and hydrophobic (microplastics). The capacity of these particles to effectively adsorb both soluble ligands (proteins and dyes) and insoluble particles has been analyzed and strategies in the design of new generations of magnetic particles that improve their capacity have emerged after a critical analysis of the results obtained.

Abreviaturas

Fe_3O_4 : magnetita

SiO_2 : óxido de silicio

CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio

$Fe_3O_4@SiO_2@CTAB$: partículas de magnetita recubiertas de sílice con CTAB adsorbido a su superficie.

$SiO_2@PDAPMACI@TB@PVSA$: azul de tripano encapsulado en partículas de sílice un polielectrolito catiónico (PDADMACI) y otro aniónico polivinilsulfonato (PVSA).

2. Introducción

2.1. Importancia y aplicaciones de las nanopartículas

2.1.1. Nanopartículas de Fe_3O_4

Las nanopartículas tienden un puente entre los materiales de gran volumen y las estructuras atómicas o moleculares [1]. Se denominan nanopartículas aquellas cuyo diámetro aproximado es de 100 nm o menor. Los materiales nanométricos presentan una elevada área superficial alta en relación con su volumen, haciendo que tanto su adsorción específica (por unidad de masa) como u potencia de transferencia de calor (energía intercambiada por unidad de tiempo) sean mejores que las de los mismos materiales de dimensiones mayores.

En particular, las nanopartículas magnéticas están formadas por óxidos de hierro que poseen propiedades ferromagnéticas intrínsecas (maghemita, Fe_2O_3 , magnetita, Fe_3O_4 , etc.) [2] [3], pudiendo contener cantidades estequiométricas de otros metales como el cobalto o níquel. La variación del pH del medio induce cambios en su carga superficial, observándose valores positivos a bajo pH y valores negativos a pH alcalinos. El punto de carga nula (punto isoeléctrico) es cercano a 7 [4], lo que compromete su estabilidad coloidal a pH fisiológico. La estabilidad coloidal de los nano y micromateriales se refiere a la capacidad de sus dispersiones de evitar su decantación al compensar la fuerza gravitacional (que tiende a sedimentar las partículas) con el movimiento browniano y la repulsión entre las superficies de las partículas individuales. En el caso de las partículas de magnética o maghemita, sus dispersiones aumentan su estabilidad coloidal al alejarse de su punto isoeléctrico al aumentar la intensidad de la repulsión electrostática entre partículas tanto a bajo pH (cargadas positivamente como) como a pH alcalino (cargadas negativamente).

Por otro lado, las partículas de magnéticas tienen cierta tendencia a reaccionar con el oxígeno atmosférico disuelto en agua, además de poder sufrir procesos de disolución a bajo pH. Por ello, es frecuente proteger estas partículas con materiales orgánicos insolubles tales como los óxidos de silicio, SiO_2 , o aluminio, Al_2O_3 .

En los últimos años, el interés por el uso de nanopartículas magnéticas se ha incrementado, sobre todo en el campo de administración de fármacos. Esto se debe a las propiedades que presentan dichas partículas: son fáciles de separar mediante un campo magnético externo, su síntesis es sencilla, el área superficial es grande, presentan alta estabilidad química, pueden reutilizarse y presentan gran biocompatibilidad [4]. Además, son utilizadas en una amplia variedad de aplicaciones biomédicas.

2.1.2. Remediación ambiental

La rápida industrialización, la urbanización y las prácticas agrícolas extensivas han llevado a la acumulación de numerosos contaminantes como los metales pesados, pesticidas organoclorados o

hidrocarburos policíclicos aromáticos, tanto en suelo terrestre como acuático [5]. Esta contaminación ha llevado a la creación de técnicas de remediación ambiental que buscan restaurar los entornos naturales que han sido dañados por la actividad humana, con el objetivo de reducir el impacto negativo de la contaminación en el medio ambiente y proteger la salud humana y los ecosistemas.

Las técnicas que se utilizan para la remediación de las aguas continentales son variadas, pudiendo ser procesos químicos, físicos, biológicos o una combinación de estos. El hecho de que se utilice un método u otro depende de la naturaleza del contaminante. Algunos ejemplos de procesos de remediación serían la filtración de aguas, la sedimentación y separación, neutralización, adsorción, biorremediación, fitorremediación, etc. La eficacia de todas ellas está sujeta a varios factores como la naturaleza y extensión de la contaminación, además presentan otras limitaciones como el impacto ambiental que causan, elevados costes y el alcance que tiene. Además, los contaminantes emergentes como son los microplásticos, productos farmacéuticos y sustancias perfluoroalquiladas representan un desafío para estas técnicas. Por tanto, es necesario buscar y desarrollar nuevas tecnologías que resuelvan estas carencias.

El desarrollo e implementación de nanotecnologías ambientales sostenibles para el tratamiento y remediación de impactos ha crecido notoriamente en los últimos años. Se destaca en particular la aplicación de nanopartículas magnéticas [6]. Por ahora son pocos los ensayos de remediación realizados a escala de campo, pero estos van acompañados de numerosos estudios a nivel de investigación y desarrollo para tratamiento de aguas de desechos y sitios contaminados donde las nanopartículas magnéticas han sido exitosas. Desde un punto de vista práctico, las aplicaciones de estas partículas en la remediación ambiental se pueden clasificar en tres tipos: el empleo del nanomaterial como reactivo, su uso como catalizadores, y el aprovechamiento de otras características, como su carácter paramagnético [6].

Este último aspecto será el objetivo principal del presente Trabajo Fin de Grado: diseñar unas partículas magnéticas (Fe_3O_4) que estén recubiertas por SiO_2 , que es un material inorgánico y todo ello recubierto por un surfactante, en este caso el detergente CTAB, con la capacidad de capturar y eliminar micropartículas y microplásticos presentes en las aguas continentales.

2.1.3. Otras aplicaciones

Además de la captura y eliminación de contaminantes, este tipo de partículas pueden ser utilizadas en casi todas las disciplinas científicas como el espacio, la energía, biomedicina y agricultura [1]. Algunas de sus otras aplicaciones y usos más importantes son las siguientes:

- Liberación controlada de fármacos:

debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, como su tamaño controlable, buena biocompatibilidad, biodisponibilidad y baja citotoxicidad, las nanopartículas se han convertido en un recurso muy útil para la administración de fármacos dirigida así como su liberación, mejorando de esta forma la solubilidad del fármaco, su farmacocinética, prolongando el tiempo del fármaco en la circulación sanguínea y reduciendo los efectos secundarios tóxicos de los fármacos [7].

- Actividad antibacteriana:

el uso generalizado de antibióticos para tratar infecciones bacterianas ha llevado a la aparición de cepas bacterianas resistentes a múltiples fármacos. Por lo que proporcionar un tratamiento seguro y eficaz para las cepas bacterianas resistentes a fármacos se ha vuelto un reto de salud global. Una de las soluciones investigada ha sido el uso de nanopartículas como agente antibacteriano, las cuales han demostrado una actividad bactericida eficiente y superior. Su mecanismo de actuación implica la alteración de la membrana celular y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) produciendo así la muerte de las bacterias. La actividad antibacteriana de estas partículas ha demostrado ser de amplio espectro tanto frente a bacterias grampositivas y como gramnegativas [1].

- Electrónica:

debido a sus novedosas propiedades electrónicas y ópticas, las partículas magnéticas tienen una amplia gama de aplicaciones en técnicas de imagen y electrónica. Por ejemplo, las nanopartículas basadas de Gd pueden mejorar la calidad de la imagenología y la dosis de administración del agente de contraste en la resonancia magnética (MRI). Además, también ofrecen la capacidad de obtener imágenes y rastrear una sola molécula, lo que puede revelar información acerca de importantes procesos celulares como la organización de las proteínas de membrana y la interacción con otras proteínas [8].

- Agricultura:

las nanopartículas presentan un alto potencial para solucionar los problemas agrícolas y ambientales actuales. En el sector de la agricultura las nanopartículas se utilizan principalmente de dos formas, como nanofertilizantes y nanopesticidas. Los nanofertilizantes se aplican en menor cantidad que los fertilizantes químicos convencionales, pero presentan mayor eficacia que estos últimos puesto que liberan los nutrientes justo cuando y donde las plantas los requieren, evitando así el uso excesivo de fertilizantes. Por otro lado, varias nanopartículas han demostrado tener actividad antimicrobiana, insecticida y nematocida, lo que las convierte en una alternativa prometedora a los pesticidas químicos y una alternativa potencialmente más barata que los biopesticidas [8]

Estas aplicaciones son menos relevantes para el desarrollo de este trabajo, vamos a centrarnos mayoritariamente en el uso de las nanopartículas magnéticas en el ámbito de la remediación ambiental, como captura y eliminación de contaminantes.

2.2 Contaminantes

2.2.1. Metales pesados

Debido a la creciente industrialización combinada con las prácticas agrícolas, la contaminación del suelo con metales pesados se ha convertido en una grave preocupación ambiental a nivel mundial. Esta clase de metales tienen una vida media de veinte años y son muy persistentes en la naturaleza. Dentro de los metales pesados hay dos categorías, los necesarios y los no esenciales. El cobalto (Co), el cobre (Cu), el cromo (Cr), el hierro (Fe), el níquel (Ni), el manganeso (Mn) y el zinc (Zn) son metales pesados básicos, son considerados como micronutrientes, pero se vuelven tóxicos cuando se consumen en grandes cantidades. Por otra parte, el cadmio (Cd), el mercurio (Hg) y el plomo (Pb) son metales pesados no esenciales que son extremadamente letales para los organismos vivos [9]. La exposición crónica a metales pesados afecta a varios órganos, incluyendo el cerebro y los nervios periféricos. La intoxicación por metales pesados es una causa bien conocida de neuropatía periférica [10].

La contaminación por metales pesados ha llamado la atención del mundo debido a su toxicidad para los organismos vivos a través de la bioacumulación. Los metales pesados se clasifican típicamente como metales o metaloides con una densidad elemental más alta. Incluso las trazas de metales pesados en el sistema tienen un efecto intenso en los ecosistemas (terrestres y acuáticos). Esto podría deberse a diversos factores como las emisiones atmosféricas, que se han reconocido como la principal causa de la contaminación del suelo y el agua [9].

La reducción del contenido de metales pesados del agua es difícil, siendo más frecuente un tratamiento conducente a la transformación del estado de oxidación, lo que da como resultado alteraciones significativas en el metabolismo de la vida acuática, así como inestabilidad ecológica. Además, los metales pesados presentes en el suelo pueden causar la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas, lo que representa un peligro para los sistemas ecológicos [9].

2.2.2. Micro-/nanopartículas de plástico

El plástico está presente en todas partes en nuestra vida diaria y se utiliza en el transporte, la agricultura, la construcción, los productos médicos y farmacéuticos y en el envasado de alimentos. No es de extrañar que la producción mundial de plástico haya aumentado desde la década de 1960; solo en 2023, el mundo produjo 400,3 millones de toneladas métricas de plástico [11]. Los plásticos son materiales compuestos complejos que comprenden una estructura polimérica combinada con aditivos

químicos como plastificantes (ftalato), retardantes de llama bromados, estabilizadores de luz y calor (contienen metales), biocidas y colorantes. Otros productos químicos incluyen auxiliares de procesamiento y sustancias añadidas no intencionalmente, como impurezas en materias primas, subproductos de la producción de polímeros, productos de degradación y transformación y contaminantes de la maquinaria de procesamiento [12] [13].

La cantidad de plásticos producidos aumenta cada año, aunque las estrategias de reutilización, reciclaje y readaptación no se han implementado de forma suficientemente efectiva, particularmente en algunos países en desarrollo. Solo entre el 21-26 % de los residuos de plástico se reciclaron e incineraron adecuadamente. El resto se incinera en fosas abiertas o se desecha al medio ambiente, lo que provoca la contaminación plástica del agua, el aire, el suelo, etc. [14].

Después de haber ingresado en el medio ambiente, las interacciones entre los desechos plásticos y los componentes ambientales pueden degradar grandes piezas de plástico a desechos plásticos más pequeños [14]. Según el diámetro de los fragmentos de plástico, las partículas de plástico se pueden dividir en microplásticos (MP) y nanoplásticos (NP), siendo los microplásticos los que tiene un tamaño de menos de 5 mm de diámetro y los nanoplásticos de 1 a 100 nm de diámetro.

En la cadena alimentaria acuática, la bioacumulación de micro- y nanoplásticos se produce después de la ingestión por parte de los organismos acuáticos y la posterior transferencia de partículas engullidas a niveles tróficos. Los micro- y nanoplásticos pueden transferirse desde el tracto digestivo hasta el sistema circulatorio. Los seres humanos están expuestos a estos contaminantes a través del consumo de animales acuáticos contaminados y otros alimentos y productos de consumo como la pasta de dientes, el agua potable, la cerveza, la miel, el azúcar y la sal. No obstante, los posibles riesgos para la salud resultantes de la exposición, absorción y translocación de micro- y nanoplásticos están poco investigados y son un tema importante de debate [15].

Las cuestiones críticas son (1) ¿cómo pasan estos microplásticos a través del tratamiento del agua y llegan al agua potable? y (2) ¿el tratamiento del agua potable es capaz de eliminar los microplásticos y en qué medida? Actualmente, el destino de los microplásticos en el tratamiento del agua no se ha investigado adecuadamente. Habitualmente los procesos de tratamiento del agua implican la coagulación combinada con sedimentación, filtración de arena, ozonización y ultrafiltración. La eficacia de eliminación por el proceso de la coagulación/sedimentación es del 40,5% al 54,5%, sin que se disponga una idea clara acerca de cómo implementar medidas que ayuden a la eliminación de microplásticos en las condiciones de trabajo ordinarias de las plantas de tratamiento de agua. Además, se debería prestar más atención a los microplásticos más pequeños puesto que son los que se detectan con mayor frecuencia en el agua potable [16].

3. Antecedentes

3.1. Invención de la técnica

La nanotecnología es reconocida como uno de los mayores avances científicos de este siglo XXI. Esta nueva tecnología se ha infiltrado en casi todas las disciplinas científicas para crear nuevas alternativas destinadas a resolver diferentes atascos relacionados con la investigación [1].

Desde la década de 1990, los nanomateriales empiezan a ser más relevantes, debido a sus propiedades en comparación con sus contrapares a nivel macroscópico. Dentro de estos nanomateriales encontramos los diferentes tipos de nanopartículas las cuales ya han sido citadas en este documento. Entre las nanopartículas estudiadas para ser empleadas en el ámbito de la remediación ambiental, las nanopartículas magnéticas, en concreto, podrían adquirir una importancia creciente a lo largo de los años, por ser fácilmente manipulables mediante el empleo de un campo magnético externo.

3.2. Desarrollo y actualidad

Actualmente, esta clase de nanopartículas magnéticas se utilizan de manera regular en biomedicina para la liberación controlada de fármacos y terapias contra diversas enfermedades, como el cáncer, la diabetes o problemas respiratorios.

Aunque su uso principal se en el ámbito de la biomedicina, poco a poco se han ido hallando nuevos usos para este tipo de partículas magnéticas en diferentes ámbitos, como el tratamiento de aguas residuales mediante biorremediación, ingeniería genética, agricultura y en el campo de la electrónica. No podemos descartar que, en un futuro, tal vez próximo, se lleguen a descubrir y desarrollar más aplicaciones para estas partículas tan versátiles.

En general, el desarrollo de nuevas nano y micropartículas dirigidas a aplicaciones cada vez más sofisticadas se ha convertido en uno de los campos más prolíficos de la nanotecnología.

4. Objetivos

El objetivo del TFG propuesto es el diseño, estudio y caracterización de partículas magnéticas submicrométricas capaces de capturar nanopartículas y microplásticos de las aguas continentales considerados como contaminantes de difícil eliminación capaces de introducirse en la cadena trófica induciendo su bioacumulación.

En particular, el presente Trabajo Fin de Grado se plantea los siguientes objetivos:

- 1.- Obtener partículas magnéticas recubiertas de sílice y de micelas de CTAB.
- 2.- Caracterizar la capacidad de estas micropartículas para unir colorantes y proteínas de carga opuesta.
- 3.- Evaluar la capacidad de las micropartículas sintetizadas para unir nanopartículas de sílice y poliestireno como medio para reducir y/o eliminar estos contaminantes del medioambiente.



5. Materiales y Métodos

5.1. Síntesis de las partículas de magnetita recubiertas de sílice, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$.

Las partículas de magnetita, Fe_3O_4 , fueron obtenidas mediante el método solvotérmico [30] en presencia de etilenglicol. FeCl_3 se disolvió en etilenglicol hasta alcanzar una concentración de 0.2 M. Sobre esta disolución se añadió acetato sódico anhidro cuya concentración final fue 0.6 M. 180 mL de esta disolución se introdujo en un recipiente de teflón cuyo volumen era de 250 mL y se situó en el interior de un autoclave de acero inoxidable de gruesas paredes capaz de soportar elevadas presiones.

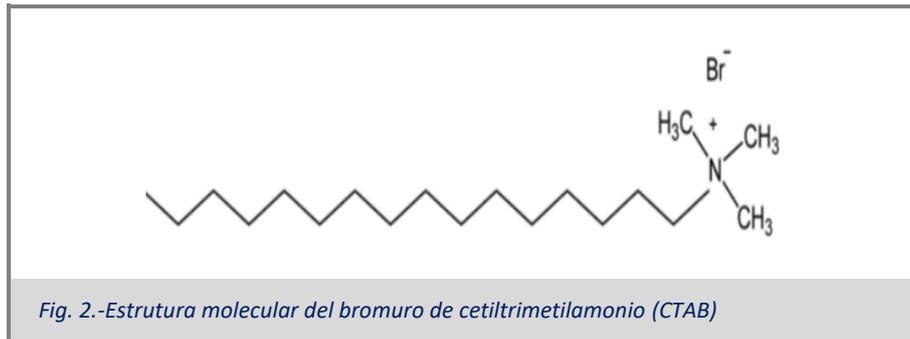


El autoclave se introdujo en una estufa y se incubó a 200 °C durante 8 h. Transcurrido este tiempo, el autoclave se enfrió pasivamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. La dispersión resultante, que tenía un color negro característico de la magnetita, se decantó magnéticamente utilizando imanes permanentes de neodimio y se lavó exhaustivamente con agua.

Con objeto de proteger las partículas de magnetita de su posterior oxidación a maghemita por acción del oxígeno atmosférico, éstas se recubrieron de una fina capa de sílice, SiO_2 , para dar lugar a las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. Para ello, las partículas se dispersaron en una disolución conteniendo agua y etanol en proporción 1:4 en volumen, conteniendo amoníaco. Tras someter a la dispersión a sonicación para reducir su aglomeración (ver más adelante para los detalles) se añadió tetraetilortosilicato gota a gota bajo condiciones de fuerte agitación mecánica. Tras incubar la dispersión resultante (en condiciones de agitación mecánica) durante 4 h a temperatura ambiente, las partículas resultantes fueron decantadas magnéticamente y sometidas a ciclos de lavado con agua y decantación. Las partículas resultantes se identifican como $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$.

5.2. Recubrimiento de las partículas magnetita, Fe₃O₄, CON CTAB.

El surfactante empleado para recubrir las nanopartículas de magnetita fue el bromuro de cetiltrimetilamonio (ver fig. 2), se trata de un surfactante catiónico con el contraión de bromo, consiste en una sal de amonio cuaternaria, que constituye la parte hidrofílica de la molécula y una cadena alquílica de gran longitud que forma la parte hidrofóbica [17] [18]. La concentración micelar crítica del CTAB es de alrededor de 1 mM a 30 °C. Sus micelas están formadas por unos 75 – 120 monómeros y muestran un grado de ionización α de 0,2 – 0,1 dependiendo de la fuerza iónica del medio [31].



Es bien conocido que el CTAB muestra gran afinidad por la superficie de sílice [32]. Para proceder al recubrimiento de las partículas de magnetita con CTAB, primeramente, se hizo una mezcla de agua destilada, ajustada a pH 11 para facilitar la deprotonación de los grupos silanoles de la superficie del sílice (-SiO⁻). Por su parte, las partículas de magnetita se ajustaron al mismo pH y se sometieron a sonicación (ver más adelante para conocer los detalles de los procesos de sonicación por ultrasonidos) para romper los agregados que pudieran haberse formado durante su almacenamiento.

La dispersión de partículas de magnetita, previamente sonicadas, se añadió gota a gota sobre la disolución alcalina conteniendo CTAB sometida a agitación vigorosa. La dispersión resultante se incubó (con agitación moderada) durante 24 horas a temperatura ambiente. En ese momento las partículas de magnetita recubiertas con CTAB fueron decantadas magnéticamente para desechar el detergente sobrante y lavadas con agua destilada varias veces. Las partículas resultantes fueron identificadas como Fe₃O₄@SiO₂@CTAB.

5.2. Caracterización de las partículas de magnetita recubiertas con CTAB.

5.2.2. Concentración de Fe₃O₄

Para determinar la concentración total de magnetita en la alícuota de Fe₃O₄@SiO₂@CTAB, se realizaron dos experimentos complementarios. En primer lugar, se procedió a la detección del residuo seco y, en segundo lugar, se determinó la cantidad de Fe₃O₄.

El experimento del residuo seco se llevó a cabo por triplicado. Se añadió 1 mL de la alícuota de partículas magnéticas a un tubo Eppendorf, seguido de una decantación magnética utilizando un imán

para separar y retirar el sobrenadante. Posteriormente, los tubos fueron secados en una estufa a 120 °C durante 24 horas. Al concluir el proceso de secado, los tubos fueron pesados y la diferencia con el peso del tubo vacío, previamente registrado, se utilizó para calcular el residuo seco. Se calculó el promedio de la diferencia de peso de los tres tubos, obteniendo una cantidad de partículas magnéticas de 9,2 mg/mL.

Para la determinación de la cantidad de Fe₃O₄ contenida en las partículas Fe₃O₄@SiO₂@CTAB, 0,1 mL de la dispersión fue añadido a 0,9 mL de HCl 5 M lo que produce la disolución de la magnetita en sus iones componentes, Fe²⁺ y Fe³⁺. Una vez obtenidos ambos iones, se procedió a reducir el ion Fe³⁺ a Fe²⁺ utilizando hidroxilamina en tampón de ácido acético a pH 4,5. Seguidamente, se adicionó 1,10-fenantrolina, un reactivo incoloro que, al reaccionar con el ion Fe²⁺, forma un complejo de color rojizo. La cantidad de Fe₃O₄ presente en la dispersión original de partículas Fe₃O₄@SiO₂@CTAB fue determinado a partir de la absorbancia de la disolución resultante (conteniendo Fe²⁺ y 1,10-fenantrolina). Resultando una concentración de magnetita de 4,9 mg/mL.

Finalmente, se calculó la concentración de Fe₃O₄ en la muestra de Fe₃O₄@SiO₂@CTAB. Se determinó que el 53,3% en masa de las partículas Fe₃O₄@SiO₂@CTAB correspondía a Fe₃O₄, mientras que el 46,7% restante correspondía a SiO₂ y CTAB presentes en las partículas magnéticas.

5.2.2. Tamaño de las partículas de Fe₃O₄@SiO₂@CTAB

Para medir el tamaño de las nanopartículas sintetizadas, se utilizó la técnica dispersión dinámica de la luz o Dynamic Light Scattering (DLS) utilizando un instrumento ZetaSizer Malvern [19] [20]. Esta técnica monitoriza la variación temporal de la luz dispersada a partir debido movimiento browniano simultáneo del conjunto de partículas en solución. Debido a este movimiento Browniano, las partículas se encuentran en constante movimiento lo que provoca el choque de estas con las moléculas del líquido que las rodea de manera aleatoria. De modo que las partículas de gran tamaño se moverán más lentamente que las pequeñas, que se mueven más rápido. Por tanto, la intensidad de la luz dispersada por las moléculas grandes variara temporalmente más lentamente que la dispersada por las partículas pequeñas. El diámetro hidrodinámico de las partículas y el coeficiente de difusión de las partículas se encuentran relacionados con el radio hidrodinámico de las partículas mediante la ecuación de Stokes – Einstein (ecuación 1).

$$d(H) = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad (1)$$

donde D es el coeficiente de difusión, k_b la constante de Boltzmann, T es la temperatura expresada en Kelvin, μ es la viscosidad del solvente y R₀ es el radio del soluto.

Cuando se coloca la muestra en el sistema Nano-Zetasizer, el observable es la variación temporal de la intensidad de la luz dispersada, que sirve emplea para calcular la distribución de tamaños de las partículas presentes en la muestra analizada. Los resultados obtenidos de la medida se encuentran en función de la intensidad ya que, mediante la aproximación de Rayleigh, la intensidad de dispersión de una partícula es proporcional a la sexta potencia de su diámetro.

Antes de realizar la medida del tamaño de las partículas, la muestra fue brevemente sonicada para deshacer los agregados que pudieran haberse formada durante su almacenamiento. El diámetro hidrodinámico promedio obtenido fue de $2,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$ con un índice de polidispersidad de 0,377, indicando que la muestra era moderadamente monodispersa (la anchura de la distribución gaussiana del tamaño de la muestra era de alrededor de $0,2 \mu\text{m}$).

5.2.3. Potencial Z

El potencial Z es una medida de la carga superficial de una partícula, directamente vinculado con su movilidad electroforética al ser sometida a campos eléctricos crecientes. El Malvern Zetasizer ZS DLS utiliza la celda (DTS1070), que cuenta con dos electrodos de cobre. Estos permiten aplicar un campo eléctrico externo a los extremos de la cubeta, midiendo así la movilidad electroforética, a partir de la cual se determina potencial zeta.

El líquido que rodea a la partícula se divide en dos regiones: una capa interna, conocida como la capa de Stern, donde los iones están fuertemente adheridos a la superficie de la partícula, y una capa externa, denominada capa difusa, en la que las atracciones son de menor intensidad. Ambas capas conforman la doble capa eléctrica que rodea a cada partícula. Entre estas capas existe una barrera que separa los iones de la partícula, formando una estructura estable. Al moverse la partícula, los iones dentro de la barrera la acompañan, mientras que los situados más allá no lo hacen. Esta barrera se conoce como superficie de corte hidrodinámica. El potencial zeta es igual a la diferencia de potencial eléctrico que se genera entre estas dos superficies.

5.3. Efecto de la radiación de ultrasonidos sobre la aglomeración de las partículas.

Las partículas magnéticas suelen aglomerarse a consecuencia del balance entre la repulsión electrostática entre ellas y la atracción establecida como consecuencia de las interacciones dipolo – dipolo. La radiación de ultrasonidos provocada por un sonicador es capaz de romper estas aglomeraciones de partículas dando lugar a las partículas individuales de magnetita recubiertas con CTAB. En presencia de homogenización ultrasónica se reduce el tamaño de las partículas formadas como resultado de fuerzas de cizallamiento o efectos mecánicos producidos por el colapso de las microburbujas que forman las ondas de ultrasonido [21], la implosión de las microburbujas genera

ondas de presión que viajan en el líquido a velocidades similares a las del sonido independientemente del fluido donde se crean.

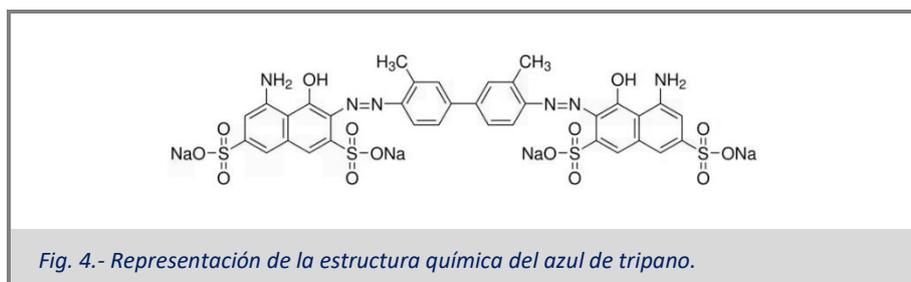


Para nuestros experimentos, lo utilizaremos sobre las nanopartículas de magnetita, antes de aplicarlas a cualquier solución, con la finalidad de evitar agregaciones entre las partículas.

5.4. Azul de tripano (TB) como colorante modelo: adsorción a $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$.

En el presente proyecto, y específicamente en los ensayos que se describirán en el apartado de resultados, se requiere un compuesto que funcione como ligando modelo para evaluar su interacción con partículas magnéticas. El compuesto seleccionado es el colorante azul tripano (TB) [22][23], un colorante azoico hidrofílico de naturaleza aniónica, empleado tradicionalmente en tinciones histológicas y celulares.

El azul tripano es ampliamente utilizado en técnicas de microscopía para el recuento celular y la determinación de la viabilidad de tejidos. Su aplicación principal radica en la diferenciación entre células viables y no viables, ya que estas últimas presentan membranas permeables al colorante. Asimismo, la solución de azul tripano se emplea frecuentemente en ensayos de citotoxicidad y proliferación celular, aprovechando sus propiedades de tinción específicas.



La elección del azul de tripano como colorante para la realización de los experimentos se fundamenta en su estabilidad moderada, lo que lo convierte en un compuesto adecuado para este tipo de ensayos. Dado que se trata de un colorante de naturaleza aniónica, su adsorción depende significativamente de las características de la superficie de las nanopartículas magnéticas. En nuestro caso, las nanopartículas están recubiertas con CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), un surfactante catiónico que confiere una carga superficial positiva a las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$. Esta propiedad favorece una atracción electrostática fuerte entre el azul de tripano y las micropartículas, lo que permite la formación del complejo NP-TB. Por consiguiente, el azul de tripano se empleará como ligando en los experimentos de adsorción, constituyendo una prueba de concepto para aplicaciones potenciales en futuros desarrollos.

5.5. Diferentes clases de ligandos

Para determinar la capacidad de adsorción de las nanopartículas de magnetita, se utilizaron diversos ligandos con características de naturaleza, tamaño y carga distintas.

- **Ligandos proteicos:**

En los experimentos de adsorción, se emplearon dos proteínas de características diferentes: lisozima (LZM) y albúmina sérica bovina (BSA). La lisozima, también conocida como muramidasa, es una enzima hidrolasa que actúa sobre el enlace glucosídico β -1,4, aunque su forma dimérica presenta propiedades distintivas y de gran interés. Esta proteína es especialmente activa frente a bacterias Gram-positivas, con una actividad reducida frente a bacterias Gram-negativas [24][25][26]. La lisozima se encuentra de manera natural en las lágrimas y la saliva, donde cumple una función de barrera protectora frente a infecciones, y también está presente en grandes cantidades en la clara de huevo. Su punto isoeléctrico se encuentra alrededor de pH 11, por lo que, a pH fisiológico, presenta una carga neta positiva.

La albúmina sérica bovina (BSA) es una proteína compuesta por 583 aminoácidos y está organizada en tres subdominios dispuestos linealmente, que son estructuralmente homólogos [27]. Perteneciente al grupo de las albúminas séricas, BSA constituye una de las proteínas más abundantes en el plasma sanguíneo, desempeñando funciones cruciales en el transporte de moléculas y en la regulación osmótica [28]. Su punto isoeléctrico se encuentra alrededor de pH 5,9, lo que implica que, a pH fisiológico, BSA presenta una carga negativa.

- **Azul tripano en $\text{SiO}_2@\text{PDADMACl}@\text{PVSA}$:**

Uno de los objetivos del presente Trabajo Fin de Grado es caracterizar la capacidad de las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$ de capturar nanopartículas. Para ello, se utilizaron, en primer lugar, partículas

de sílice en las que se encuentra encapsulado el azul de tripano. Estas partículas se obtuvieron mediante la deposición por capas:

- i) Primero las partículas de sílice se recubrieron con el polielectrolito catiónico cloruro de polidialildimetil amonio (PDADMACI), dotando a la superficie de una carga positiva.
- ii) Sobre las partículas se depositó azul de tripano (cargado negativamente) de forma que parte de las cargas positivas del poliamonio se unieron y compensaron las cargas negativas del colorante.
- iii) Por último, las partículas resultantes se recubrieron de un polielectrolito negativo (polisulfonato, PVSA), encapsulando al colorante y dotando de carga negativa a la partícula resultante, $\text{SiO}_2@\text{PDADMACI}@\text{TB}@\text{PVSA}$.

Este recubrimiento confiere a la superficie de las nanopartículas una carga neta negativa, lo que les otorga una alta afinidad por superficies cargadas positivamente, como las de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$.

- **Perlas de látex (Latex beads):**

Las perlas de látex fueron utilizadas como ligando para representar microplásticos, con el fin de evaluar la capacidad de captura de las partículas magnéticas hacia este tipo de contaminantes. Estas perlas consisten en partículas poliméricas esféricas dentro del rango de tamaño coloidal, comúnmente formadas a partir de polímeros amorfos como el poliestireno.

La superficie de las partículas de látex exhibe un carácter altamente hidrofóbico debido a la presencia de anillos aromáticos en su estructura química, lo que favorece la adsorción física de especies moleculares con regiones hidrofóbicas. En este contexto, surfactantes como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), que recubre las partículas magnéticas, se adhieren de manera eficiente a la superficie de las perlas de látex mediante un mecanismo de adsorción pasiva.

5.6. Metodología de trabajo

A continuación, se describe la metodología principal empleada en la mayoría de los experimentos realizados en este trabajo, cuya explicación detallada se desarrollará en el apartado de resultados.

Con el objetivo de determinar la cantidad de ligando adsorbido en una cantidad específica de partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$, se preparó una serie de tubos Eppendorf con una concentración constante de ligando (ajustada según el ligando utilizado) y una concentración creciente de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$. Las muestras fueron sometidas a agitación durante un periodo de 12 – 18 horas para favorecer la máxima interacción y adsorción del ligando a las partículas magnéticas.

Posteriormente, se realizó la separación magnética de las dispersiones para decantar las partículas y eliminar el ligando unido. La concentración de ligando libre en la solución fue cuantificada midiendo espectrofotométricamente la absorbancia del sobrenadante a la longitud de onda específica correspondiente a cada tipo de ligando.

La masa total de ligando será igual a masa adsorbido a la partícula y la masa de ligando libre en el sobrenadante:

$$(m_{\text{ligando}})_{\text{total}} = (m_{\text{ligando}})_{\text{soluble}} + (m_{\text{ligando}})_{\text{adsorbida}} \quad (2) \quad \text{Ec}$$

Despejando:

$$(m_{\text{ligando}})_{\text{libre}} = (m_{\text{ligando}})_{\text{total}} - (m_{\text{ligando}})_{\text{adsorbida}} \quad (3)$$

Por su parte, si llamamos $q_{\text{máx}}$ a la masa de proteína adsorbida por unidad de masa de partícula:

$$q_{\text{máx}} = \frac{(m_{\text{ligando}})_{\text{adsorbida}}}{m_{\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{CTAB}}} \quad (4)$$

Despejando $(m_{\text{ligando}})_{\text{adsorbida}}$:

$$(m_{\text{ligando}})_{\text{adsorbida}} = q_{\text{máx}} \cdot m_{\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{CTAB}} \quad (5)$$

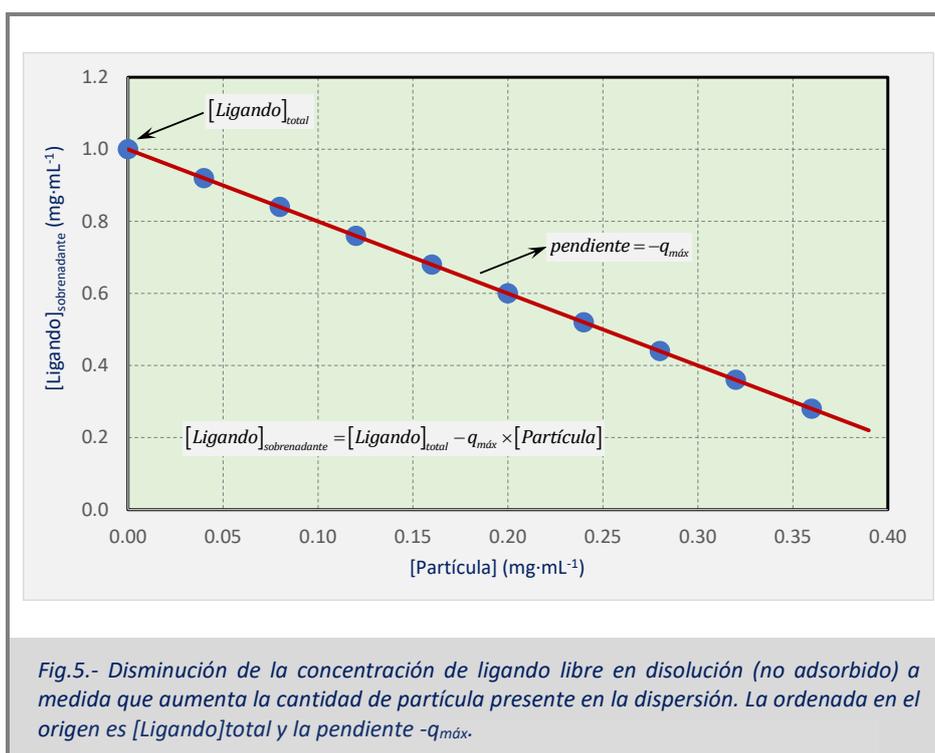
Sustituyendo en ec. 3:

$$(m_{\text{ligando}})_{\text{libre}} = (m_{\text{ligando}})_{\text{total}} - q_{\text{máx}} \cdot m_{\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{CTAB}} \quad (6)$$

Dividiendo por el volumen de la disolución:

$$[\text{Ligando}]_{\text{libre}} = [\text{Ligando}]_{\text{total}} - q_{\text{máx}} \cdot [\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{CTAB}] \quad (7)$$

Por tanto, representando la concentración de proteína presente en el sobrenadante frente a la concentración de partícula en la dispersión, obtendríamos una línea recta cuya ordenada en el origen es $[\text{Ligando}]_{\text{total}}$ y la pendiente $-q_{\text{máx}}$.



Para el caso de los ligandos solubles como el azul de tripano (TB) y las proteínas lisozima (LZM) y albúmina sérica bovina (BSA), la concentración de ligando libre se obtiene a partir de la absorbancia del sobrenadante transformada en la concentración correspondiente utilizando su coeficiente de extinción (ley de Lambert-Beer).

Para ligandos insolubles, su concentración fue determinada a partir de la densidad óptica del sobrenadante (tras la decantación magnética) debida a la dispersión de la luz incidente provocada por las nanopartículas de SiO_2 o látex. La relación entre densidad óptica y concentración se estableció mediante la construcción de la curva de calibrado correspondiente.

Además, es importante destacar que, durante el uso del espectrofotómetro, las longitudes de onda fueron ajustadas según el ligando empleado en cada experimento. Para las proteínas, se utilizó una longitud de onda de 280 nm; en el caso del azul de tripano, se empleó una longitud de onda de 610 nm; mientras que, para las partículas de azul de tripano en $SiO_2@PDADMACl@PVSA$ y las perlas de látex, se aplicó una longitud de onda de 360 nm.

El objetivo principal de estas mediciones fue verificar que las capacidades de adsorción de los ligandos eran consistentes y estaban correlacionadas con el tamaño y la carga de las partículas utilizadas en los experimentos.

6. Resultados y Discusión

6.1. Adsorción del azul tripano (TB) sobre partículas de magnetita.

En primer lugar, se llevarán a cabo una serie de experimentos con el objetivo de determinar los niveles y las características de unión del colorante azul tripano (TB) a las nanopartículas magnéticas recubiertas con CTAB, denominadas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$. Para ello, se prepararán varias disoluciones en tubos Eppendorf, cada una de las cuales contendrá azul tripano y un buffer Hepes ajustado a pH 7, con el fin de garantizar que el colorante se encuentre en su forma cargada negativamente. Las concentraciones de buffer y de azul tripano permanecerán constantes en todas las muestras, mientras que la concentración de las nanopartículas se incrementará de manera progresiva en cada tubo. Finalmente, se añadirá agua a cada mezcla para ajustar el volumen total a 1500 μL .

Las dispersiones resultantes, que contienen tanto partículas magnéticas como azul tripano, presentan una concentración de 10 mM de buffer Hepes ajustado a pH 7,0, una concentración constante de azul tripano de aproximadamente 0,0151 mg/mL, y una concentración de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$ que varía en un rango de 0 a 0,93 mg/mL.

6.1.1. Efecto del tiempo de almacenamiento de las partículas en su capacidad de adsorción.

Las dispersiones de partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$ presentan una tendencia natural a aglomerarse con el tiempo. Por este motivo, la dispersión de partículas magnéticas fue sometida a un proceso de sonicación con el objetivo de inducir su desagregación. Previo a la realización del experimento definitivo, se llevaron a cabo dos ensayos preliminares, cuyo propósito fue determinar la concentración stock de partículas magnéticas a emplear, así como el volumen óptimo de partículas a adicionar. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 6, 7 y 8.

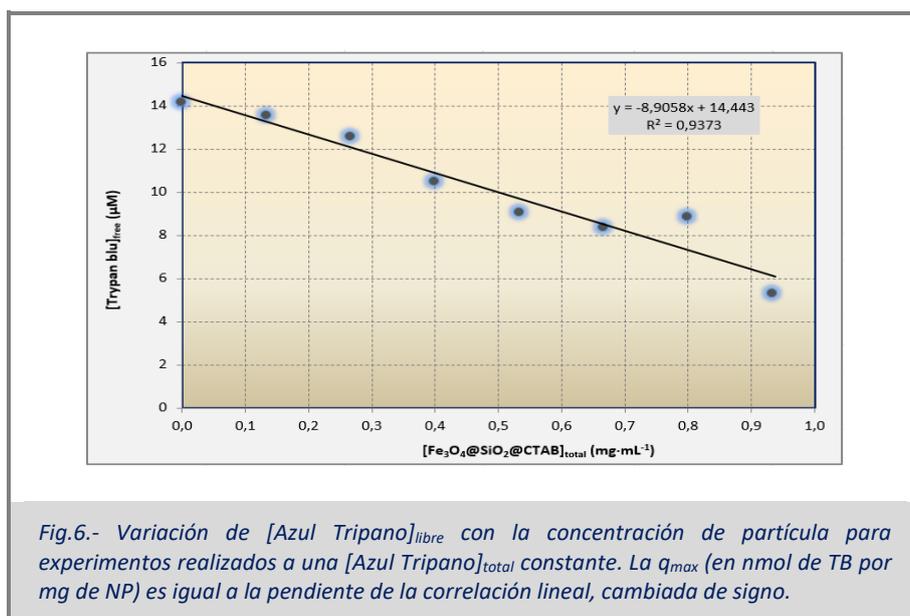


Fig.6.- Variación de $[\text{Azul Tripano}]_{\text{libre}}$ con la concentración de partícula para experimentos realizados a una $[\text{Azul Tripano}]_{\text{total}}$ constante. La q_{max} (en nmol de TB por mg de NP) es igual a la pendiente de la correlación lineal, cambiada de signo.

Estos resultados permiten estimar la capacidad de adsorción máxima del azul de tripano a las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$, $q_{\text{máx}}$, igual a 8,91 μmol de ligando por gramo de partícula. Teniendo en cuenta el peso molecular del colorante (960,81 g/mol) permite expresar $q_{\text{máx}}$ como 8,56 mg de colorante por gramo de micropartícula.

Con objeto de confirmar que la adsorción del colorante a la micropartícula no afectaba a su estabilidad estructural (por ejemplo, arrancando CTAB de su recubrimiento), se obtuvieron y compararon los espectros de absorbancia del colorante en presencia y ausencia de CTAB y los del colorante presente en el sobrenadante. De esta forma se confirmó que el azul de tripano no adsorbido a la micropartícula estaba libre de CTAB.

6.1.2. Efecto de la fuerza iónica sobre la capacidad de adsorción de las partículas.

A pH fisiológico, es previsible que la adsorción de las moléculas de azul de tripano (cargadas negativamente) sobre las partículas recubiertas con CTAB (cargadas positivamente) esté dominada por un componente electrostático. Por tanto, resulta evidente que la capacidad de adsorción de las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$ por azul de tripano se verá afectada negativamente por el apantallamiento ejercido por los iones contenidos en la disolución salina, el cual reduce la atracción electrostática entre ambas especies.

En el siguiente experimento se evaluará el efecto de la fuerza iónica sobre la unión del azul de tripano a las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$. Para aumentar la fuerza iónica, se añadirá NaCl al medio en concentraciones crecientes. El experimento de adsorción se repetirá cinco veces, utilizando concentraciones de NaCl de 50, 100, 150, 200 y 250 mM. El resto de los componentes de la mezcla se mantendrán en las mismas concentraciones y volúmenes que en los experimentos anteriores, con el fin de determinar específicamente la influencia de la fuerza iónica en la adsorción observada.

Es de esperar una disminución progresiva de la pendiente de adsorción (valor absoluto) a medida que aumenta la concentración de sales en el medio, ya que la presencia de estas dificulta e inhibe la unión electrostática entre el azul de tripano y las nanopartículas de magnetita.

A continuación, se presentan las gráficas que resumen los resultados obtenidos en los cinco experimentos realizados.

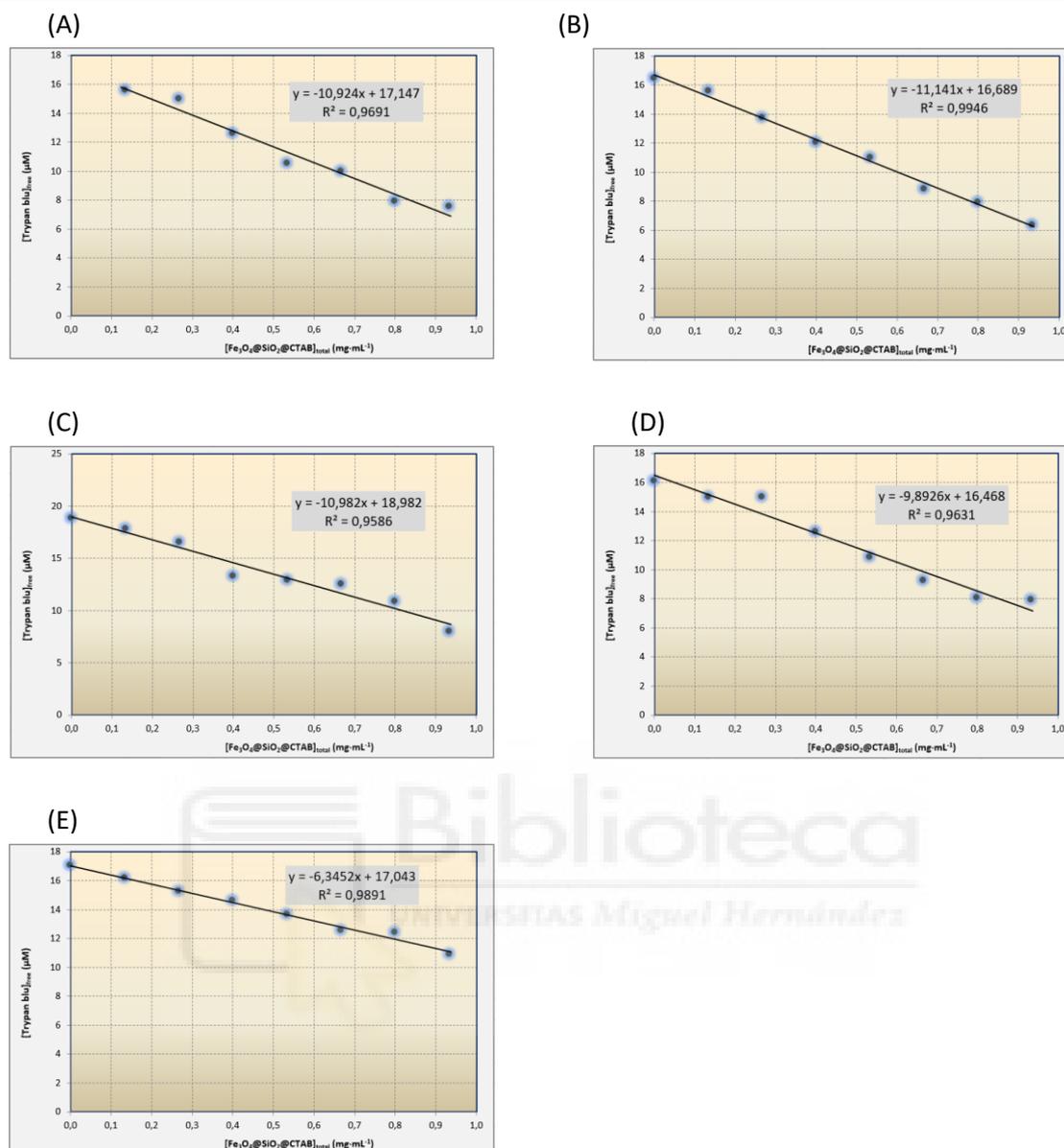


Fig.7.- Efecto de la fuerza iónica sobre la capacidad de adsorción de las partículas de $Fe_3O_4@SiO_2@CTAB$ mediante adición de concentraciones crecientes de NaCl: (A) 50 mM; (B) 100 mM; (C) 150 mM; (D) 200 mM; (E) 250 mM

Aunque se predecía una disminución en la capacidad de adsorción de las nanopartículas, los resultados mostraron que la q_{max} fue ligeramente superior en las concentraciones de 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl. Esto sugiere que la adición de sales al medio tiene un efecto mínimo sobre las partículas. Sin embargo, en la gráfica correspondiente a la concentración de 250 mM de NaCl, se observó la disminución predicha de la $q_{máx}$, lo que indica una reducción en la capacidad de adsorción.

Los resultados se pueden apreciar más claramente en la Fig. 8.

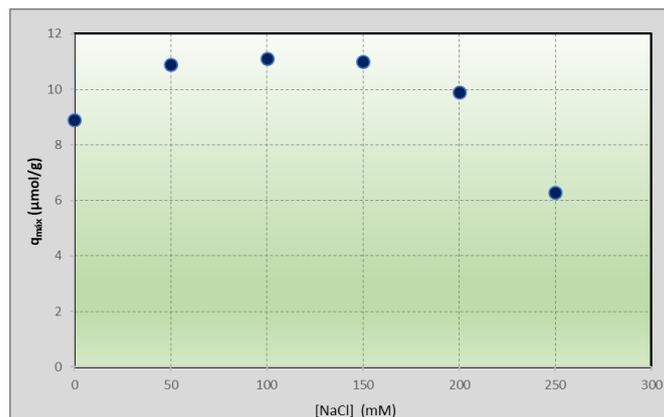


Fig.8.- Efecto de la adición de sales sobre la capacidad máxima de adsorción de azul tripano por las partículas de magnetita recubiertas de CTAB, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$.

Los resultados indican que la cantidad de colorante adsorbida sobre la superficie de la partícula aumenta a baja fuerza iónica (hasta alrededor de $11 \mu\text{mol/g}$) y comienza a declinar a concentraciones de NaCl mayores de 200 mM. Si tenemos en cuenta la estructura del azul de tripano (Fig. 4), observamos que a pH 7 dispone de cuatro grupos sulfonato cargados negativamente que son atraídos por la superficie de la micropartícula cargada positivamente. Además, debemos tener en cuenta que las moléculas adsorbidas ejercerán cierta repulsión electrostática entre ellas por lo que el apantallamiento parcial de las interacciones electrostáticas (tanto atractivas, partícula – colorante, como repulsivas, colorante – colorante) podrían explicar este comportamiento. Resultados similares se han observado al variar la carga de una misma proteína al adsorberse a superficies de sílice a medida en función del pH [33, 34]. La capacidad de adsorción máxima de la superficie de sílice aumenta con la disminución de la carga de la proteína ya que dicha disminución reduce drásticamente la repulsión entre moléculas de proteína ocupando posiciones cercanas (téngase en cuenta que la energía electrostática es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia).

Adicionalmente, los resultados parecen indicar que la interacción electrostática no es la única relevante en la formación del complejo colorante – micropartícula. Una vez compensadas las cargas positivas de la superficie de la micropartícula y las negativas del ligando, el cuerpo central de la molécula de ligando (formada por anillos aromáticos bastante hidrofóbicos) podría interactuar con la parte apolar de las micelas de CTAB estabilizando el complejo resultante.

6.2. Adsorción de lisozima (LZM) sobre partículas de magnetita.

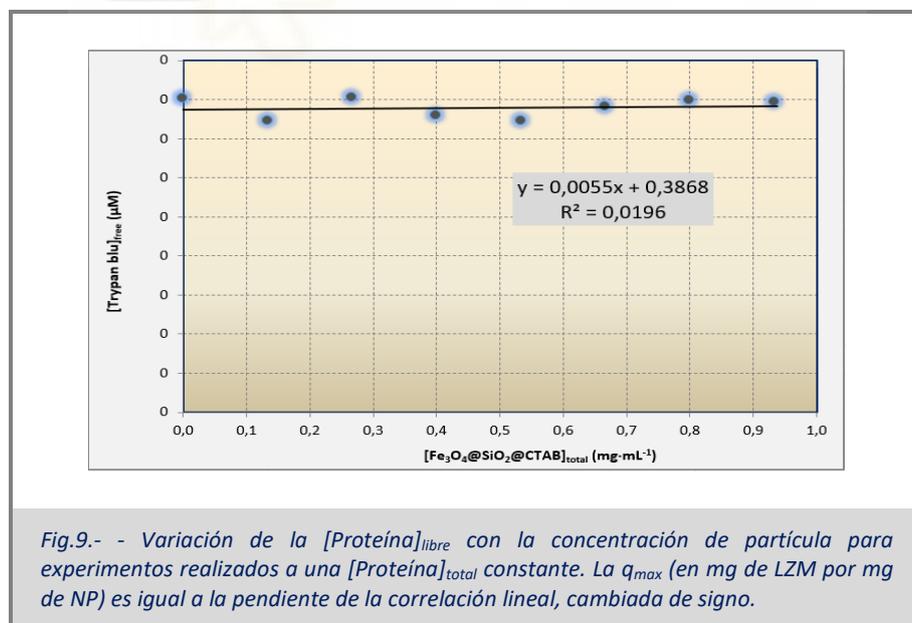
Con objeto de comprobar que la interacción electrostática es la fuerza mayoritaria en la adsorción de proteínas a las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$, se diseñó un experimento en el que una proteína catiónica (lisozima) se enfrentó a concentraciones crecientes de micropartícula. Es de esperar

que no se produzca la adsorción de la proteína a menos que el carácter fuertemente hidrofóbico del interior de las micelas de CTAB estabilice algún estado parcialmente desplegado de la proteína.

Para este fin, se preparó una serie de disoluciones en diversos tubos Eppendorf, que contenían lisozima y buffer HEPES a pH 7.0, de manera que la proteína se encuentre cargada positivamente, dado que su punto isoeléctrico es de 10,7. Tanto el buffer como la lisozima se mantuvieron a concentraciones constantes en todos los tubos, mientras que las concentraciones de nanopartículas variaron de manera progresiva en cada uno de los tubos. Finalmente, se añadió agua a cada mezcla hasta alcanzar un volumen total de 1,5 mL.

Las dispersiones finales (que contenían tanto las partículas magnéticas como la lisozima) presentaron una concentración de 10 mM de buffer HEPES ajustado a pH 7.0. La concentración total de proteína (lisozima) fue constante, aproximadamente 0,4 mg/mL, mientras que la concentración de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$ variaba entre 0 y 0,93 mg/mL. Cabe destacar que la concentración de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$ provino del stock de nanopartículas de magnetita a 2 mg/mL, utilizado en el experimento previo con azul de tripano.

Dado que en este caso el ligando es una proteína, se utilizó un rango de longitudes de onda diferente en el espectrofotómetro. Las mediciones se realizaron en un rango de 240 nm a 400 nm, con un pico de máxima absorbancia registrado alrededor de los 280 nm. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 9.



Como se observa, la capacidad máxima de adsorción de las partículas magnéticas es prácticamente nula (-0,0055 mg de lisozima por mg de nanopartículas). La explicación de este

resultado es sencilla: considerando que el punto isoeléctrico de la lisozima es 10,7 y el pH fisiológico de nuestras disoluciones es 7, la proteína lisozima presenta una carga positiva, como se mencionó anteriormente. Por otro lado, las nanopartículas están recubiertas con CTAB, un surfactante catiónico, lo que implica que tienen una carga superficial positiva. Esto genera que, al entrar en contacto la lisozima y el CTAB, ambos componentes se repelan debido a la coincidencia de carga. Este experimento con la proteína lisozima se realizó únicamente como un control experimental.

Finalmente, el experimento permite deducir que la presencia de micelas de CTAB en la superficie de la micro partícula no induce cambios conformacionales en la proteína que podría facilitar la adsorción a la misma de moléculas de proteína parcialmente desplegadas, más hidrofóbicas que las que se encuentran en su estado nativo.

6.3. Adsorción de albúmina sérica bovina (BSA) sobre partículas de magnetita.

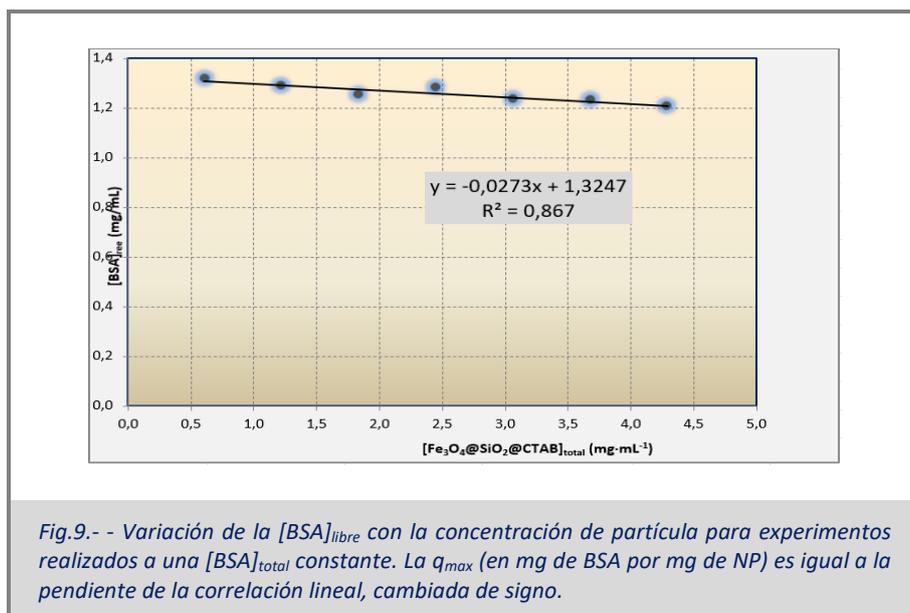
Con el objetivo de analizar los niveles de adsorción de nuestras partículas magnéticas recubiertas con CTAB ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$) hacia diferentes ligandos, en este estudio nos centramos en el segundo ligando proteico seleccionado: la albúmina sérica bovina (BSA). Para ello, se preparó una serie de diluciones en tubos Eppendorf. En el experimento inicial, el número de tubos fue inferior al de experimentos posteriores. Cada tubo contenía buffer ajustado a pH neutro (pH 7) para garantizar que la proteína tuviera carga negativa, dado que su punto isoeléctrico (pI) es de 5,59.

Siguiendo la metodología aplicada en experimentos anteriores, las concentraciones del buffer y del ligando (en este caso, BSA) se mantuvieron constantes en todos los tubos, mientras que la concentración de las nanopartículas magnéticas se incrementó progresivamente en cada muestra. Para alcanzar un volumen final uniforme de 1,5 mL, las soluciones se ajustaron añadiendo agua desionizada.

Las dispersiones finales, que contenían las partículas magnéticas y la albúmina sérica bovina, se prepararon con una concentración de 10 mM de buffer ajustado a pH 7. La concentración total de proteína se mantuvo constante, alrededor de 1,5 mg/mL, mientras que la concentración de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$ varió dependiendo del experimento.

6.3.1. Adsorción de la BSA a las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$ en ausencia de sal.

Como cabía esperar, dado que a pH 7 (por encima de su punto isoeléctrico) la proteína está cargada negativamente, un miligramo de micropartícula es capaz de adsorber alrededor de 27,3 μg de BSA tal y como se muestra en la Fig. 9.



La moderada $q_{m\acute{a}x}$ obtenida para la BSA a pH 7 debe ser correlacionada con la escasa carga negativa de la proteína dado que se encuentra a tan solo 1,4 unidades de pH por encima de su punto isoeléctrico sin que todos los residuos ionizables se hayan deprotonado. Sin embargo, y para facilitar la comparación de la capacidad de adsorción de estas micropartículas frente a distintos ligandos, se decidió realizar este estudio al mismo pH que el resto de experimentos presentados en este trabajo.

6.3.2. Efecto de la fuerza iónica sobre la capacidad de adsorción de las partículas.

A pH fisiológico, es previsible que la adsorción de las moléculas de albúmina sérica bovina (carga neta negativa, $pI = 5,59$) sobre las partículas recubiertas de CTAB (carga neta positiva) esté dominada principalmente por interacciones electrostáticas. Por lo tanto, se espera que la capacidad de adsorción se vea negativamente afectada por el apantallamiento electrostático inducido por la fuerza iónica.

Los resultados se presentan en la Figura 10.

El análisis de los resultados indica que la capacidad máxima de adsorción de las partículas magnéticas $Fe_3O_4@SiO_2@CTAB$ no es elevada, lo cual era previsible, dado que la adsorción de la proteína BSA sobre las partículas de magnetita en ausencia de sales ya presentaba valores reducidos.

Sorpresivamente, no se observa un patrón claro en la variación de $q_{m\acute{a}x}$ con la concentración de NaCl.

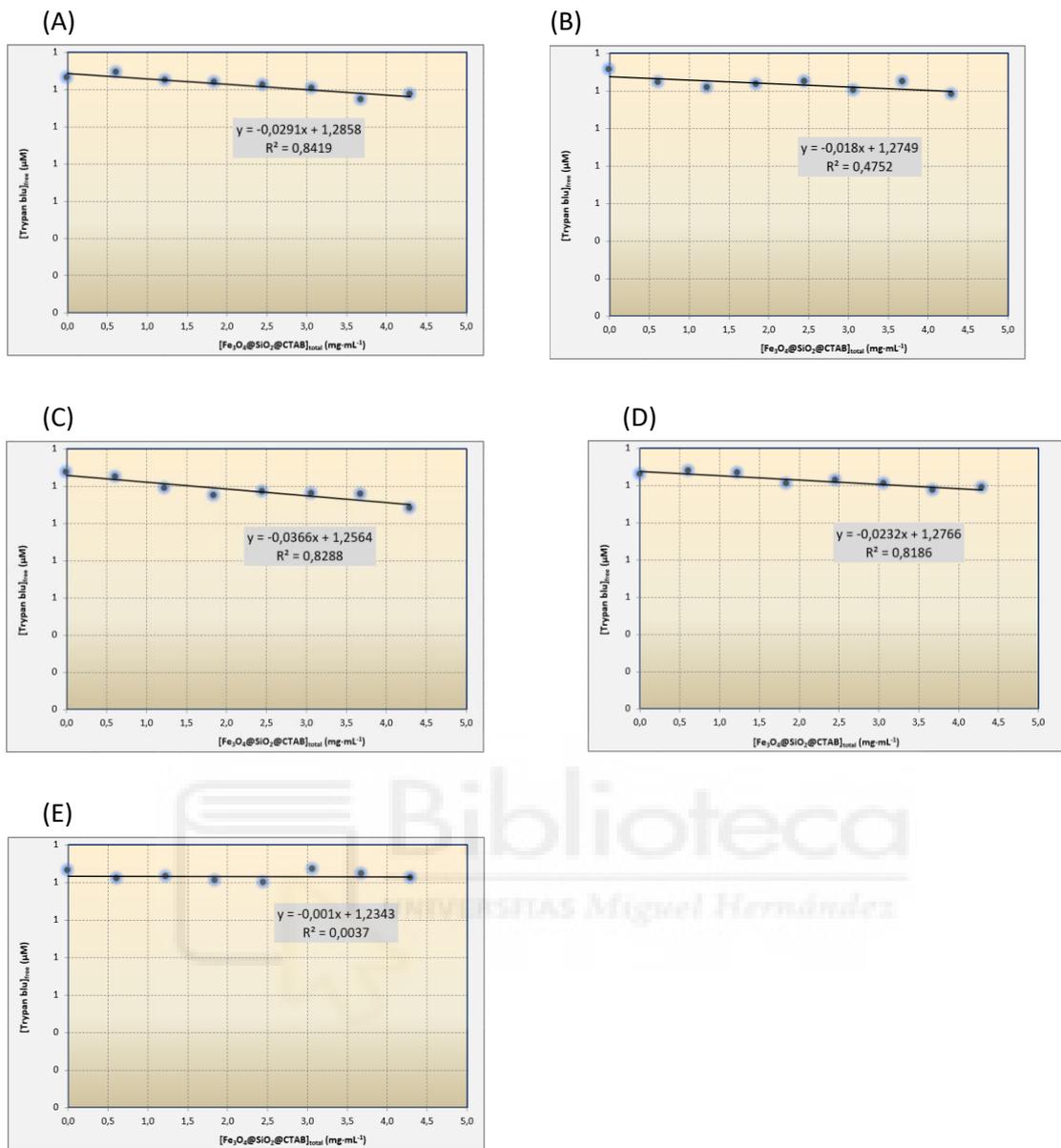
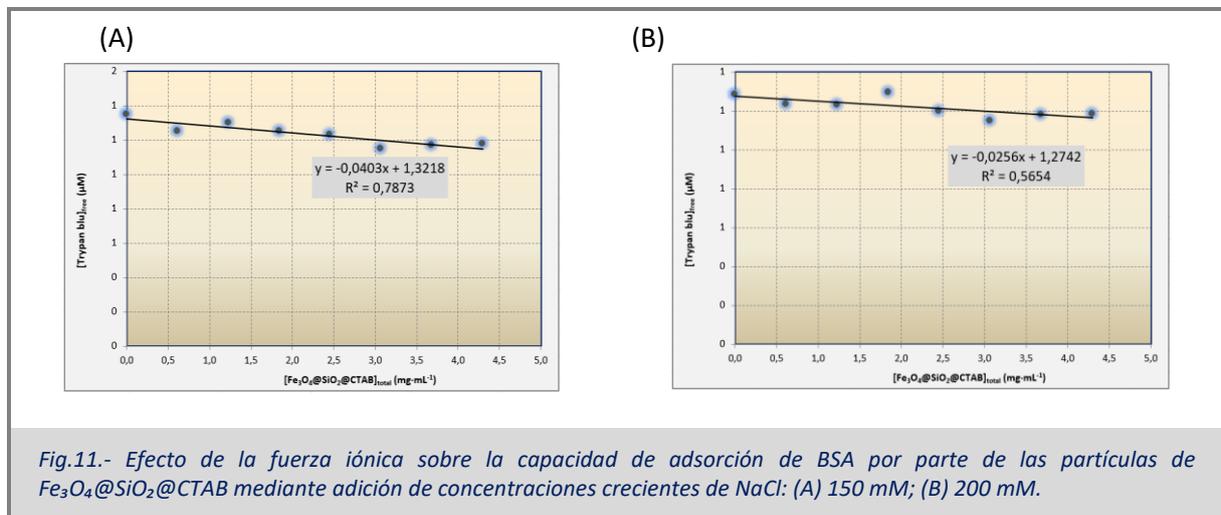


Fig.10.- Efecto de la fuerza iónica sobre la capacidad de adsorción de BSA por parte de las partículas de $Fe_3O_4@SiO_2@CTAB$ mediante adición de concentraciones crecientes de NaCl: (A) 50 mM; (B) 100 mM; (C) 150 mM; (D) 200 mM; 250 mM

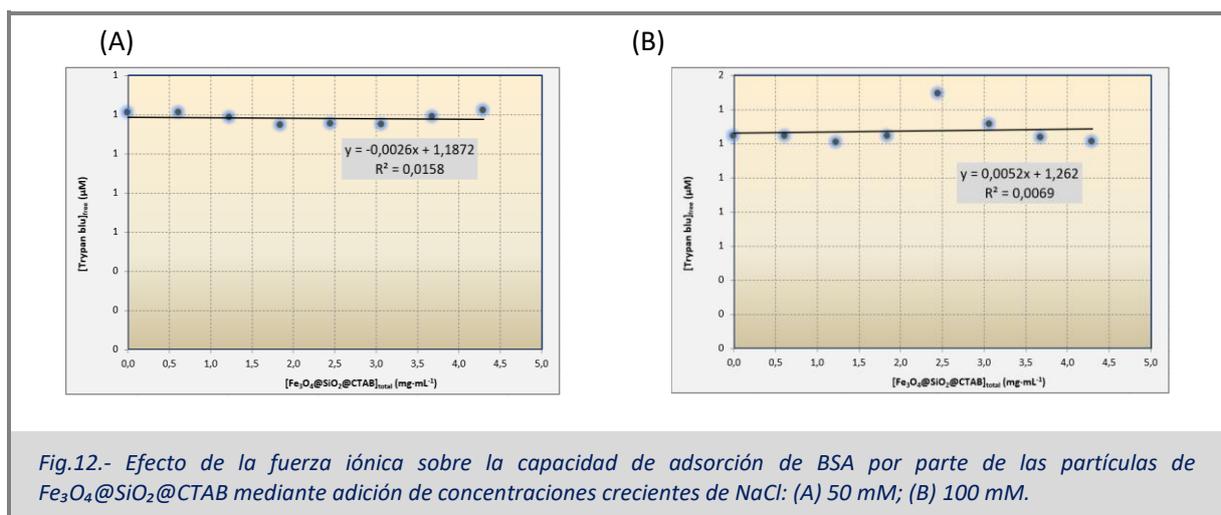
No obstante, al examinar en detalle los resultados obtenidos para cada concentración de NaCl, se observa que los valores de q_{max} a 50 y 100 mM son coherentes con la capacidad de adsorción determinada en el experimento 2 (0,027 mg de BSA por mg de nanopartícula). Sin embargo, las capacidades de adsorción obtenidas a concentraciones de 150 y 200 mM de NaCl son significativamente más elevadas en comparación con las anteriores, lo que sugiere la posible presencia de un factor adicional que influye en el proceso de adsorción. Para descartar la existencia de un error experimental, estos dos experimentos fueron repetidos.

En el caso de la concentración de 250 mM de NaCl, el valor de q_{\max} obtenido fue prácticamente nulo, en concordancia con lo esperado, ya que a concentraciones tan elevadas de sal las partículas pierden su capacidad de adsorber la proteína BSA.



Tras repetir los experimentos a concentraciones de 150 y 200 mM de NaCl (Fig. 11), se comprobó que los valores de la capacidad de adsorción de las partículas de magnetita seguían siendo significativamente elevados.

A partir de estos resultados, surgió la hipótesis de que los posibles errores no estuvieran en los valores de q_{\max} obtenidos para las concentraciones de 150 y 200 mM, sino en los correspondientes a 50 y 100 mM de NaCl. Para descartar cualquier error experimental, se decidió repetir también estos últimos experimentos y verificar la consistencia de los resultados.



Tras realizar nuevamente las mediciones de absorbancia en las muestras correspondientes a 50 y 100 mM de NaCl, los resultados obtenidos mostraron una discrepancia significativa con respecto

a los experimentos iniciales. En esta ocasión, la capacidad de adsorción de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$ sobre la proteína BSA fue considerablemente menor, lo que indica una posible variabilidad en las condiciones experimentales o en el procedimiento de medición.

Dado que los resultados obtenidos presentaban anomalías, se decidió realizar una serie de comprobaciones para evaluar si el detergente CTAB podría estar afectando la estabilidad de la proteína BSA. Para ello, se prepararon tres tubos Eppendorf con diferentes concentraciones de NaCl: 0 mM, 100 mM y 200 mM. Todas las muestras contenían la misma cantidad de tampón, partículas, proteína y un volumen final ajustado a 1,5 mL con agua. Posteriormente, los tubos fueron sometidos a agitación durante 24 horas, tras lo cual se realizó una separación magnética para obtener el sobrenadante. Con este sobrenadante, se llevó a cabo un experimento de fluorescencia con el objetivo de evaluar la estructura terciaria de la proteína.

Los detergentes, como el CTAB, pueden inducir la desnaturalización de las proteínas. En el caso de la albúmina sérica bovina (BSA), este proceso es irreversible. Se planteó la hipótesis de que, al interactuar con las micelas de CTAB, la BSA se desnaturalizaba y reorganizaba sus dominios hidrofílicos, lo que resultaba en una interacción desfavorable debido a la presencia de regiones hidrofóbicas tanto en la proteína como en el detergente. Como consecuencia, el sobrenadante podría contener una mezcla de BSA en su conformación nativa y desnaturalizada, afectando su coeficiente de extinción.

Para evaluar esta hipótesis, se realizaron experimentos de fluorescencia a dos condiciones de temperatura. En el primer experimento, se midió la fluorescencia a 20 °C con un voltaje de 625 V, excitando la muestra a 280 nm y registrando el espectro de emisión entre 300 y 400 nm con incrementos de 0,5 nm. Los espectros obtenidos fueron muy similares entre sí, lo que sugería que el CTAB no estaba afectando significativamente la estructura de la proteína. Sin embargo, para confirmar estos resultados, se realizó un segundo experimento de fluorescencia utilizando un rango de temperatura de 20 °C a 100 °C con un incremento lineal. En este caso, se mantuvo la excitación a 280 nm y se registró el espectro de emisión entre 360 y 400 nm a un voltaje de 625 V. El objetivo de este experimento era inducir la desnaturalización térmica de la proteína para evaluar si su intensidad de fluorescencia disminuía en comparación con su estado nativo, además de determinar si la temperatura de desnaturalización (T_m) era similar en todas las muestras.

Los resultados indicaron que todas las muestras presentaban valores similares de T_m , lo que permitió concluir que el CTAB no afectaba negativamente a la estabilidad de la BSA. De hecho, se observó que en dos de las muestras la temperatura de desnaturalización era entre dos y tres grados centígrados superior a la reportada para la BSA en condiciones normales, lo que sugiere un ligero efecto estabilizador del CTAB sobre la proteína.

Finalmente, se concluyó que los resultados anómalos obtenidos en la evaluación del efecto de la fuerza iónica se debían probablemente a la naturaleza iónica del CTAB, que presenta grupos amonio cuaternario (NH_4^+) en su estructura. Es posible que la presencia de NaCl favoreciera la disrupción de las micelas de CTAB, permitiendo que los grupos amonio interaccionaran directamente con la BSA, lo que reduciría la cantidad de proteína libre disponible para ser adsorbida por las partículas magnéticas.

6.4. Adsorción de azul de tripano encapsulado en partículas de sílice sobre partículas de magnetita.

En esta etapa del trabajo, se estudiará la adsorción de azul de tripano encapsulado en partículas de sílice. En particular, se evaluará la interacción del colorante con las partículas de sílice funcionalizadas ($\text{SiO}_2@\text{PDADMACl}@\text{TB}@\text{PVSA}$.) y con las nanopartículas magnéticas recubiertas con CTAB ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$).

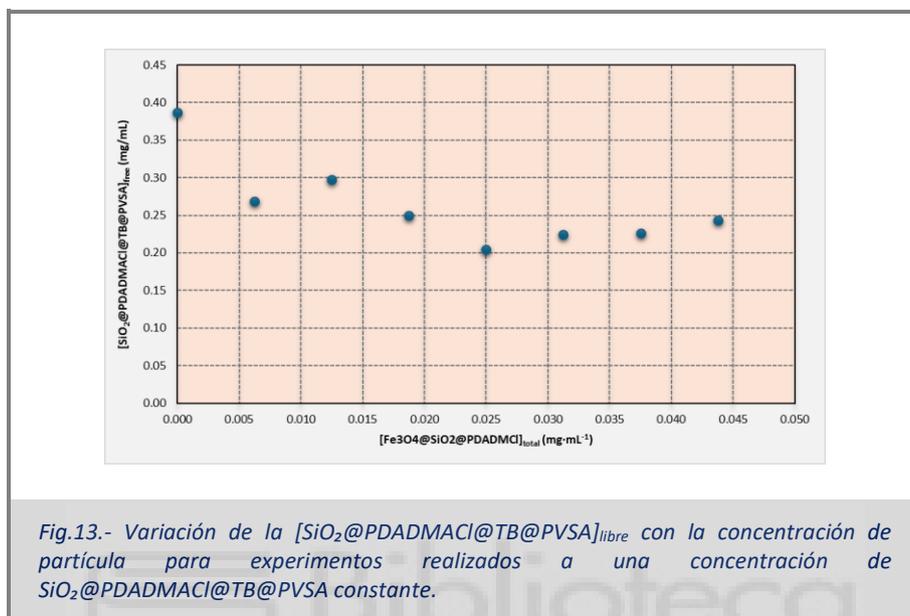
Para ello, se prepararon una serie de dispersiones en tubos Eppendorf, en las que se añadirá azul de tripano adsorbido en $\text{SiO}_2@\text{PDADMACl}@\text{PVSA}$, junto con un buffer a pH 7, con el fin de mantener un pH fisiológico. En estas condiciones, el polielectrolito PVSA, presente en la superficie de las partículas de sílice que contienen al colorante, permanecerá en su forma aniónica, favoreciendo la interacción con las nanopartículas magnéticas. Tanto la concentración del buffer (10 mM, pH 7) como la del ligando ($\approx 0,5$ mg/mL) se mantendrán constantes en todas las muestras, mientras que la concentración de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$ se variará sistemáticamente.

En la realización del primer experimento, los resultados obtenidos parecían indicar que las partículas de magnetita eran capaces de adsorber la totalidad de las moléculas de azul de tripano en $\text{SiO}_2@\text{PDADMACl}@\text{PVSA}$, ya que las absorbancias medidas en los tubos fueron cercanas a cero. No obstante, esta interpretación resultó ser errónea, ya que se observó que las partículas de azul de tripano en $\text{SiO}_2@\text{PDADMACl}@\text{PVSA}$ precipitaban, lo que provocaba que el sobrenadante no fuera homogéneo.

Para corregir este problema, se decidió repetir el experimento introduciendo una serie de modificaciones. En particular, tras la separación magnética, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio con el fin de agitarlo antes de la medición de absorbancia y asegurar así su homogeneidad.

Los resultados siguieron mostrando una baja reproducibilidad observándose que la dispersión de los sobrenadantes no guardaban correlación directa con las cantidades de partículas magnéticas añadidas ya que era previsible una disminución monotónica de la cantidad de partículas de sílice conteniendo el azul de tripano al aumentar la cantidad de partículas magnéticas en el medio de reacción.

Nuestra hipótesis para explicar este comportamiento fue que, durante la separación de las partículas magnéticas del sobrenadante, se producía un arrastre de partículas de magnetita (adheridas a la pared del tubo por efecto del imán situado en su exterior), lo que generaba una inconsistencia en los resultados (la dispersión del sobrenadante venía aumentada por la cantidad de partículas $\text{SiO}_2@PDADMACl@PVSA$ arrastradas al succionar el sobrenadante).



Existen varias hipótesis que deberán ser contrastadas en el futuro que podrían explicar estos resultados. Por un lado, desde el punto de vista metodológico, la utilización de la dispersión del sobrenadante (turbidez) como el observable para determinar la concentración de partículas de sílice que contiene el sobrenadante podría no ser adecuada. El hecho que parte de las partículas de magnética unidas a la pared interior del tubo que contiene la muestra por la atracción magnética del imán exterior pueda ser arrastrada al succionar el sobrenadante, impone restricciones muy importantes a la metodología experimental seguida.

En este sentido, parecería más adecuado utilizar partículas de sílice que contengan fluoróforos en su interior (entrapados durante la síntesis de las partículas de sílice) de forma que sea su fluorescencia el observable monitorizado. Esto permitiría disminuir drásticamente la concentración de sílice de la muestra (y de partículas de magnetita) evitando en buena medida estos problemas experimentales.

Por otra parte, el análisis crítico de los resultados plantea dudas acerca de la utilización de partículas de magnetita que contienen micelas de CTAB únicamente adheridas a su superficie mediante interacciones electrostáticas. La captura de las partículas $\text{SiO}_2@PDADMACl@PVSA$ (cargadas negativamente por la capa exterior de PVASA que contienen) por las partículas de magnetita,

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$ (cargadas positivamente debido a la presencia de CTAB en su capa externa) presupone que las construcciones capa a capa de cada una de las partículas permaneces estables. Sin embargo, existe la posibilidad que la interacción entre las capas más externas de cada partícula, PVSA (-) y CTAB (+), pudieran ser arrancados de cada partícula si la interacción mutua PVSA@CTAB tuviese una afinidad mayor que cada uno de sus componentes por la cada una de ls partículas individuales.

Por todo ello, se plantea la necesidad de diseñar nuevas partículas de magnetita cuyo recubrimiento esté unido a su superficie mediante enlaces covalentes lo que eliminaría esta posibilidad.

6.5. Adsorción de Latex Beads sobre partículas de magnetita.

En la etapa final del estudio, se emplearán partículas esféricas de látex como modelo representativo de microplásticos, con el objetivo de evaluar su interacción con partículas magnéticas recubiertas con el surfactante CTAB ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$).

Para ello, se prepararán una serie de dispersiones en tubos Eppendorf, en las que se añadirán perlas de látex junto con un tampón a pH 7, a fin de mantener condiciones fisiológicas. En estas condiciones, se favorece la adhesión de las partículas de látex a las micelas de CTAB que recubren las partículas magnéticas, promoviendo la interacción entre ambas clases de partículas.

Debido a que las partículas de látex carecen de cromóforos, su determinación se realizará mediante la medida de la turbidez de la dispersión resultante tras ser tratadas con las partículas magnéticas. En todas las muestras, la concentración del tampón (10 mM, pH 7) y la del ligando (aproximadamente 0,18 mg/mL) se mantendrán constantes, mientras que la concentración de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$ se variará de manera sistemática.

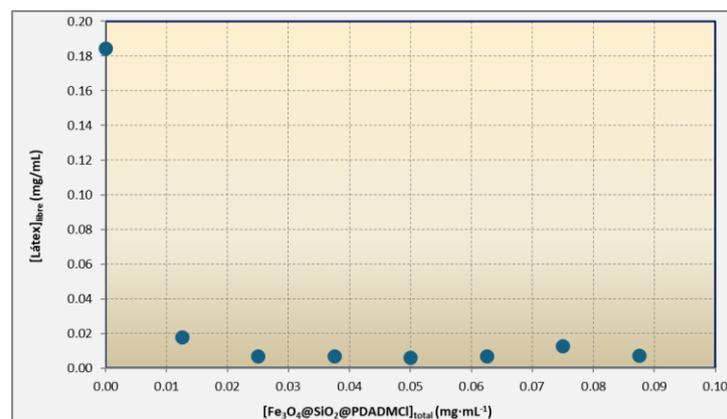


Fig.14.- Variación de la concentración de partículas de látex en función de la concentración de partículas magnéticas presentes en la dispersión.

Los resultados preliminares (ver Fig. 14) muestran que las partículas de magnetita, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$, muestran una elevada capacidad para adsorber a su superficie las partículas de látex que, además de su hidrofobicidad intrínseca, contiene en su superficie grupos sulfato (de carga negativa) para disminuir su tendencia a agregar en disoluciones acuosas.

Adicionalmente, se realizó una prueba de control para estimar si existía interacción entre las partículas de látex y la superficie interior de los tubos de polipropileno utilizados para incubar las muestras. Tras incubar la muestra durante 24 h se observó una diferencia notable entre la cantidad de látex presente inicialmente y la detectada a l cabo de 24 horas. Para mitigar este problema, se optó por emplear tubos de vidrio, dado que tanto el vidrio como las perlas de látex presentan carga negativa, lo que genera un efecto de repulsión y evita la adhesión de las perlas a las paredes del recipiente.

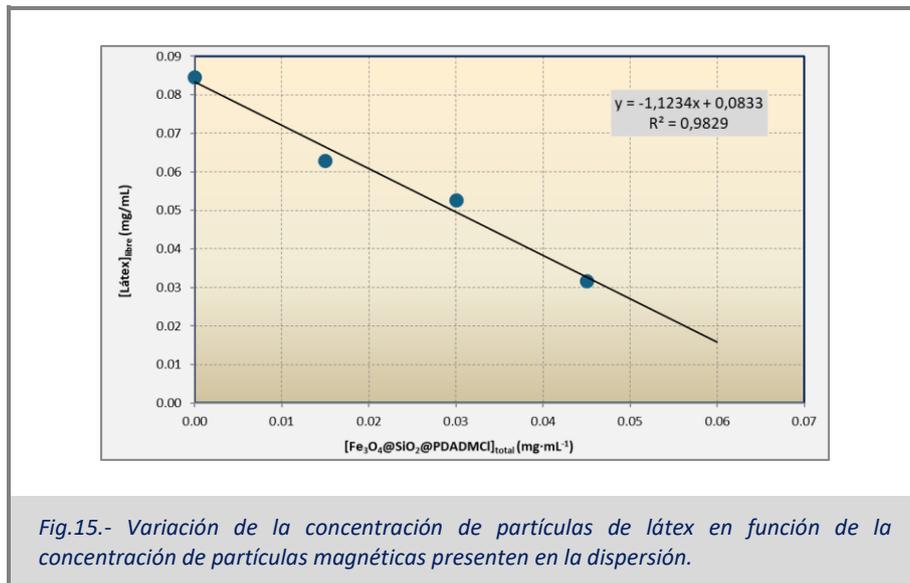
El experimento fue repetido utilizando tubos de vidrio y manteniendo la concentración de nanopartículas en 0,02 mg/mL. No obstante, los resultados siguieron sin ser los esperados, ya que el tubo O continuó mostrando una variación considerable en la absorbancia entre mediciones realizadas en diferentes momentos. Se consideró entonces que el tipo de cubeta empleada en las mediciones espectrofotométricas podría estar afectando los resultados, debido a que las cubetas de metacrilato podrían favorecer la adhesión de las perlas de látex a sus paredes.

Asimismo, se observó que las perlas de látex, al presentar una densidad inferior a la del agua y ser altamente hidrofóbicas, tendían a ascender hasta la interfase, donde se encontraban en un estado más estable. Además, estas perlas mostraban una tendencia a la agregación, fenómeno que se veía acentuado al someterlas a agitación. Para evitar la flotación de las partículas de látex, se preparó una nueva suspensión stock de perlas de látex con la adición del detergente Teen 20, el cual no solo ayudaba a evitar la formación de agregados, sino que también favorecía su dispersión en la solución.

Finalmente, para evaluar la efectividad de esta modificación, se realizó un experimento de cinética utilizando cubetas de vidrio, a la cual se añadió un volumen de partículas de látex de 80 μl . En este ensayo, se observó que la absorbancia de las partículas de látex se mantenía relativamente constante a lo largo del tiempo, lo que indicaba una mayor estabilidad del sistema y sugería que la solución implementada era efectiva.

La Fig. 15 muestra los resultados obtenidos para la adsorción de látex a las partículas magnéticas en presencia del detergente no iónico tween 20. Aunque la presencia del detergente favorece la estabilidad de la dispersión (evitando la aglomeración de las partículas de látex) la capacidad de adsorción de las partículas magnéticas se ve reducida frente al experimento anterior en

ausencia del detergente. Incluso en estas condiciones, la capacidad de carga de las partículas magnéticas resulta ser elevada (alrededor de 1,1 mg de látex por g de partícula magnética).



La causa de esta disminución en la adsorción se atribuyó a la presencia del detergente TWIN 20 en la suspensión de látex. Dado que las partículas de magnetita recubiertas con CTAB debían competir con el Teen 20 por la adsorción en la superficie de las perlas de látex, la estabilidad proporcionada por el detergente dificultaba la interacción con las partículas magnéticas. No obstante, se puede concluir que, si en estas condiciones las partículas Fe₃O₄@SiO₂@CTAB lograban capturar una mínima cantidad de perlas de látex, en un entorno real, donde el látex no se encuentra estabilizado con Teen 20, estas partículas magnéticas serían aún más eficientes. Por tanto, los resultados sugieren que las nanopartículas desarrolladas podrían ser útiles para la eliminación de microplásticos en aguas continentales.

Estos resultados permiten concluir que las partículas Fe₃O₄@SiO₂@CTAB presentan una alta eficiencia en la captura y eliminación de microplásticos en aguas continentales. Además, es probable que su eficacia se incremente en condiciones reales, dado que en ausencia del detergente Teen 20 no habría competencia por los sitios de adsorción en las perlas de látex.

7. Conclusiones

- ✓ Las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$ demostraron una capacidad notable de adsorción para el colorante azul de tripano, con valores de q_{max} alrededor de 8,6 mg de colorante por mg de partícula.
- ✓ Las partículas magnéticas utilizadas mostraron baja capacidad de adsorción sobre los ligandos proteicos. En el caso de la lisozima ambas moléculas presentaban la misma carga y en el caso de la BSA no pudo ser determinada por posibles interacciones entre la proteína y las micelas de CTAB.
- ✓ Las partículas de magnetita recubiertas de CTAB, mostraron cierta capacidad para adsorber partículas de sílice con azul de tripano encapsulado, $\text{SiO}_2@\text{PDADMACl}@\text{TB}@\text{PVSA}$ aunque ésta no pudo ser determinada por problemas metodológicos (ver última conclusión).
- ✓ En el caso de las perlas de látex (modelo de microplásticos), la adsorción fue significativa, alcanzando un valor máximo de alrededor de 1,1 mg de látex por mg de partícula magnética. En condiciones reales, sin la presencia de detergentes como Teen 20, la eficacia de las nanopartículas en la captura de microplásticos podría ser aún mayor.
- ✓ Los resultados sugieren que las nanopartículas funcionalizadas con el surfactante, CTAB, tienen un gran potencial para la eliminación de micropartículas y microplásticos en aguas continentales.
- ✓ Los resultados parecen apuntar a la escasa estabilidad de las partículas construidas capa a capa (tanto $\text{SiO}_2@\text{PDADMACl}@\text{TB}@\text{PVSA}$ como $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{CTAB}$) cuando interactúan entre sí.

8. Proyección futura

Los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Grado pueden servir como base para el desarrollo de partículas magnéticas optimizadas para la captura y eliminación de micromoléculas y microplásticos en aguas continentales contaminadas.

Un análisis crítico de los resultados nos hace pensar que parte de los problemas ya comentados al analizar la adsorción de azul de tripono encapsulado en sílice están afectando a estos experimentos.

Por un lado, sería aconsejable utilizar partículas de látex que contengan en su interior fluoróforos que permitan determinar más fácilmente su concentración evitando usar la turbidez de la dispersión sobrenadante (densidad óptica) para determinar su concentración.

Por otro, existe la posibilidad que la elevada hidrofobicidad de los microplásticos (siendo el látex uno de ellos) afecta la estabilidad de las propias partículas de magnetita eliminando las micelas de CTAB de su superficie, induciendo la interacción directa CTAB – látex y evitando su captura. Por ello, parece razonable abogar por el diseño de partículas de magnetita que manteniendo las características que le confiere la superficie de CTAB, una mediante enlaces covalentes el interior de la partícula de magnetita con su recubrimiento.



9. Bibliografía

1. Chaudhary, R., Nawaz, K., Khan, A. K., Hano, C., Abbasi, B. H., & Anjum, S. (2020). An overview of the algae-mediated biosynthesis of nanoparticles and their biomedical applications. *Biomolecules*, 10(11).
2. Vangijzegem, T., Stanicki, D., & Laurent, S. (2018). Magnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery: applications and characteristics. *Expert Opinion on Drug Delivery*.
3. Dadfar, S. M., Roemhild, K., Drude, N. I., von Stillfried, S., Knüchel, R., Kiessling, F., & Lammers, T. (2019). Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*.
4. Farajian, F., & Hashemi, P. (2022). Superparamagnetic tragacanth coated Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles for the loading and delivery of metformin. *Acta Chimica Slovenica*, 69(3), 714–721. <https://doi.org/10.17344/acsi.2021.7240>
5. Mukherjee, S., Sarkar, B., Aralappanavar, V. K., Mukhopadhyay, R., Basak, B. B., Srivastava, P., Marchut-Mikołajczyk, O., Bhatnagar, A., Semple, K. T., & Bolan, N. (2022). Biochar-microorganism interactions for organic pollutant remediation: Challenges and perspectives. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 308, 119609.
6. López, G. (2018). Nanotecnología aplicada a remediación ambiental: Cuatro estudios de caso. ResearchGate.
7. Guo, X., Zuo, X., Zhou, Z., Gu, Y., Zheng, H., Wang, X., Wang, G., Xu, C., & Wang, F. (2023). PLGA-Based Micro/Nanoparticles: An Overview of Their Applications in Respiratory Diseases. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(5), 4333.
8. Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal Of Nanobiotechnology*, 20(1).
9. Bhat, S. A., Bashir, O., Haq, S. A. U., Amin, T., Rafiq, A., Ali, M., Américo-Pinheiro, J. H. P., & Sher, F. (2022). Phytoremediation of heavy metals in soil and water: An eco-friendly, sustainable and multidisciplinary approach. *Chemosphere*, 303, 134788.
10. Liu, Y., He, G., He, T., & Saleem, M. (2022). Signaling and Detoxification Strategies in Plant-Microbes Symbiosis under Heavy Metal Stress: A Mechanistic Understanding. *Microorganisms*, 11(1), 69.
11. Winiarska, E., Jutel, M., & Zemelka-Wiacek, M. (2024). The potential impact of nano- and microplastics on human health: Understanding human health risks. *Environmental Research*, 251, 118535.

12. Symeonides, C., Aromataris, E., Mulders, Y., Dizon, J., Stern, C., Barker, T. H., Whitehorn, A., Pollock, D., Marin, T., & Dunlop, S. (2024). An Umbrella Review of Meta-Analyses Evaluating Associations between Human Health and Exposure to Major Classes of Plastic-Associated Chemicals. *Annals Of Global Health*, 90(1), 52.
13. Aurisano, N., Huang, L., Canals, L. M. I., Jolliet, O., & Fantke, P. (2020). Chemicals of concern in plastic toys. *Environment International*, 146, 106194.
14. Jiang, B., Kauffman, A. E., Li, L., McFee, W., Cai, B., Weinstein, J., Lead, J. R., Chatterjee, S., Scott, G. I., & Xiao, S. (2020). Health impacts of environmental contamination of micro- and nanoplastics: a review. *Environmental Health And Preventive Medicine*, 25(1).
15. Prüst, M., Meijer, J., & Westerink, R. H. S. (2020b). The plastic brain: neurotoxicity of micro- and nanoplastics. *Particle And Fibre Toxicology*, 17(1).
16. Zhang, Y., Diehl, A., Lewandowski, A., Gopalakrishnan, K., & Baker, T. (2020b). Removal efficiency of micro- and nanoplastics (180 nm–125 µm) during drinking water treatment. *The Science Of The Total Environment*, 720, 137383.
17. Grządka, E., Godek, E., Słowik, G., Kowalczyk, A., Matusiak, J., & Maciołek, U. (2022). Interactions between Nanoclay, CTAB and Linear/Star Shaped Polymers. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(6), 3051.
18. Garza-Navarro, M. A. (2022). Aglomerados de nanopartículas basados en magnetita y CTAB. Uanl.
19. Filippov, S. K., Khusnutdinov, R., Murmiliuk, A., Inam, W., Zakharova, L. Y., Zhang, H., & Khutoryanskiy, V. V. (2023). Dynamic light scattering and transmission electron microscopy in drug delivery: a roadmap for correct characterization of nanoparticles and interpretation of results. *Materials Horizons*, 10(12), 5354-5370.
20. Farkas, N., & Kramar, J. A. (2021). Dynamic light scattering distributions by any means. *Journal Of Nanoparticle Research*, 23(5).
21. Hassan, N. A., Darwesh, O. M., Smuda, S. S., Altemimi, A. B., Hu, A., Cacciola, F., Haoujar, I., & Abdelmaksoud, T. G. (2022). Recent Trends in the Preparation of Nano-Starch Particles. *Molecules*, 27(17), 5497.
22. Marshall, T., Lamont, K., Marangoni, A. G., Lim, L., Wang, X., & Pensini, E. (2021). Trypan blue removal from water with zein sorbents and laccase. *SN Applied Sciences*, 3(1).
23. Santana, M. D. F., Couceiro, S. R. M., & Lara, T. S. (2023). Biodegradation and reduction of toxicity of Azo trypan blue dye by Amazonian strains of gasteroid fungi (Basidiomycota). *Brazilian Journal Of Biology*, 83.
24. Lesnierowski, G., & Kijowski, J. (2007). Lysozyme. *Bioactive Egg Compounds*, 33–42.
25. Blake, C. C. F., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C., & Sarma, V. R.

- (1965). Structure of hen egg-white lysozyme: a three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, 206(4986), 757-761.
26. Gálvez-Iriqui, A., Plascencia-Jatomea, M., & Bautista-Baños, S. (2020). Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms. *Mexican Journal Of Phytopathology*, 38(3).
 27. Singh, A. (2019). Mechanistic Interaction Study of Bromo-Noscapine with Bovine Serum Albumin employing Spectroscopic and Chemoinformatics Approaches OPEN. Du-in.
 28. Borsarelli, C. D., & Ostatna, V. (2016). Interaction of singlet oxygen with bovine serum albumin and the role of the protein nano-compartmentalization. *Unse*.
 29. Rahimzadeh, C. Y., Barzinjy, A. A., Mohammed, A. S., & Hamad, S. M. (2022). Green synthesis of SiO₂ nanoparticles from *Rhus coriaria* L. extract: Comparison with chemically synthesized SiO₂ nanoparticles. *PLoS ONE*, 17(8), e0268184.
 30. Li, S., Zhang, T., Tang, R., Qiu, H., Wang, C., & Zhou, Z. (2015). Solvothermal synthesis and characterization of monodisperse superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 379, 226–231.
 31. Bappaditya, N. (2025) Micellization and Physicochemical Properties of CTAB in Aqueous Solution: Interfacial Properties, Energetics, and Aggregation Number at 290 to 323 K. *Colloids Interfaces* 9(1), 4
 32. Parida, S.K; Sukalyan, D.; Sabita, P. and Mishra, B.K. (2006). Adsorption of organic molecules on silica surface. *Advances in Colloid and Interface Science* 121 (2006) 77–110
 33. Kubiak-Ossowska, K; Cwieka, M.; Kaczynska, A.; Jachimskab, B. and Mulhera P.A. (2015). Lysozyme adsorption at a silica surface using simulation and experiment: effects of pH on protein layer structure. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17, 24070-24077
 34. Kumar, S.; Aswal, V.K. and Callow.P. (2014)pH-Dependent Interaction and Resultant Structures of Silica Nanoparticles and Lysozyme Protein. *Langmuir* 30, 6, 1588–1598