



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Síntesis y Caracterización de Partículas Janus

TESIS

Que para obtener el título de

Ingeniera Química

PRESENTA

Laura Cecilia Mugica Sánchez

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Anna Kozina



Cd. Universitaria, Cd. Mx., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: SILVIA PÉREZ CASAS

VOCAL: Profesor: MARÍA GUADALUPE LEMUS BARAJAS

SECRETARIO: Profesor: ANNA KÓZINA

1er SUPLENTE: Profesor: JUAN MANUEL GERMÁN ACACIO

2do SUPLENTE: Profesor: NORMA CASTILLO RANGEL

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Anna Kózina

SUSTENTANTE:

Laura Cecilia Mugica Sánchez

El presente trabajo se exhibió en los siguientes eventos dentro de la Universidad Nacional Autónoma de México:

- Simposio Interno del Instituto de Química que se llevó a cabo del 8 al 10 de junio de 2015 bajo la modalidad de cartel, con el título “Decoration of silica particles with functional groups and their further conjugation”, obteniendo el primer lugar a nivel licenciatura.
- Simposio del 75 Aniversario del Instituto de Química que se llevó a cabo del 5 al 8 de abril de 2016 bajo la modalidad de cartel, con el título “Synthesis and characterization of Janus particles”, obteniendo el primer lugar a nivel licenciatura.

La publicación correspondiente al trabajo se encuentra disponible en la revista *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, bajo el nombre de “Surface functionalization of silica particles for their efficient fluorescence and stereo selective modification”, Laura C. Mugica, Braulio Rodríguez-Molina, Salvador Ramos y Anna Kozina, Vol. 500, pp. 79-87.

Agradecimientos

- A DGAPA UNAM (PAPIIT clave del proyecto: IA100215) y CONACYT (clave del proyecto: 238618) por apoyo económico.
- Al Instituto de Química por el acceso a sus instalaciones y uso de los equipos de RMN para muestras en solución.
- A Jorge Peón Peralta (IQUNAM) por el acceso a sus instalaciones y uso de equipos.
- A Andrés Aguilar Granada (IQUNAM) por su ayuda en el secado de disolventes para la silanización bajo condiciones secas.
- A Rolando Castillo y Salvador Ramos (IFUNAM) por el acceso a sus instalaciones y equipos.
- A Carlos Magaña (IFUNAM) en la adquisición de imágenes SEM.
- A Marco A. Vera-Ramírez (UAM-I) por la obtención de espectros de RMN CPMAS.
- A Danaí Montalvan-Sorrosa (IFC UNAM) por la ayuda en la síntesis de nanopartículas de oro.

Resumen

El auge en el estudio de sistemas con caracter anisotrópico que permiten implementar sistemas modelo y el entendimiento de diversos fenómenos en la naturaleza para su aplicación en materiales, biomedicina o informática surgió gracias a la introducción del término de *partículas Janus*.

Partículas Janus con hemisferios de afinidad opuestas creadas mediante la modificación química han representado grandes desafíos en lo que a su síntesis y caracterización se refiere.

La motivación de este trabajo es, a partir de los métodos previamente creadas y nuevas técnicas propuestas; establecer un método sistemático, simple, reproducible, escalable y eficiente de fabricación de partículas Janus. Además de tener una profunda comprensión sobre los métodos de conjugación y las técnicas necesarias para su fácil visualización y caracterización.

Primero se introduce el origen del término Janus y la importancia de las partículas anfifílicas, así como sus diversas aplicaciones. También se aborda la síntesis y caracterización de partículas Janus, y las propuestas para vencer las problemáticas que se presentan.

El segundo capítulo extiende una explicación teórica sobre las partículas de sílice: la química de su superficie, la funcionalización de su superficie con agentes silanos y la conjugación de los grupos amino en su superficie con nanopartículas de oro y un tinte fluorescente. También se describen los fundamentos teóricos sobre las técnicas de caracterización de partículas con diferentes tipos de modificación superficial.

El tercer capítulo concentra los métodos experimentales y los parámetros utilizados para cada síntesis.

En el cuarto capítulo se muestran los resultados más importantes y el análisis de los mismos con las técnicas mencionadas en el capítulo precedente.

El último capítulo resalta los logros y contribuciones más valiosas del trabajo. También se incluyen algunos análisis, espectros y uso de software en los apéndices.

Índice general

1. Introducción	1
2. Marco Teórico	6
2.1. Sistemas coloidales	6
2.1.1. Estabilización de carga	9
2.1.2. Estabilización estérica	11
2.2. Síntesis de partículas Janus	13
2.3. Química de la superficie de partículas de sílice	17
2.4. Modificación de la superficie de partículas de sílice con agentes silanos	19
2.5. Caracterización de partículas Janus	23
2.5.1. Rodamina B Isotiocianato (RBITC)	25
2.6. Métodos de caracterización de la superficie de partículas de sílice	28
2.6.1. Resonancia Magnética Nuclear	29
2.6.2. Fundamentos de espectroscopía de fluorescencia y UV-Visible	35
2.6.3. Aplicación de la espectroscopía de fluorescencia y UV-Visible para la cuantificación de grupos amino.	39

3. Procedimiento Experimental	43
3.1. Preparación de coloidosomas	43
3.2. Modificación superficial en coloidosoma y caracterización con AuNPs	45
3.3. Modificación superficial de partículas de sílice con APTES	47
3.4. Caracterización de la modificación superficial de partículas de sílice	49
3.4.1. RMN en estado sólido	49
3.4.2. RMN en disolución	50
3.4.3. Cuantificación de la densidad de grupos amino	50
3.5. Conjugación de RBITC con partículas silanizadas	53
3.5.1. Visualización de partículas conjugadas con RBITC mediante MOF . .	53
3.5.2. Estimación de la concentración de RBITC mediante espectroscopía de fluorescencia y UV Visible	55
3.5.3. Estudio de la estabilidad de la RBITC en diferentes medios y tiempos de almacenamiento mediante RMN	55
3.6. Síntesis y caracterización de partículas Janus	56
4. Resultados y Análisis	57
4.1. Preparación de coloidosomas	57
4.2. Modificación superficial en coloidosoma y caracterización con AuNPs	64
4.3. Modificación superficial de partículas de sílice con APTES	67
4.4. Densidad superficial de grupos amino	74
4.4.1. Ensayo fluorimétrico con fluorescamina	75
4.4.2. Ensayo colorimétrico con 4-Nitrobenzaldehído	78
4.5. Estudio de las condiciones de conjugación con Rodamina B Isotiocianato (RBITC)	81

ÍNDICE GENERAL

4.5.1. Microscopía Óptica Confocal (MOF)	81
4.5.2. Espectroscopía de Fluorescencia y UV-Vis	86
4.5.3. Estabilidad de RBITC mediante RMN	91
4.6. Síntesis y caracterización de partículas Janus	96
5. Conclusiones y Perspectivas	102
Anexos	106
A. Especificaciones de materiales y reactivos utilizados	107
B. Cálculo de moléculas de conjugación presentes en la superficie de partículas de sílice modificadas	111
C. Uso del software ImageJ para el análisis de partículas fluorescentes	114
Bibliografía	121

Índice de figuras

1.1. Ejemplos de auto-ensamblado en la naturaleza (a) Imagen de un copo de nieve y (b) Estructura del ADN.	1
1.2. Variedad de estructuras de auto-ensamblado de carácter anisotrópico. Adaptado de [1].	2
1.3. Representación esquemática de partícula Janus, el dios romano de los principios y fines con dos cabezas mirando hacia lados opuestos.	3
2.1. Tipos de agregación en las partículas coloidales dependiendo su concentración en el medio.	9
2.2. Curvas de energía de potencial en función de la separación de superficies de partículas coloidales con carga. La concentración del electrolito disminuye de a - c. Adaptado de [19].	10
2.3. Geometrías anisotrópicas: (a) Esferas, (b) Discos, (c) Cilindros.	13
2.4. Representación de la síntesis de partículas Janus mediante el método protección-deprotección [34].	15
2.5. Esquema de la función del tensoactivo: primero hidrofobiza parcialmente la superficie de la sílice; después sumerge la partícula en la cera al incrementar la concentración.	16

ÍNDICE DE FIGURAS

2.6. Estructura de la red cristalina de sílice. En las esquinas se encuentran localizados cuatro átomos de oxígeno (negro) y en el centro un átomo de silicio (rojo). Los grupos SiO ₄ comparten un átomo de oxígeno con el grupo adyacente.	18
2.7. (a) Imagen SEM de partículas altamente monodispersas de sílice sintetizadas por el método de Stöber. (b) Gráfica de la distribución de tamaños de las partículas de sílice mostradas en la figura a), se calcula un porcentaje de polidispersidad de 2.5%	19
2.8. Representación esquemática de los silanoles presentes en la superficie de partículas de sílice: (a) Tipos de silanoles (b) Silanoles superficiales (Q2 y Q3) y bulto de la partícula (Q4).	20
2.9. Estructuras de diferentes agentes silanos utilizados (a) 3-(aminopropil)trietoxisilano (APTES) (b) 3-aminopropil(dietoxi)metilsilano (APDES) y (c) (3-Mercaptopropil) metildimetoxisilano (MPTMS).	20
2.10. Tipos de interacciones entre el aminosilano y los silanoles de la superficie de la sílice (a) puentes de hidrógeno entre el hidrógeno del grupo hidroxilo de los silanoles de la sílice y los hidrógenos de los grupos amino, (b) transferencia protónica y (c) condensación con los grupos silanoles. Adoptado de Ref. [51].	22
2.11. Interacciones entre los grupos amino y la superficie de las partículas después de la modificación con APTES.	23
2.12. Deposición de partículas anfifílicas sobre una interfase líquido-gas donde la fase líquida es sustituida por partículas coloidales de oro (AuNPs).	24
2.13. Rodamina B Isotiocianato, el grupo NCS puede estar localizado en la posición 5 o 6 del anillo de benceno formando una mezcla de isómeros.	25
2.14. Espectros de excitación y emisión de la RBITC en etanol.	26
2.15. Conjugación de la RBITC a la superficie de la partícula mediante un enlace covalente de tipo tiourea.	27

ÍNDICE DE FIGURAS

2.16. Equilibrio de la Rodamina B y las especies de-etiladas entre el volumen de disolución (sol) y el sustrato (ads) durante la fotooxidación. RhB ₁ y RhB ₂ referidos como los compuestos de rodamina mono y bi-de-etilados, respectivamente.	28
2.17. Representación esquemática de la técnica MAS. El eje de giro de la muestra es orientado con un ángulo de 54.74° (ángulo mágico) respecto al campo magnético estático B ₀	31
2.18. Niveles de energía de los espines ¹ H y ¹³ C: (a) La transferencia no es posible (b). Con el marco rotatorio, la transferencia de magnetización es posible dado que la energía de separación está determinada por el campo rotatorio.	33
2.19. Especies observadas en la funcionalización de la superficie de sílice con AP-TES utilizando la técnica de RMN CPMAS. (a) ²⁹ Si CPMAS y (b) ¹³ C CPMAS. El núcleo de silicio marcado en azul corresponde al silano utilizado.	35
2.20. Diagrama de niveles de energía de una molécula. (a) Se promueve del estado basal al estado excitado mediante la aplicación de luz en el rango UV-Visible. (b) Posteriormente la molécula se relaja de vuelta al estado basal liberando energía en forma de fotones (fluorescencia). La diferencia de energía entre el estado basal y el estado excitado requiere una cantidad específica de energía que, a su vez es inversamente proporcional a la longitud de onda aplicada.	36
2.21. Absorción de cierta parte de la radiación incidente.	38
2.22. Reacción de la fluorescamina con un grupo amino primario que da lugar a un compuesto fluorescente.	40
2.23. Esquema de la reacción de los grupos amino superficiales con un agente sensible a la luz UV (4-NBA).	41
2.24. Mecanismo de reacción de la formación de iminas en medio ácido.	42
3.1. Representación esquemática de la síntesis de coloidosomas.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

3.2. Representación esquemática de deposición en vapor de DCDMS y APDES en la parte desprotegida de las partículas de sílice inmersas en cera.	45
3.3. Representación esquemática de la síntesis de AuNPs con diámetro 30 nm siguiendo un método estándar. La imagen insertada del lado de productos corresponde al color de las disoluciones de distintos tamaños de nanopartículas de oro.	46
3.4. Montaje del sistema de secado de disolventes. La coloración azul indica que el disolvente se encuentra completamente seco y listo para destilar.	49
3.5. Esquema de las celdas de cuarzo preparadas para la medición en espectroscopía: (a) muestra, (b) blanco. La adición de cada disolución se agrega en el orden que se indica desde la parte inferior a la parte superior de las celdas.	51
3.6. Representación esquemática de la decoración de partículas de sílice con un compuesto fluorescente (RBITC).	54
3.7. Representación esquemática de la decoración del hemisferio polar de las partículas Janus mediante la adsorción de: (a) AuNPs y (b) RBITC.	56
4.1. Imagen SEM de partículas de sílice de 3 μm inmersas en cera. (a) Acercamiento a un coloidosoma completo, (b)-(d) Acercamiento a la superficie del coloidosoma para verificar la inmersión de $\sim 50\%$	59
4.2. Imágenes SEM de partículas de sílice inmersas en cera: (a) síntesis J9 (50 mg de SiPs), (b) y (c) síntesis J10 (20 mg de SiPs) y (d) síntesis J11 (30 mg de SiPs).	60
4.3. Imágenes SEM de partículas de sílice inmersas en cera ($m_{\text{cera}} = 1.5\text{ g}$, $V_{\text{DDAB}} = 15\text{ mL}$) (a) síntesis J13 (b) síntesis J19 (20 mg de SiPs).	61
4.4. Imágenes SEM de partículas de sílice inmersas en cera (a) síntesis J24: CMC/5.5, (b) síntesis J26: CMC/4.4, (c) síntesis J28: CMC/4.2, (d) síntesis J31: CMC/3.9	62

ÍNDICE DE FIGURAS

4.5. Imágenes SEM de síntesis J34: CMC/3.6, inmersión ~50 %	63
4.6. Imágenes SEM de síntesis (a) J35: CMC/3.5 y (b) J36: CMC/3.4.	64
4.7. Imágenes SEM de modificación superficial de partículas de sílice inmersas en cera (coloidosomas) con diferentes silanos y técnicas (a) APDES en disolución, (b) APDES en vapor, (c) APTES en disolución y (d) MPTMS en disolución.	66
4.8. Diferentes tipos de átomos de silicio, átomos de silicio unidos a uno, dos o ningún grupo hidroxilo (Q) y tipos de enlace con las moléculas de APTES en la superficie de la partícula (T).	68
4.9. Espectro ^{29}Si RMN SPMAS de partículas limpias de sílice. Los picos en -112, -103 y -93 ppm corresponden a los átomos de sílice Q4, Q3 y Q2, respectivamente.	69
4.10. Espectros ^{29}Si CPMAS de partículas de sílice modificadas bajo diferentes condiciones. La asignación de los picos sigue la numeración de la Fig.4.8. El recuadro insertado representa la asignación de los átomos de carbono y silicio en la molécula de APTES.	71
4.11. Espectros ^{13}C CPMAS de partículas de sílice modificadas bajo diferentes condiciones. El recuadro insertado representa la asignación de los átomos de carbono en los grupos etoxi.	72
4.12. (a) Espectros de emisión de fluorescamina a diferentes concentraciones de APTES tras excitación a $\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm. (b) Curva de calibración para fluorescamina leído a $\lambda = 480$ nm.	75
4.13. Espectros de emisión de fluorescamina después de reaccionar con los grupos amino de las muestras.	76
4.14. (a) Espectros de absorción de distintas concentraciones de APTES en disolución de hidrólisis. El máximo de absorbancia se lee en $\lambda = 270$ nm. (b) Curva de calibración realizada con los espectros obtenidos en (a).	78

ÍNDICE DE FIGURAS

4.15. Espectros de absorción del sobrenadante con 4-NBA después de reaccionar con los grupos amino de las muestras (a) sin filtrar (b) después de filtrar.	79
4.16. Imágenes de partículas de sílice decoradas con RBITC vistas en MOF a diferentes concentraciones (a) 5 mg (b) 10 mg (c) 30 mg y (d) 100 mg.	82
4.17. Intensidad de fluorescencia de las partículas vistas en MOF como función de la concentración de RBITC utilizado en la síntesis.	82
4.18. Visualización en MOF de muestra con 5 mg de RBITC variando las condiciones de adquisición del microscopio. Barras de escala = 5 μm	83
4.19. Intensidad de fluorescencia de las partículas vistas en MOF como función del tiempo de reacción con RBITC. Barras de escala = 6 μm	84
4.20. Fotografía de las partículas modificadas, la variación en la intensidad del color rosa se debe a las diferentes cantidades de RBITC conjugada. A simple vista se aprecia una mayor intensidad entre 24 y 32 h.	85
4.21. Intensidad de fluorescencia de las partículas vistas en MOF como función del tiempo de reacción con RBITC. Las líneas punteadas se colocaron como guía visual.	85
4.22. Espectros de absorbancia y fluorescencia de RBITC en NaOH 1 M (a) y (d) y RBITC en NaOH 1 M con la adición de 2 mg/mL de partículas de sílice (b) y (e). Curvas de calibración obtenidas a partir de los espectros superiores.	87
4.23. Espectros de (a) absorbancia y (b) fluorescencia de partículas de sílice decoradas con RBITC disueltas en NaOH 1 M. Los tiempos corresponden al tiempo de reacción de las partículas con la RBITC y son los mismos para ambos gráficos.	88
4.24. Concentración de RBITC en 5 mL de NaOH 1 M después de la disolución de 10 mg de partículas calculado a partir de UV/VIS (círculos rojos) y fluorescencia (cuadros azules). Las líneas punteadas se colocaron como guía visual.	88

ÍNDICE DE FIGURAS

4.25. Espectros de absorción UV/VIS de RBITC en etanol a diferentes concentraciones en función del tiempo.	89
4.26. Espectros de absorción UV/VIS de RBITC en NaOH 1M a diferentes concentraciones en función del tiempo.	90
4.27. Espectros de absorción UV/VIS de RBITC en una disolución de etanol en HCl 500/1 v/v a diferentes concentraciones en función del tiempo.	91
4.28. Predicción de los espectros (a) ^1H y (b) ^{13}C de la molécula de pireno utilizado como estándar. La asignación de los picos se realiza con base en la numeración de los núcleos de la molécula de pireno insertada.	92
4.29. (a) Asignación de los núcleos de carbono e hidrógeno de la RBITC. Predicción de los espectros (b) ^1H y (c), (d) ^{13}C de la molécula de RBITC. La asignación de los picos se realiza con base en la numeración de (a).	93
4.30. Espectros ^1H RMN del tiempo de almacenamiento de RBITC en EtOD- d_6	94
4.31. Espectros de RMN (a) ^1H y (b) ^{13}C de RBITC en EtOD- d_6 : Comparación de la RBITC después de 75 h de evolución sin partículas (negro) y en presencia de partículas (azul).	95
4.32. Imágenes SEM de partículas Janus de 3 μm decoradas con AuNPs.	97
4.33. Imágenes SEM de partículas Janus de 500 nm decoradas con AuNPs.	98
4.34. Imágenes MOF de partículas Janus de 3 μm decoradas con RBITC. Fase continua: DBM/EtOH 50 %. Las barras de escala indican 6 μm . El color de las imágenes fue cambiado a amarillo para una mejor visualización.	100
C.1. Ventana de inicio del programa ImageJ.	114
C.2. Abrir imagen.	115
C.3. Abrir imagen.	115
C.4. Sustracción del fondo fluorescente.	116
C.5. Selección de opción para sustracción del fondo fluorescente.	116

ÍNDICE DE FIGURAS

C.6. Sustracción del fondo fluorescente (a) Imagen original (b) Imagen con fondo modificado.	117
C.7. Símbolo lupa para acercarse o alejarse y símbolo mano para mover la posición de la imagen.	117
C.8. Selección de una partícula.	118
C.9. Opción establecer parámetros.	118
C.10. Selección de parámetros de análisis.	119
C.11. Análisis de una partícula.	119
C.12. Guardado de análisis.	120
C.13. Guardado de imagen analizada.	120
C.14. Imágenes de partículas (a) archivo original (b) imagen analizada.	120

Índice de tablas

2.1. Tipos de sistemas coloidales con ejemplos.	7
2.2. Métodos utilizados para sintetizar partículas Janus. *PD: polidispersidad. . .	14
2.3. Tipos de funcionalizaciones en diferentes superficies y tipos de partículas desarrolladas por varios autores dispersiones coloidales con ejemplos. . . .	21
2.4. Longitudes de onda aproximadas con su respectivo color de absorción y transmisión.	37
4.1. Parámetros establecidos para síntesis de coloidosomas. m_P : masa total de partículas, C_{DDAB} : concentración de tensoactivo utilizada en términos de dilución de su concentración micelar crítica, V_{DDAB} : volumen de tensoactivo adicionado y m_{cera} : cantidad de cera parafina.	58
4.2. Parámetros establecidos para obtener mayor inmersión de las partículas de sílice en la cera, tomando como referencia la muestra J19. Se sigue la misma notación que en la Tabla 4.1.	62
4.3. Condiciones de reacción utilizadas para la funcionalización con grupos amino de partículas de sílice. La segunda columna se refiere al número de síntesis de partículas de sílice obtenidas mediante el método de Stöber [37], % PD corresponde al índice de polidispersidad, m_P corresponde a la masa total de partículas, m_S es la masa de silano utilizada, m_S/A_P es la masa de silano por área total de partículas, T es la temperatura de reacción y t_r el tiempo de reacción.	70

ÍNDICE DE TABLAS

- 4.4. Cuantificación de grupos amino totales por área de partícula calculados a partir de la curva de calibración de la Fig. 4.13. Para el cálculo porcentual, se consideró una densidad total teórica de grupos amino de $1.25 \text{ NH}_2/\text{nm}^2$. 77
- 4.5. Cuantificación de grupos amino disponibles por área de partícula calculados a partir de la curva de calibración de la Fig. 4.14. El cálculo porcentual se realizó con base en la densidad total de grupos amino de la Tabla 4.4. 80

Capítulo 1

Introducción

En la naturaleza existen sistemas asimétricos que se acomodan para formar estructuras sorprendentes Fig. 1.1. El autoensamblado de estas estructuras ha inspirado a la comunidad científica, la cual ha incrementado su detallado estudio y reproducción para fines biológicos y tecnológicos. En términos de composición química, estos sistemas pueden sintetizarse a partir de especies orgánicas, inorgánicas o ambas; permitiendo así el desarrollo de materiales innovadores.

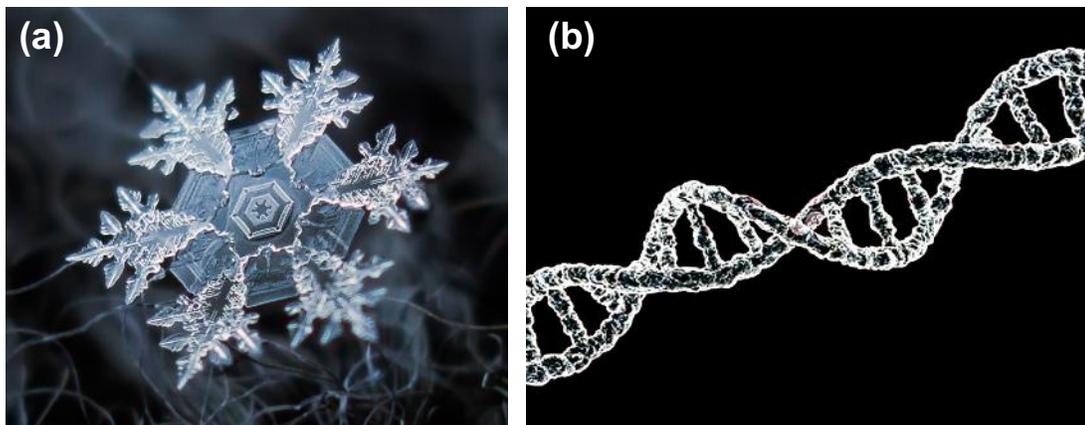


Figura 1.1: Ejemplos de auto-ensamblado en la naturaleza (a) Imagen de un copo de nieve y (b) Estructura del ADN.

A nivel microscópico, el autoensamblado está gobernado en su mayoría por interacciones débiles, tipo van der Waals o puentes de hidrógeno. La organización resultante de estas unidades determina las propiedades macroscópicas del sistema: ópticas, electrónicas, mecánicas, etc. En particular, la organización observada en dispersiones coloidales es de gran interés, ya que permite manipular propiedades macroscópicas del sistema para crear nuevos materiales con propiedades deseadas para múltiples aplicaciones.

Los sistemas coloidales son los mejores modelos que enmarcan la barrera entre pequeñas moléculas ($\sim \text{Å}$), que son detectadas mediante técnicas electrónicas de microscopía, y objetos grandes ($100 \sim \mu\text{m}$) que son observables por el ojo humano. Las estructuras deseadas, así como las propiedades macroscópicas de un sistema coloidal pueden lograrse únicamente con el control preciso sobre las interacciones entre partículas. Cuando estas interacciones dependen de una u otra parte específica de la partícula, se habla entonces de interacciones anisotrópicas. La autenticidad de los nuevos bloques de construcción por anisotropía, se ha explotado y expandido generando una amplia variedad de estructuras que se pueden formar Fig 1.2.

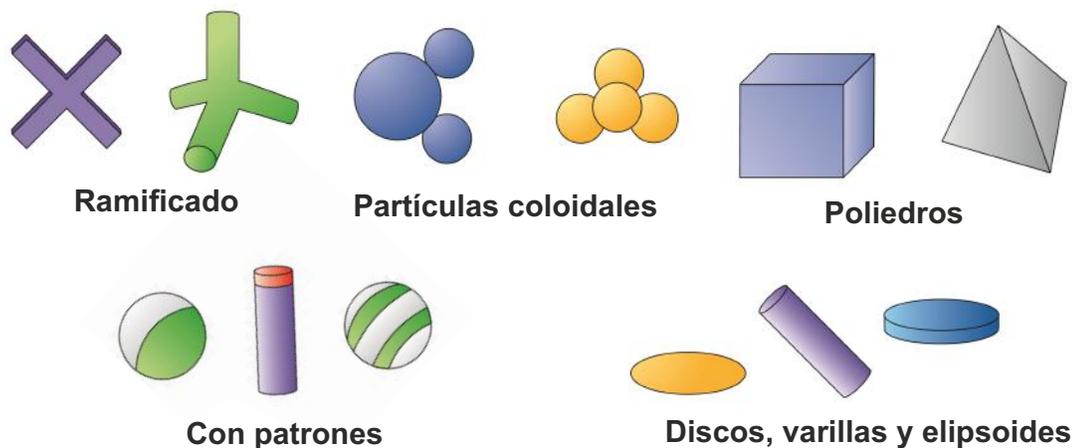


Figura 1.2: Variedad de estructuras de auto-ensamblado de carácter anisotrópico. Adaptado de [1].

Un ejemplo único de anisotropía son las partículas *Janus*, que, gracias a su complejidad en comportamiento de fase, potencialmente prevé fases completamente nuevas [2]. La exploración de estas nuevas fases es de gran importancia ya que proporciona información sobre los procesos de organización de las partículas y de las fuerzas que intervienen en di-

cha organización. Además, el conocimiento básico de estos procesos y su influencia sobre las propiedades macroscópicas permitirá diseñar, programar y reconfigurar las estructuras según la aplicación y demanda.

Las partículas *Janus* fueron dadas a conocer a la comunidad científica en el año de 1991 por el premio Nobel de Química: Pierre-Gilles de Gennes durante su discurso [3]. Aunque años antes (1988), la primera publicación sobre partículas Janus fue escrita por Casagrande y Veyssie [4]. Este término es muy acertado ya que proviene del nombre del dios romano Janus; de los principios y los fines representado con dos cabezas mirando hacia lados opuestos Fig. 1.3. De esta manera, se hace referencia a la composición de la partícula en un hemisferio que es hidrofílico o polar, mientras que el otro es hidrofóbico o no polar.

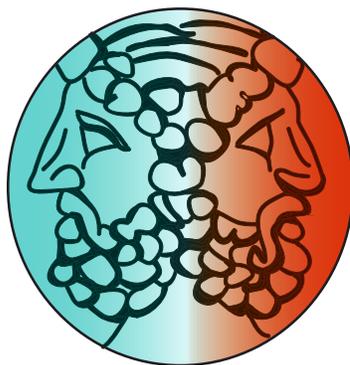


Figura 1.3: Representación esquemática de partícula Janus, el dios romano de los principios y fines con dos cabezas mirando hacia lados opuestos.

Esta importante característica parecida a la de un tensoactivo permite la adsorción de las partículas en una interfase acuosa y oleosa concediendo el estudio de sistemas moleculares complejos, como el comportamiento de fase de polímeros [5] o el auto-ensamblado de membranas biológicas [6]. Además, abren paso al uso de estas partículas como trazadores para probar las propiedades reológicas de otros sistemas [7].

También pueden ser utilizadas como agentes estabilizantes de emulsiones (tensoactivos sólidos) [8], bloques de construcción para estructuras supramoleculares [9, 10], agentes catalíticos [11, 12], sensores o liberadores de fármacos [13, 14, 15], entre otros. La flexibilidad en cuanto al uso de las partículas Janus puede ser muy amplia gracias a su potencial selectividad química. Sin embargo, las mayores limitantes de los sistemas *Janus*, son la

complejidad de su síntesis y su posterior caracterización.

En particular, la síntesis de partículas Janus con base de sílice ha sido recientemente estudiada ya que ofrece la posibilidad de introducir distintos grupos funcionales en la superficie de las partículas que permiten controlar las interacciones entre las mismas. Uno de los métodos más exitosos hasta el momento está basado en la preparación de una emulsión en la cual las partículas de sílice son adsorbidas en la interfase protegiendo un hemisferio de las mismas [16]. De este modo el hemisferio expuesto es modificado químicamente mientras que el otro es protegido. No obstante, hay un gran interés en aplicar este método hacia distintos tamaños de partículas y además obtener diferentes configuraciones anfifílicas dependiendo del grupo funcional introducido.

El hemisferio hidrofóbico de las partículas Janus ha sido ampliamente estudiado y exitosamente establecido [17], pero el lado hidrofílico aún sufre de ciertas deficiencias, sobre todo en la inserción de grupos que le brinden el carácter polar. Por ello, es necesario establecer métodos que permitan la caracterización de partículas completamente modificadas de manera aislada antes de introducir dicha funcionalización en un sistema más complejo como las partículas Janus.

Otra limitante es la conjugación selectiva para la caracterización de partículas Janus ya que ésta depende de parámetros ajenos a la partícula. Algunas formas de caracterización incluyen la conjugación de un agente visual como nanopartículas de oro, lo cual es muy práctico y fácil de observar utilizando de microscopía de barrido electrónico. Otra opción, es mediante la conjugación de un tinte fluorescente con el cual las partículas pueden ser visualizadas por microscopía óptica de fluorescencia, aunque esta técnica requiere de tamaños de aprox. 3 μm de partículas. De ahí la necesidad de sintetizar partículas Janus de distintos tamaños.

El objetivo principal de la presente propuesta consiste en realizar la síntesis y caracterización de partículas Janus esféricas utilizando como base la sílice. Esto, con el fin de obtener cantidades suficientes para futuros estudios de comportamiento de fase en dos y tres dimensiones (2D y 3D). Estos estudios utilizan principalmente la técnica de dispersión de luz, para la cual partículas con tamaño menor a 1 μm son deseadas.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Los objetivos particulares se enlistan a continuación:

1. Extender la síntesis a partículas de distintos tamaños y aumentar la cantidad de partículas por lote mediante la variación en los parámetros utilizando el método de emulsión.
2. Estudiar y controlar la funcionalización de grupos que brinden un carácter polar para aplicarlo posteriormente a las partículas Janus.
3. Visualizar las partículas Janus decoradas con nanopartículas de oro mediante microscopía de barrido electrónico.
4. Conjuguar un tinte fluorescente que proporcione la mayor intensidad de fluorescencia para facilitar la detección del hemisferio hidrofílico mediante microscopía óptica de fluorescencia.

Hipótesis

La síntesis de partículas Janus con diferente área superficial requiere de un ajuste en los parámetros de la protección de un hemisferio. La caracterización del balance Janus deseado requiere de la conjugación de agentes visuales a un hemisferio de la partícula, pero para su correcta visualización es indispensable optimizar previamente los parámetros de modificación superficial.

Capítulo 2

Marco Teórico

Este capítulo extiende los fundamentos teóricos de las propuestas y las técnicas de caracterización utilizadas, para abordar de una mejor manera las problemáticas que se enfrentan en este estudio y realizar un análisis más completo de los resultados.

2.1. Sistemas coloidales

Siempre nos encontramos rodeados por diferentes sistemas coloidales en la naturaleza como la niebla, la espuma, piedras porosas; incluso los huesos y la sangre en nuestro cuerpo son sistemas coloidales. Desde tiempos ancestrales, el ser humano ha creado nuevos materiales que le han ayudado a enfrentar problemas de la vida cotidiana y a contribuir en avances tecnológicos. Ejemplos de ello son la creación de la cerámica y el vidrio. Posteriormente, en la era de la revolución industrial se sintetizaron polímeros, pinturas, pastas, espumas, etc.

Posteriormente, se optó por estudiar más a detalle las propiedades fisicoquímicas, comportamiento y estabilidad de estos sistemas con el fin de ampliar y potenciar sus aplicaciones tecnológicas que brindan una conexión directa entre las propiedades micro y macroscópicas de un sistema. Para esto, es recomendable introducir ciertos términos relacionados a los sistemas coloidales que los diferencian de los sistemas moleculares.

Un sistema coloidal se define como un sistema heterogéneo donde una fase dispersa está distribuida dentro de otra fase continua. Los coloides tienen un tamaño aproximado entre 1 nm y 1 μm . Aunque hay excepciones en el tamaño ya que no es el único criterio. La Tabla 2.1 engloba los tipos de sistemas coloidales que se encuentran en la vida cotidiana.

Fase dispersa	Medio de dispersión	Nombre	Ejemplos
Líquido	Gas	Aerosol líquido	Niebla, sprays líquido
Sólido	Gas	Aerosol sólido	Humo
Gas	Líquido	Espuma	Espuma
Líquido	Líquido	Emulsión	Leche, mayonesa
Sólido	Líquido	Sol, dispersión coloidal o suspensión	Pinturas, pasta de dientes
Gas	Sólido	Espuma sólida	Espuma de poliuretano, poliestireno
Líquido	Sólido	Emulsión sólida	Asfalto, helado
Sólido	Sólido	Suspensión sólida	Ópalo, perla, plástico pigmentado

Tabla 2.1: Tipos de sistemas coloidales con ejemplos.

En comparación con su volumen, el área superficial de los coloides es grande. Muchas de estas partículas tienden a encontrarse cerca de una interface. Por lo que la química de superficies es muy importante en la ciencia de los coloides.

Enfocándose en las suspensiones (partículas sólidas dispersas en un líquido), el estudio de las interacciones entre partículas ha ayudado a comprender el comportamiento de los coloides. Éstas son importantes tanto industrialmente como científicamente en la preparación de sistemas modelo con los cuales se pueden probar las interacciones intermoleculares responsables del comportamiento de fase [18].

Las interacciones entre partículas coloidales pueden darse por fuerzas atractivas de van der Waals ocasionadas por la fluctuación de los campos electromagnéticos asociados con las polarizabilidades de las partículas. Las partículas que poseen una carga superficial, presentan una capa de dicha carga que atrae a iones de carga opuesta; éstos tienden a agregarse en una capa adyacente formando una doble capa eléctrica.

Muchas de las propiedades de los sistemas coloidales son determinados directa o indirectamente por la carga eléctrica (o potencial) de las partículas. La distribución del potencial determina la energía de interacción entre partículas. Esto es, en muchos casos, responsable

de la estabilidad de las partículas contra la coagulación y el comportamiento del fluido de la suspensión coloidal. El potencial zeta es un indicador clave de las dispersiones coloidales. La magnitud del potencial zeta indica el grado de repulsión electrostática entre partículas similarmente cargadas en una dispersión. Por ejemplo, cuando el potencial zeta es grande, la dispersión se considera estable. Y cuando éste es pequeño la agregación es rápida por lo que el sistema no es estable.

Cuando las partículas coloidales se encuentran unas con otras, el balance de las fuerzas atractivas y repulsivas controlan la estabilidad de la dispersión. Si las fuerzas repulsivas (debido, por ejemplo, a la carga o efectos estéricos) son suficientes para balancear las interacciones atractivas de van der Waals, entonces se dice que la dispersión es estable [19]. Por otra parte, si no existe una barrera de potencial interactuando entre las partículas coloidales, debido al balance entre las fuerzas atractivas y repulsivas, éstas pueden atraerse entre ellas y agregarse. La agregación entre partículas depende de la concentración a la que se encuentren. Por ejemplo, la agregación a bajas concentraciones cuando es reversible se conoce como floculación. La estructura consiste en un arreglo de agregados conocidos como flóculos Fig. 2.1. A altas concentraciones, la agregación se conoce como coagulación pero ésta incluye además un cambio en la estructura. La distinción entre los procesos reversibles e irreversibles no es tan definida. La agregación puede darse por gelación, coagulación, floculación, o coacervación [20].

1. Gelación: Las partículas se encuentran unidas en cadenas ramificadas que llenan todo el volumen de la suspensión de modo que no hay un incremento en la concentración de partículas en ninguna región macroscópica en el medio. Todo el medio se vuelve viscoso y solidifica por una red coherente de partículas que por acción de la capilaridad retiene líquido.
2. Coagulación: Las partículas se juntan en grumos relativamente empaquetados y cercanos concentrando el sol original. El coágulo se forma como un precipitado denso.
3. Floculación: Las partículas son unidas por puentes de agentes floculantes que son lo suficientemente largos para que la estructura agregada se mantenga abierta y voluminosa.

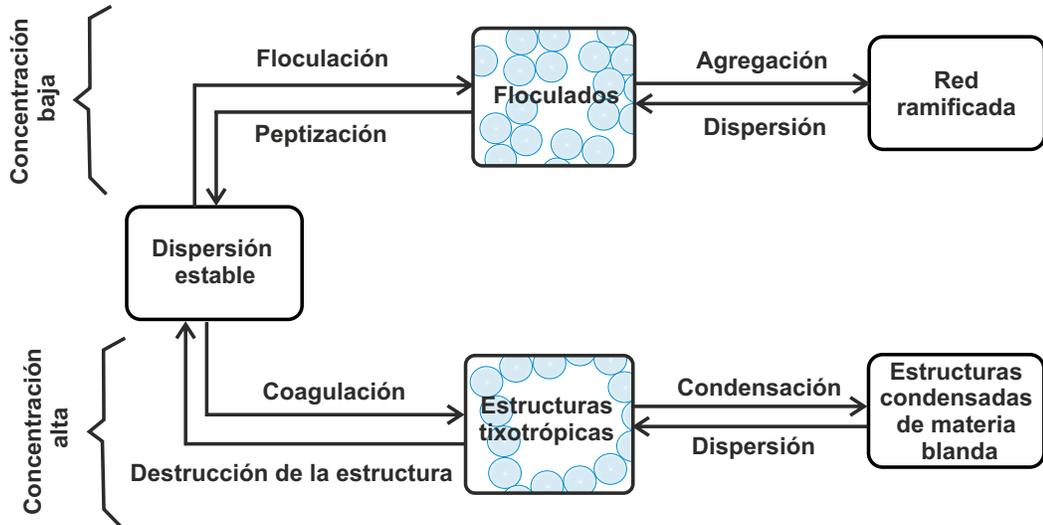


Figura 2.1: Tipos de agregación en las partículas coloidales dependiendo su concentración en el medio.

4. Coacervación: Las partículas son rodeadas por una capa adsorbida de un material que las hace menos hidrofílicas, pero no forma puentes entre ellas. Las partículas se agregan como un líquido concentrado inmiscible en la fase acuosa.

Un agregado se separa por sedimentación. Si el agregado es más denso que el medio en el que se encuentra, las partículas sedimentan; de lo contrario se separan por cremado. La tasa de sedimentación es proporcional al tamaño de las partículas según la ecuación de Stokes ec. 2.1.

$$v = \frac{2(\rho_p - \rho_l)gR^2}{9\nu}, \quad (2.1)$$

donde ρ_p y ρ_l son las densidades de las partículas y el líquido, respectivamente, g es la aceleración de la gravedad, R es el radio de la partícula y ν es la viscosidad del medio.

Las partículas coloidales pueden ser estabilizadas contra la agregación en distintas formas:

2.1.1. Estabilización de carga

La superficie de las partículas coloidales puede desarrollar una carga por distintos mecanismos. Por ejemplo, la ionización de los grupos superficiales ácidos o básicos en una

disolución acuosa pueden crear una superficie cargada. La adsorción, desorción o adsorción/desorción de tensoactivos iónicos pueden de manera similar conducir a la formación de la doble capa eléctrica en distintas dispersiones coloidales. La concentración y naturaleza de un electrolito también tiene el suficiente impacto en la estabilidad de las dispersiones coloidales cargadas. La valencia del ión de carga opuesta tiene una gran influencia sobre la prevención de la coagulación de una dispersión coloidal. En la actualidad es posible interpretar esos efectos mediante el modelo DLVO (Derjaguin – Landau – Verwey – Overbeek). Esta teoría explica tanto las fuerzas entre dobles capas eléctricas (repulsivas para partículas con la misma carga) y las fuerzas de largo alcance de Van der Waals que generalmente son atractivas.

Al graficar la energía potencial en función de la separación entre las superficies de las partículas es posible determinar la estabilidad de la suspensión coloidal o si alguna asociación va a ocurrir. Si la curva de energía de potencial tiene un mínimo de atracción a pequeñas separaciones entre partículas Fig. 2.2 (curva a), el sistema será inestable dando lugar a asociaciones. La asociación tomará la forma de floculación si es reversible o coagulación si es irreversible.

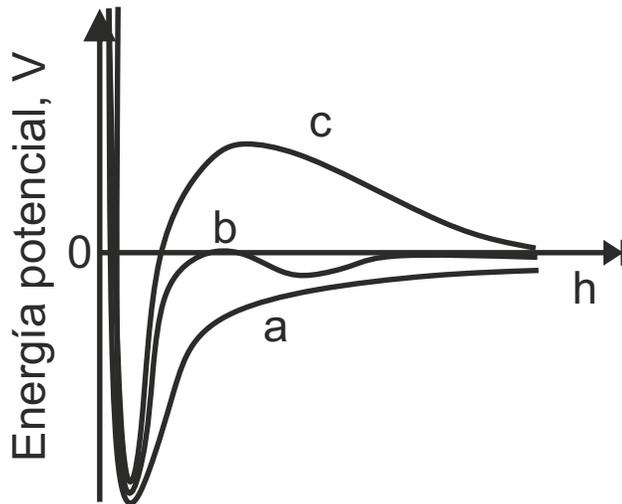


Figura 2.2: Curvas de energía de potencial en función de la separación de superficies de partículas coloidales con carga. La concentración del electrolito disminuye de a - c. Adaptado de [19].

A veces, la curva de energía de potencial tiene un segundo mínimo separado del mínimo primario mediante una barrera. Si la barrera es grande comparada con $k_B T$ ($T=298$ K),

pero el mínimo secundario es comparable con $k_B T$, entonces puede ocurrir una floculación reversible estableciendo un equilibrio cinético entre las partículas y agregados débilmente atraídos llamados floculados Fig. 2.2 (curva b).

Es importante notar, que ésta es una barrera cinética, porque el potencial es mucho menor en el mínimo primario. Las energías de las partículas están dadas por la distribución Boltzmann, la cual permite determinar que a temperatura ambiente muy pocas partículas serán capaces de atravesar esa barrera. La cinética de asociación de partículas coloidales está determinada por la presencia de su barrera de potencial y su magnitud. Si no existe un mínimo secundario y la barrera de energía de potencial es suficientemente grande comparada con la energía térmica ($k_B T$), entonces muy pocas partículas tendrán la posibilidad de “caer” en el mínimo primario. En este caso, se dice que la dispersión es cinéticamente estable Fig. 2.2 (curva c) y no hay floculación o coagulación.

2.1.2. Estabilización estérica

La estabilización estérica de una suspensión coloidal se alcanza enlazando moléculas de largas cadenas a las partículas coloidales. Cuando las partículas coloidales se aproximan entre sí, la limitada interpenetración de las cadenas poliméricas da lugar a una repulsión efectiva que estabiliza la dispersión en contra de la floculación. La estabilización estérica tiene muchas ventajas comparada con la estabilización por carga. Primero, porque la repulsión entre partículas no depende de la concentración del electrolito. En contraste a los coloides estabilizados por carga donde el espesor de la doble capa eléctrica es muy sensible a la fuerza iónica. Segundo, la estabilización estérica es efectiva en medios acuosos y no acuosos, mientras que la estabilización por carga es normalmente explotada en disoluciones acuosas. Por último, la estabilización estérica opera sobre un amplio rango de concentraciones coloidales, en contraste con la estabilización por carga que no es más efectiva a bajas concentraciones.

Entonces, se aprecia que las interacciones intermoleculares son las responsables del acomodo de materiales coloidales. Las fuerzas intermoleculares son un balance entre las interacciones repulsivas a distancias cortas e interacciones atractivas que predominan sobre

distancias mayores. Como se ilustró en la Fig. 2.2, las interacciones repulsivas son importantes cuando las moléculas están cerca. Las interacciones atractivas en partículas sin carga resultan de las fuerzas de van der Waals.

Es importante distinguir entre las estructuras formadas a partir de acomodo intermolecular y aquellas producidas por acomodo de agregados moleculares. Los coloides y anfífilos pertenecen a la última clase. Una condición necesaria para que la formación de dichos agregados tome lugar, es la existencia de al menos dos componentes en el sistema.

Generalmente, el segundo componente es agua y entonces las interacciones por puentes de hidrógeno cobra importancia.

Típicamente, el proceso de autoensamblado en sistemas coloidales es espontáneo, por eso está acompañado por la disminución de la energía total del sistema. Sin embargo, no todos los sistemas pueden llegar al equilibrio termodinámico. En ciertas condiciones las partículas no tienen suficiente movilidad para lograr la organización en equilibrio, por ejemplo, cuando la fracción de volumen es muy alta o la atracción entre ellas es demasiado fuerte.

En este caso las estructuras formadas están fuera de equilibrio porque están dinámicamente arrestadas [21]. Estas organizaciones son metaestables y sus propiedades macroscópicas, aunque lento, siguen evolucionando en tiempo. Por eso al estudiar el autoensamblado coloidal es importante tomar en cuenta la dinámica de las partículas, ya que ésta puede gobernar los procesos de organización de las mismas.

En el caso de interacciones anisotrópicas, el potencial de interacción depende de las partes específicas a través de las cuales cada partícula interactúa con las demás. Por ejemplo, la desviación de la geometría esférica hacia otras geometrías no esféricas (por ejemplo, rodillos, discos, elipsoides, cilindros, etc.) Fig. 2.3, trae una asimetría en las interacciones, así como en los ensambles formados por estas geometrías [22].

Otro ejemplo de anisotropía son las partículas que tienen varias partes (de su superficie o de su volumen) químicamente modificadas en diferentes formas. Por ejemplo, pueden fabricarse coloides esféricos con carácter anfífilico similar al de los tensoactivos o polímeros de bloque, creando dos superficies con características diferentes en cada hemisferio de la partícula. Este tipo de coloides son conocidas como partículas “*Janus*” [3, 17, 23].

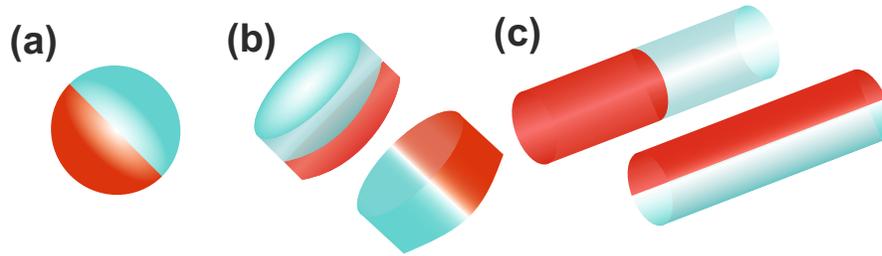


Figura 2.3: Geometrías anisotrópicas: (a) Esferas, (b) Discos, (c) Cilindros.

Simulaciones computacionales recientes recalcaron las similitudes, así como las diferencias en comportamiento de fase entre sistemas anfifílicos y dipolares moleculares y sistemas coloidales [24, 25]. También se ha posibilitado establecer los tipos de estructuras formadas debido a las interacciones entre este tipo de partículas [26], y su comportamiento de fase ante distintos rangos y fuerzas de interacción, tensiones o flujos [27]. De aquí la gran importancia de obtener una cantidad considerable de partículas Janus que permitan la aplicación y estudio experimental del comportamiento de fase predicho.

2.2. Síntesis de partículas Janus

La preparación de partículas Janus ha sido aproximada por distintos caminos. La Tabla 2.2 resume los métodos comúnmente utilizados para sintetizar partículas Janus, aunque muchos más métodos han sido utilizados e inventados. En la tabla se realiza una evaluación con base en ciertas características deseadas para sus futuras aplicaciones.

En general, lo que se busca en la síntesis de partículas Janus según Ref. [28] es:

1. Homogeneidad: Las partículas deben ser homogéneas tanto en tamaño como en geometría.
2. Ajuste: La medida de qué tan posible es cambiar la forma y/o tamaño de las partículas para encontrar la geometría Janus deseada.
3. Funcionalidad: La facilidad de cambiar los materiales de las partículas para funcionalizar la superficie.
4. Escalamiento: La posibilidad de escalar el procedimiento a grandes cantidades.

Método	Tamaño/Distribución de tamaño	Química/Materiales	Autor
Ensamblado molecular	<100 nm monodispersas	Ensamblado de bloques copolímero	[29]
Nanocristal dumbbell	<100 nm <10 % PD*	Metal, óxidos metálicos cubiertos con tensoactivos.	[30]
Microfluído	10-100 μm <5 % PD	Monómeros fotocurables	[31]
Electro co- jetting	0.5-10 μm PD variada	Recubrimiento metálico o dieléctrico	[32]
Emulsión	0.2-10 μm PD depende de las partículas de partida	Partículas con superficie reactiva	[33]

Tabla 2.2: Métodos utilizados para sintetizar partículas Janus. *PD: polidispersidad.

Evidentemente se persigue el procedimiento que cumpla con todas estas características, aunque éste también depende del tipo de estudio que se desee realizar con las partículas. Por ejemplo, para estudios de autoensamblado se requieren partículas homogéneas con geometría ajustable; para estabilización en emulsión, se prefieren altas cantidades de partículas; para liberación de fármacos y biomedicación, es prioritario la biocompatibilidad y biodegradabilidad. Este trabajo se enfoca en la síntesis de partículas Janus con diferente modificación superficial capaz de reaccionar con futuros compuestos. Por esta razón, el método más efectivo es el de emulsión. Como se observa, el material base para la síntesis de partículas Janus es variado. Un material comúnmente utilizado es la sílice gracias a sus propiedades inertes y a la capacidad de funcionalización superficial.

El método desarrollado por Granick *et al* [16] basado en la protección-deprotección de partículas de sílice utilizando una emulsión de aceite en agua (O/W) es un método simple y eficiente para fabricar partículas Janus homogéneas. Las grandes ventajas de este método son: i) facilita la síntesis de una alta cantidad de partículas por lote, ii) es posible escalar el método a una mayor cantidad o diferente tamaño de partícula, ya que la emulsión ofrece una gran área interfacial en un volumen relativamente pequeño y iii) permite tener un control sobre el balance Janus que es la razón de la fracción protegida de la partícula y la expuesta.

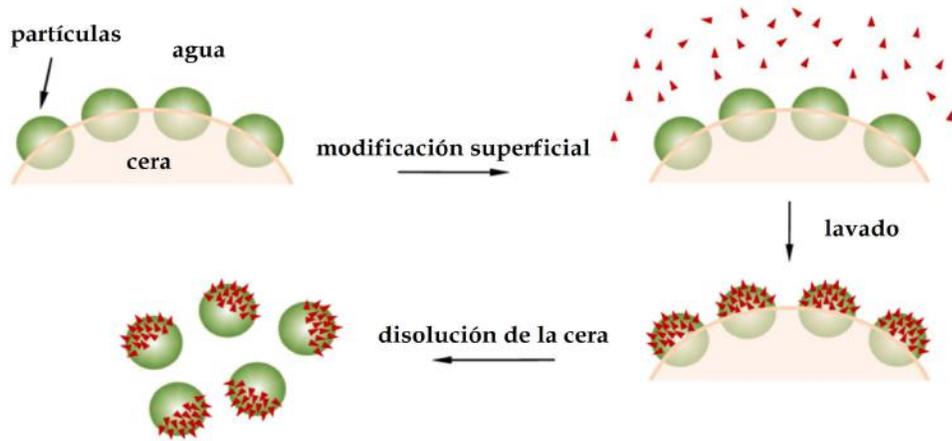


Figura 2.4: Representación de la síntesis de partículas Janus mediante el método protección-deprotección [34].

El método de Granick Fig. 2.4 consiste en derretir cera parafina la cual fungirá como la fase aceitosa. Las partículas son dispersas en agua y adicionadas a la cera para formar la emulsión que se lleva a cabo a la temperatura de fusión de la cera. Una vez que la emulsión estabiliza, ésta se enfría a temperatura ambiente para sellar las partículas en la cera. Las esferas de cera con partículas inmersas en ellas son denominadas *coloidosomas*.

Posterior a la modificación superficial del hemisferio expuesto de las partículas en coloidosoma, la cera es derretida en un disolvente orgánico y el hemisferio protegido de las partículas puede ser modificado. Para controlar el balance Janus, Jiang *et al* [35] introdujeron un tensoactivo catiónico en la emulsión. Entre las funciones del tensoactivo se encuentran aumentar el grado de hidrofobicidad de la superficie de las partículas mediante la adsorción de la carga opuesta del tensoactivo Fig. 2.5 (a).

Esta adsorción es favorable puesto que la superficie de la partícula se encuentra cargada negativamente al pH utilizado para la formación de los coloidosomas (pH = 6-7). Otra función del tensoactivo es favorecer el empaquetamiento de las partículas debido a dos razones: La primera es que aumenta el ángulo de contacto Fig. 2.5 (b) entre la partícula y la cera lo que ayuda a que la partícula penetre más en la cera. Para controlar la concentración de tensoactivo se prefiere referirse a ella por medio de la concentración micelar crítica (CMC).

No obstante, se ha encontrado que la mayor energía de adsorción de las partículas en la cera se da a los 90° por lo que al sobrepasar este ángulo puede llevarse a cabo una in-

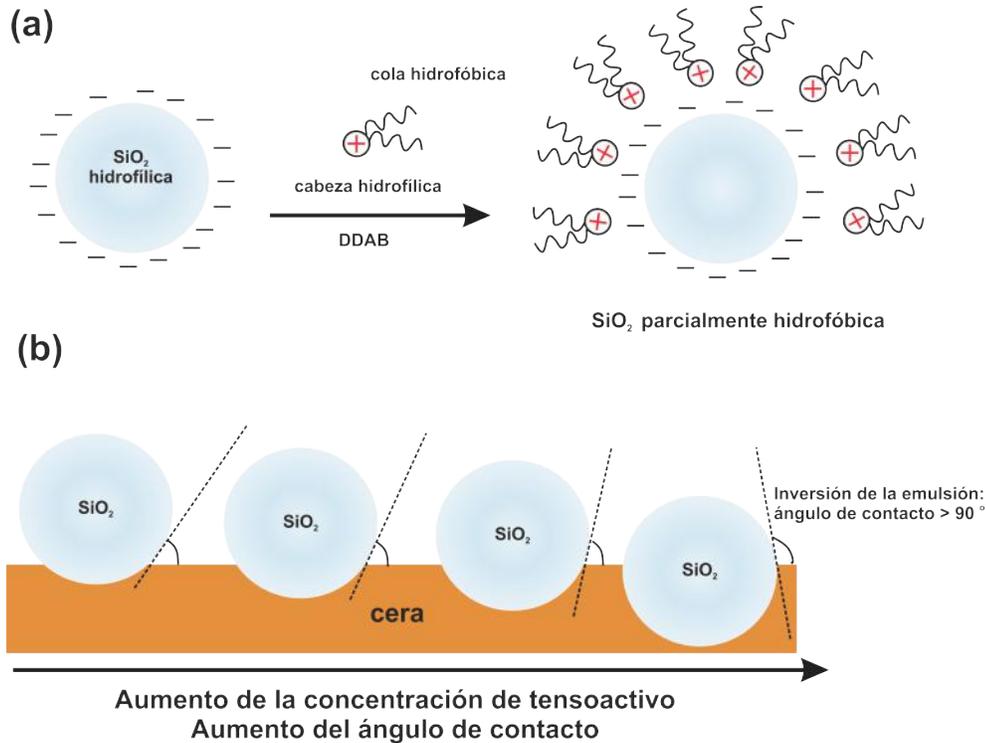


Figura 2.5: Esquema de la función del tensoactivo: primero hidrofobiza parcialmente la superficie de la sílice; después sumerge la partícula en la cera al incrementar la concentración.

versión de la emulsión. La segunda razón es que debilita la repulsión electrostática entre las partículas de sílice ya que las cargas de la partícula se neutralizan con las cargas del tensoactivo. Esto favorece el empaquetamiento de las partículas ya que debido a la carga parcialmente apantallada, éstas tenderan a sumergirse en la cera. De este modo, la variación de la concentración de tensoactivo en el sistema se traduce en el control del balance Janus.

El siguiente paso crucial para la síntesis de partículas Janus es la modificación superficial. El empaquetamiento en coloidosoma tiene sus grandes ventajas como se ha descrito hasta ahora pero también está sujeto a una serie de restricciones cuando se trata de la modificación superficial de las partículas:

1. La modificación en solución se limita al uso de disolventes polares para evitar la disolución de la cera.
2. Se debe realizar a temperatura ambiente o menor a la temperatura de fusión de la cera para evitar que ésta se funda.

3. Los coloidosomas deben tratarse con alto cuidado para evitar el estrés mecánico que provoca que las partículas se despeguen de la cera.
4. Por la misma razón del punto anterior es preferible no introducir ningún artefacto que produzca la agitación de los coloidosomas y ocasione la pérdida de partículas.

Para sobrellevar estas restricciones, se ha encontrado que la modificación con agentes silanos en vapor para crear el hemisferio hidrofóbico otorga una alta funcionalización [17]. Utilizando este método es posible producir hasta 200 mg de partículas Janus de 3 μm donde el hemisferio hidrofóbico contiene grupos metilo y el hemisferio hidrofílico está compuesto por grupos hidroxilo.

Algunos acercamientos para crear el hemisferio hidrofílico de la partícula también han sido propuestos por silanización con aminosilanos en vapor [23]. La desventaja más importante de este método es que presenta un bajo rendimiento de funcionalización superficial. Por lo que, al conjugar agentes visuales como nanopartículas de oro es aún difícil distinguir el balance Janus. Por esta razón, la opción de funcionalización en solución de coloidosomas cobra importancia pero se ve ampliamente limitada por las restricciones innatas a los coloidosomas.

Otra opción, antes de realizar la modificación en un sistema tan complejo como los coloidosomas, es funcionalizar completamente las partículas de sílice. De este modo, es posible tener un mayor entendimiento y control sobre la modificación superficial de partículas de sílice con grupos amino. En este trabajo se presentan ambas aproximaciones y la química superficie de partículas de sílice se describe a continuación.

2.3. Química de la superficie de partículas de sílice

El dióxido de silicio o sílice (SiO_2) es uno de los mayores componentes en la superficie de la tierra. Combinado con óxidos de otros metales pesados forma los minerales de silicato presentes en las rocas, arena o tierra. La sílice es separada de estos elementos por acción del agua para formar cristales de cuarzo [20]. Esencialmente la sílice puede encontrarse

de forma natural o sintética, cristalina o amorfa. En cualquiera de estas formas la sílice se encuentra rodeada por dos o seis átomos de oxígeno. La red cristalina de la sílice, así como las estructuras de silicatos es tetraédrica (SiO_4) Fig. 2.6.

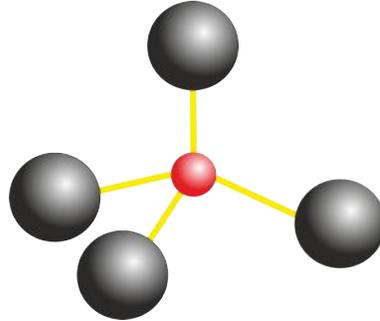


Figura 2.6: Estructura de la red cristalina de sílice. En las esquinas se encuentran localizados cuatro átomos de oxígeno (negro) y en el centro un átomo de silicio (rojo). Los grupos SiO_4 comparten un átomo de oxígeno con el grupo adyacente.

Todas las formas de sílice contienen un enlace siloxano (Si-O), el cual es el más estable de todos los enlaces de tipo Si-X . En la sílice amorfa la estructura del bulto está determinada por un empaquetamiento aleatorio de las unidades $[\text{SiO}_4]^{4-}$. Como resultado de los diferentes tipos de estructuras, la sílice puede tener diferentes densidades [36].

Las partículas de sílice pueden sintetizarse por el mecanismo de nucleación y crecimiento. A diferencia de los átomos y moléculas en los sólidos, las partículas coloidales y cadenas poliméricas son caracterizadas por una distribución de tamaños conocida como *polidispersidad* (PD). La PD indica la variación de tamaño y representa el tamaño de un determinado número de partículas coloidales o los pesos moleculares de un polímero.

La polidispersidad tiene importantes consecuencias en la estructura y dinámica de fluidos de estos materiales. Para obtener un lote de partículas con una distribución estrecha (casi monodispersa), se controlan principalmente los parámetros en los pasos de nucleación y crecimiento durante su síntesis.

De modo que nuevas partículas son nucleadas al mismo tiempo que las ya existentes están creciendo. A este proceso se le denomina *nucleación heterogénea*. Además las últimas partículas nucleadas pueden unirse a partículas aún más pequeñas y perturbar el proceso de crecimiento. El primer método estandarizado para la síntesis de soles monodispersos

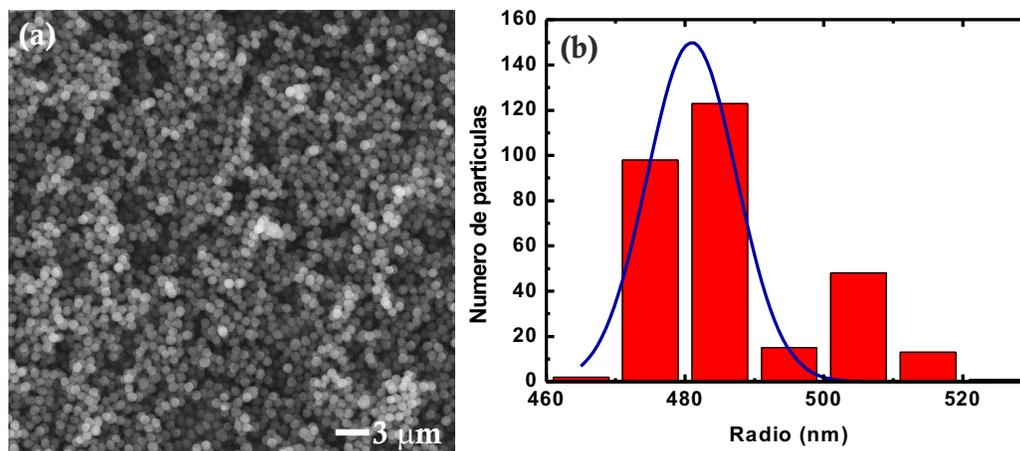


Figura 2.7: (a) Imagen SEM de partículas altamente monodispersas de sílice sintetizadas por el método de Stöber. (b) Gráfica de la distribución de tamaños de las partículas de sílice mostradas en la figura a), se calcula un porcentaje de polidispersidad de 2.5 %

de sílice con un tamaño de partículas entre 2-3 μm de diámetro fue obtenido por Stöber [37] en un sistema de alcohol-amonio con suficiente agua para hidrolizar al silano precursor.

El tamaño de las partículas coloidales puede ser caracterizado por diferentes métodos. Debido al límite de resolución, la microscopía de barrido electrónico (SEM) y la microscopía de transmisión electrónica (TEM) son las técnicas más apropiadas Fig. 2.7. La superficie de partículas de sílice limpias está cubierta con grupos hidroxilos (-OH) enlazados a átomos de silicio conocidos como silanoles. Puede existir un hidroxilo (aislado o vecinal) o dos (geminal) como se observa en la Fig. 2.8 (a). El bulbo de la partícula está constituida principalmente por una red de enlaces siloxano Si-O-Si Fig. 2.8 (b).

2.4. Modificación de la superficie de partículas de sílice con agentes silanos

Los agentes silanos u organosilanos son preferidos para la modificación superficial de partículas de sílice porque tienen una gran versatilidad en cuanto al ajuste del grupo que se desee introducir en la superficie de la sílice. Los aminosilanos son atractivos porque permiten la futura conjugación de moléculas químicas grandes. La funcionalización puede

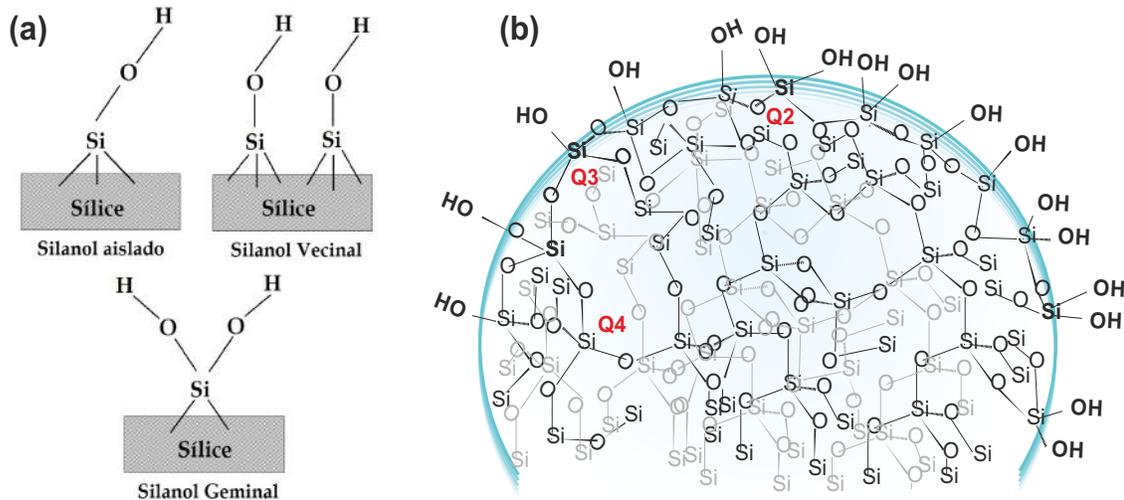


Figura 2.8: Representación esquemática de los silanoles presentes en la superficie de partículas de sílice: (a) Tipos de silanoles (b) Silanoles superficiales (Q2 y Q3) y bulto de la partícula (Q4).

o no ser homogénea, lo que da lugar a interacciones isotrópicas o anisotrópicas, respectivamente [38].

Dentro de los objetivos de este trabajo se encuentra la funcionalización del hemisferio hidrofílico de las partículas Janus mediante la introducción de grupos polares. Por lo cual el estudio se extiende al uso de distintos aminosilanos entre los cuales se escogen: 3-aminopropiltriétosisilano (APTES), 3-aminopropildietoximetilsilano (APDES), y mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTMS) Fig. 2.9.

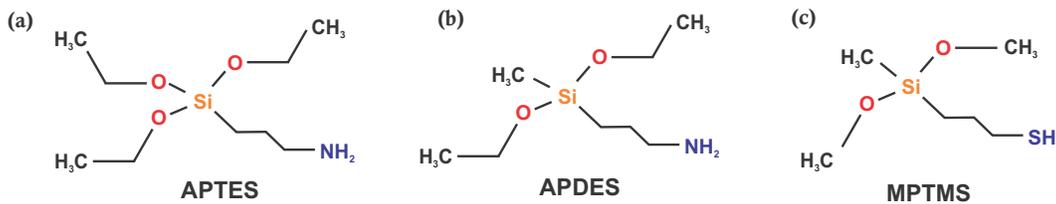


Figura 2.9: Estructuras de diferentes agentes silanos utilizados (a) 3-(aminopropil)triétosisilano (APTES) (b) 3-aminopropil(dietoxi)metilsilano (APDES) y (c) (3-Mercaptopropil) metildimetoxisilano (MPTMS).

El APTES y APDES poseen un grupo amino. Una ventaja del APTES es que la reacción de éste con la superficie de la sílice es conocida. El APDES también es un buen candidato gracias a la posibilidad de funcionalización en vapor que es deseable en sistemas especia-

les como los coloidosomas. Finalmente, el silano MPTMS Fig. 2.9 (c) posee un grupo tiol que es comúnmente utilizado para la posterior adsorción de nanopartículas de oro (AuNPs) a la partícula modificada [39]. La conjugación de AuNPs a las partículas de sílice en este trabajo es necesaria para la visualización de partículas anfifílicas. Aunque la conjugación de AuNPs también se puede dar con grupos amino debido a que se encuentran cargados positivamente ($R - NH_3^+$) a valores de pH menores a 10 y presentan un par de electrones que se pueden coordinar a la superficie de las AuNPs [39].

En esta sección se aborda a detalle la funcionalización con APTES debido al amplio conocimiento sobre la modificación superficial de sílice con este silano. En la Tabla 2.3 se resumen algunos trabajos que brindan información importante sobre las condiciones de reacción para la satisfactoria funcionalización de partículas y superficies de sílice. Como se observa, no existe un método sistemático ni general ya que la funcionalización es extremadamente sensible a las condiciones de reacción como la concentración del silano, el tiempo de reacción, la temperatura, la polaridad del disolvente y la cantidad de agua presente.

Superficie	Silano	Concentración del silano	Disolvente	Tiempo de reacción	Temp & Atm	Autor
Vidrio	APTES	1 % m/m	Tolueno anhidro	24 h		[40]
SiNPs (500-700 nm)	APTMS	9.74 mmol	DMF	24 h	100 °C	[41]
NPs magnéticas (Fe_3O_4)	APTES	0.2% y 2% m/v	Etanol + 150 μ L de agua	1 h, 2.5 h, 5 h	80 °C	[42]
			THF + 150 μ L de agua	7 h o 24 h	25 o 50 °C	
Silica gel	APTES	5%	Tolueno	1 h	25 °C/ N_2 seco	[43]
Silica MCM-41	APTES	0.1/0.4 mmol	Tolueno seco	3 h	80 °C	[44]
SiNPS (10 nm)	APTES	NI	Tolueno	3 h	95 °C	[45]
Sol de sílica	APDEMS	140 μ L	Etanol	10 min	60 °C	[46]
NPs magnéticas (Fe_3O_4)	APTES	2% v/v	Tolueno seco con Triton X100	5 h	50 °C	[47]

Tabla 2.3: Tipos de funcionalizaciones en diferentes superficies y tipos de partículas desarrolladas por varios autores dispersiones coloidales con ejemplos.

A pesar de ello, se ha observado que la modificación superficial con APTES proporciona una alta funcionalización [48]. Además, el incremento en la temperatura de reacción, así como el uso de disolventes no polares anhidros también mejoran notablemente la concentración de APTES en la superficie [40, 44, 47, 49]. Pero, sólo una pequeña cantidad de agua es necesaria para iniciar la hidrólisis del silano [42]. Por otra parte, un exceso de agua puede

ocasionar una pobre modificación superficial debido a la autocondensación del silano en el medio de reacción [50].

Sin embargo, para el caso de funcionalización de partículas de sílice en coloidosoma no es recomendable el uso de disolventes no polares ya que el material de protección es no polar (cera). Por lo que es necesario encontrar las condiciones que proporcionen una buena modificación superficial en un sistema que no presente tantas restricciones como los coloidosomas.

También, vale la pena el estudio de las condiciones de reacción de la superficie de partículas de sílice con APTES para lograr la mayor funcionalización posible puesto que ha sido demostrado que sólo un porcentaje de los silanoles superficiales pueden enlazarse a los silanos, y de estos únicamente cierto número de grupos amino se encuentran disponibles para futuras reacciones [52]. Para tener una mayor comprensión de las condiciones a utilizar es indispensable conocer las interacciones entre el aminosilano y la superficie de la sílice. Varias propuestas han sido establecidas [53]. De las cuales Vansant *et al* [54] muestran tres interacciones comunes Fig. 2.10.

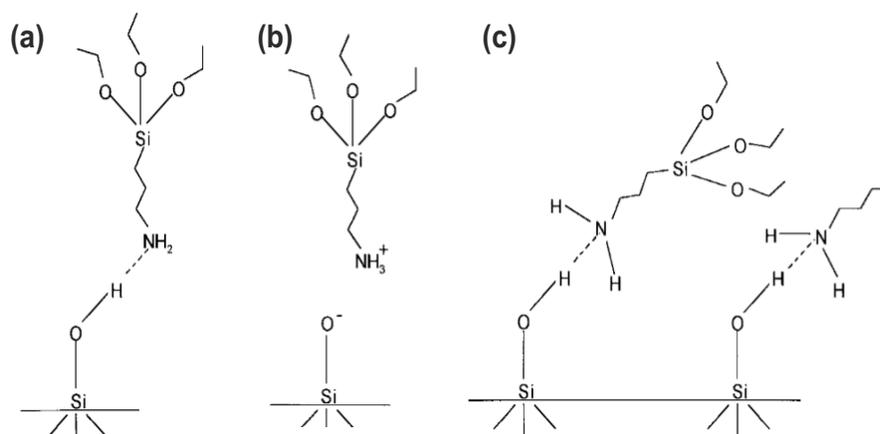


Figura 2.10: Tipos de interacciones entre el aminosilano y los silanoles de la superficie de la sílice (a) puentes de hidrógeno entre el hidrógeno del grupo hidroxilo de los silanoles de la sílice y los hidrógenos de los grupos amino, (b) transferencia protónica y (c) condensación con los grupos silanoles. Adoptado de Ref. [51].

La adsorción posterior a la reacción posee una fuerte dependencia del pH [55]. Pero, Chiang *et al* [56] muestran que la mayor parte del aminosilano adsorbido en la superficie de la sílice

se encuentra orientada y quimisorbida en la superficie Fig. 2.11. Además Plueddemann [57] propone una estructura dimérica de los aminosilanos hidrolizados en soluciones acuosas; esto quiere decir que dos aminosilanos hidrolizados reaccionan entre sí.

Entonces los aminosilanos condensan en la solución acuosa y después se adsorben en la superficie de la sílice. Adicionalmente Caravajal *et al* [43] emplea la técnica de RMN en estado sólido para estudiar a detalle cada especie.

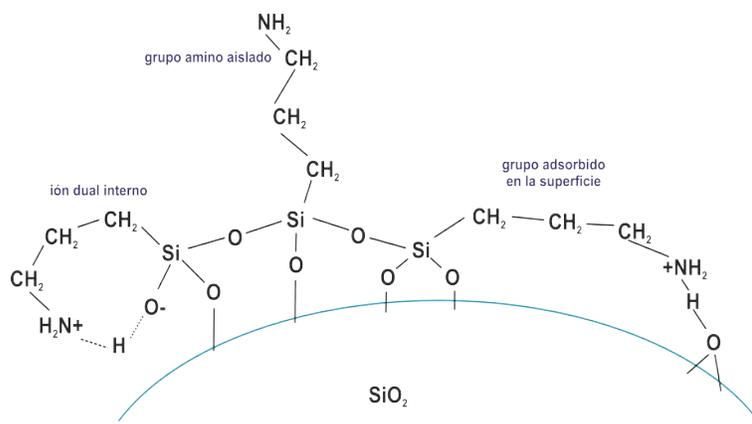


Figura 2.11: Interacciones entre los grupos amino y la superficie de las partículas después de la modificación con APTES.

2.5. Caracterización de partículas Janus

No sólo la síntesis de partículas Janus tiene sus desafíos, sino la posibilidad de observar claramente el balance Janus en ellas es un gran reto. La conjugación de los grupos amino introducidos en el hemisferio hidrofílico de las partículas Janus con nanopartículas de oro es preferido [34, 58]. Esto por la facilidad de síntesis de las nanopartículas de oro y su fácil visualización en microscopía de barrido electrónico (SEM). Pero también se ha realizado la conjugación de partículas Janus con tintes fluorescentes que permiten su visualización en microscopía óptica de fluorescencia (MOF) [59]. Esta última técnica requiere de un tamaño de partículas mayor a 500 nm de diámetro para poder resolver su visualización en MOF. De aquí la motivación de extender la síntesis de partículas Janus a varios tamaños de partículas. Generalmente la conjugación con cualquiera de estos compuestos se realiza en solución

[60, 61]. Sin embargo, una alta concentración de grupos amino promueve la agregación de nanopartículas de oro [62]. Una forma elegante de evitar esto es colocando las partículas Janus sobre una interfase donde la parte hidrofílica se encuentre orientada a la fase de estos agentes de conjugación.

La adsorción de nanopartículas de oro se ha realizado utilizando interfaces sólido-líquido, líquido-gas y sólido-gas [63]. La práctica más utilizada de estas tres es la deposición de las partículas en una interfase líquido-gas (agua-aire) donde el agua se intercambia por la disolución que contiene las nanopartículas de oro Fig. 2.12.

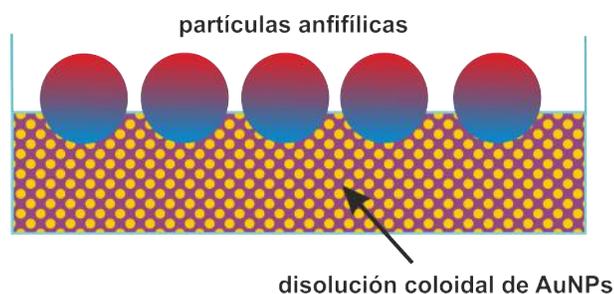


Figura 2.12: Deposición de partículas anfifílicas sobre una interfase líquido-gas donde la fase líquida es sustituida por partículas coloidales de oro (AuNPs).

La conjugación con un tinte fluorescente también conlleva otros problemas. Así como una alta concentración de grupos amino provoca agregación de las AuNPs, se desconoce el comportamiento del tinte hacia estos grupos amino. Además otros fenómenos comúnmente observables en compuestos fluorescentes debido a la concentración del tinte como el fotoblanqueamiento o la desactivación fluorescente (*quenching*) deben considerarse.

El compuesto fluorescente que se utilizó en este trabajo es la Rodamina B Isotiocianato (RBITC), la cual es preferida por su alto coeficiente de absorción, su alta fluorescencia y su alta fotoestabilidad y estabilidad química [64]. Para asegurar una buena visualización de las partículas Janus con este tinte es indispensable encontrar las condiciones de conjugación. La aproximación que se da en este trabajo es mediante el estudio de la conjugación de partículas hidrofílicas de sílice con RBITC. Por ello, es necesario conocer algunas propiedades de esta molécula, así como su acoplamiento a la partícula.

2.5.1. Rodamina B Isotiocianato (RBITC)

La reacción de conjugación de los grupos amino con tintes fluorescentes ha mantenido e incrementado su interés en detección de sistemas biológicos porque son comúnmente utilizados para marcar proteínas, anticuerpos y ADN para estudios de su transportación o interacciones específicas; así como para su detección por fluorescencia y escaneo de células [65]. En el caso de las partículas coloidales, las técnicas de espectroscopía o microscopía óptica de fluorescencia requieren que las partículas se encuentren decoradas con un tinte fluorescente. Entre muchos tintes, los isotiocianatos derivados de los grupos xanteno como la fluoresceína (FITC) y la rodamina B isotiocianato (RBITC) son ampliamente utilizadas. A pesar de que el rendimiento cuántico de la RBITC es mucho menor que el de la FITC [66], la RBITC tiene grandes ventajas:

1. Estabilidad al fotoblanqueo [65, 66, 67]. El fotoblanqueo es la destrucción fotoquímica de un fluoróforo por la exposición de luz necesaria para estimularlos de modo que produzcan fluorescencia.
2. Los tintes derivados del isotiocianato se enlazan covalentemente a los grupos primarios amino formando complejos de sustrato-tinte relativamente estables.

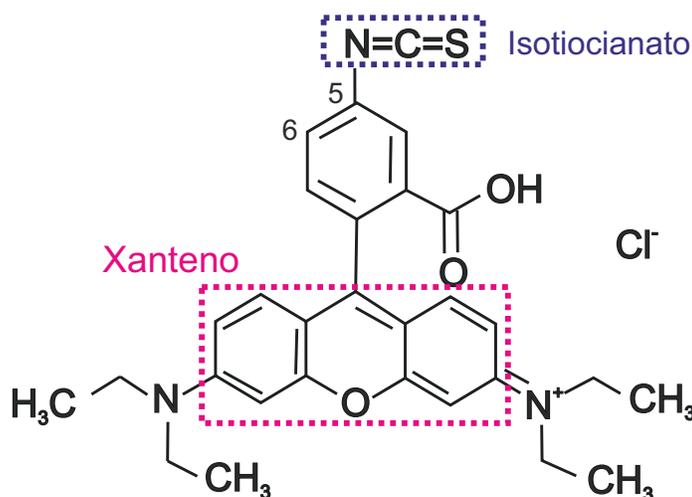


Figura 2.13: Rodamina B Isotiocianato, el grupo NCS puede estar localizado en la posición 5 o 6 del anillo de benceno formando una mezcla de isómeros.

La fácil detección de los colorantes de la familia de las rodaminas con fluorímetros y microscopía de fluorescencia extiende sus aplicaciones desde marcador de células [68] hasta trazador ratiométrico de iones en solución acuosa [69]. La Rodamina B Isotiocianato Fig. 2.13 es un cromóforo que pertenece a la familia de las Rodaminas las cuales están compuestas de heterociclos fluorescentes basados en el xanteno.

El grupo xanteno, siendo un sistema aromático, presenta varios electrones pi haciendo a este grupo responsable de la absorción y fluorescencia en el rango de longitudes de luz visible. El grupo reactivo de la RBITC para su conjugación con aminas primarias es el isotiocianato (-N=C=S) formado a partir de la sustitución del azufre por el oxígeno en el grupo isocianato (-NCO). Este grupo puede estar localizado entre el quinto y sexto átomo de carbono del primer ciclo aromático dando lugar a una mezcla de isómeros. El grupo isotiocianato contiene un átomo de carbono altamente electrofílico que puede ser atacado por diferentes grupos nucleófilos provistos de hidrógenos lábiles como las aminas primarias. Se conoce que la RBITC absorbe en verde y emite en rojo Fig. 2.14.

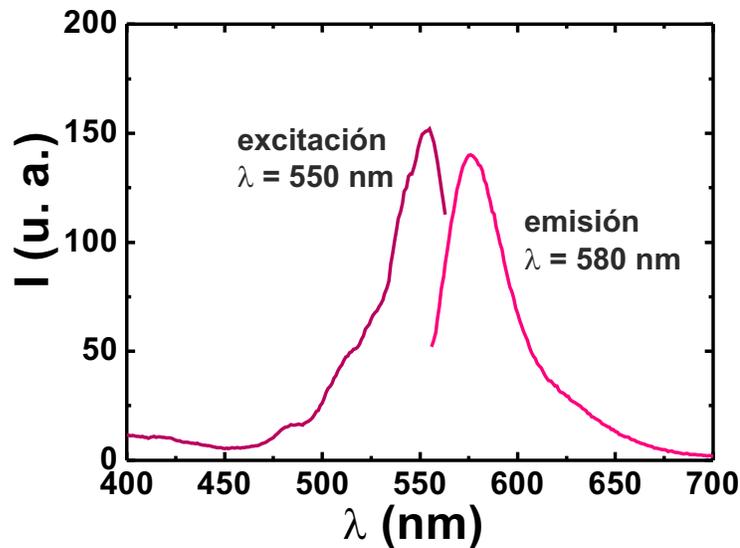


Figura 2.14: Espectros de excitación y emisión de la RBITC en etanol.

El acoplamiento de la RBITC a la partícula se realiza mediante un enlace tiourea con los grupos amino del silano Fig. 2.15. La fluorescencia de las partículas decoradas aumenta proporcionalmente al número de moléculas de RBITC enlazadas a la superficie de la

partícula. Esto sucede hasta cierto nivel, y la sobrecarga de la RBITC puede conducir a una desactivación fluorescente debido a las interacciones entre las moléculas de RBITC [70].

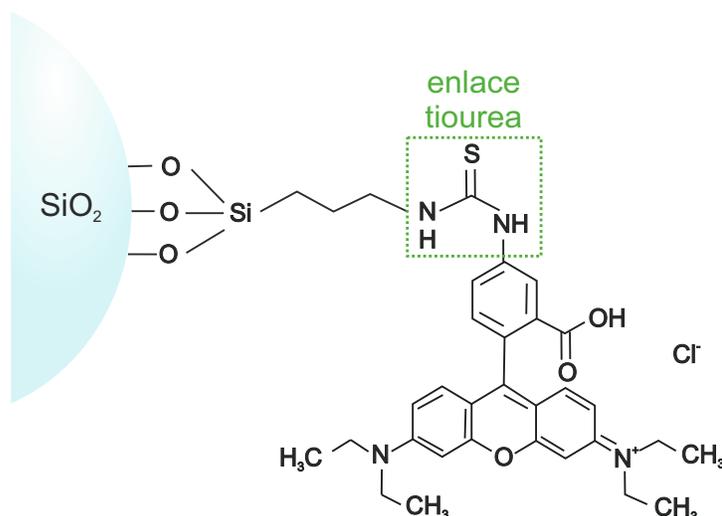


Figura 2.15: Conjugación de la RBITC a la superficie de la partícula mediante un enlace covalente de tipo tiourea.

La reacción usualmente se lleva a cabo en la oscuridad bajo condiciones de atmósfera inerte, para evitar descomposición del cromóforo. A pesar de que existen muchas sugerencias sobre el protocolo de conjugación, aún hay un desacuerdo para la aplicación de ciertas condiciones como el tiempo de reacción, temperatura y concentración del tinte.

Además hay indicios de que la reacción entre los grupos amino del APTES y la RBITC no está completa aún con un exceso de APTES [71]. El incremento en el tiempo de reacción puede ayudar a mejorar la eficiencia de la reacción y por tanto la fluorescencia de la partícula. Aunque, se desconoce hasta el momento algún estudio de optimización de incorporación de RBITC en función del tiempo de reacción.

Sin embargo, la reacción no es del todo trivial ya que se ha reportado que la Rodamina B puede sufrir alguna descomposición química al tener contacto con la luz y oxígeno en presencia de un sustrato que ocasiona la fotooxidación del cromóforo [72]. Aunque esto requiere la transferencia de un electrón del tinte a un sustrato semiconductor, convirtiendo momentáneamente al tinte en un radical en forma de catión [73]. Esto ocasiona una N-dealquilación de aminas secundarias o terciarias y de heterociclos que contienen un átomo de nitrógeno. Dicha N-dealquilación se observa en un desplazamiento hipsocrómico de 10

nm en el máximo de absorbancia y es un proceso gradual donde los grupos etilos son removidos uno por uno formando N,N,N'-Trietilrodamina Fig. 2.16.

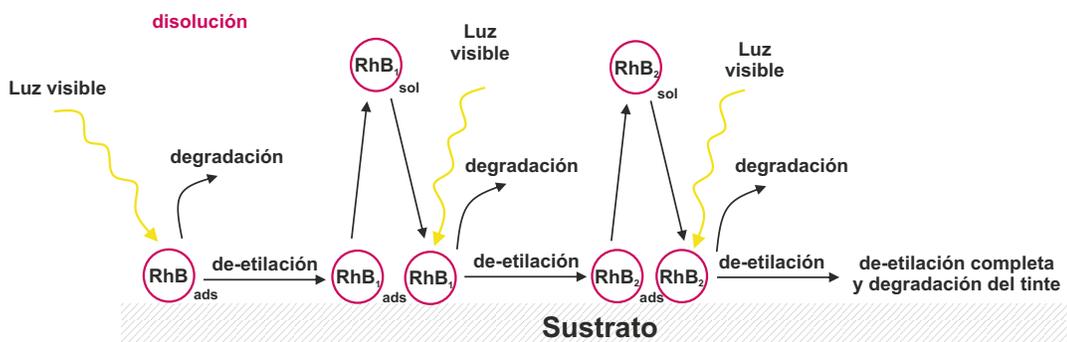


Figura 2.16: Equilibrio de la Rodamina B y las especies de-etiladas entre el volumen de disolución (sol) y el sustrato (ads) durante la fotooxidación. RhB₁ y RhB₂ referidos como los compuestos de rodamina mono y bi-de-etilados, respectivamente.

2.6. Métodos de caracterización de la superficie de partículas de sílice

La superficie químicamente modificada de la sílice puede ser estudiada mediante diferentes técnicas. La problemática radica en la cuantificación de las especies presentes en la superficie de la sílice. El análisis elemental es una técnica vastamente utilizada para este tipo de cuantificación, sobre todo en partículas mesoporosas con un área superficial grande [74, 75]. No obstante, impide la caracterización de los diferentes tipos de especies que pueden encontrarse en la superficie de la sílice y no detecta cantidades pequeñas de éstas.

La técnica de resonancia magnética nuclear en estado sólido, por ejemplo, permite la identificación de dichas especies. La mayor desventaja de esta técnica, empero, es su baja sensibilidad hacia ciertos núcleos como ¹³C o ²⁹Si que son las especies que se pretenden estudiar en este trabajo. Existen otras técnicas, como la espectroscopía de fluorescencia, la cual vence a esta limitante gracias a su alta sensibilidad (aprox. C = 10⁻⁹M). Además son precisas gracias a la selectividad de los compuestos que se utilizan. Sin embargo, los

métodos que se han desarrollado hasta el momento incluyen la destrucción de las partículas [44]. Y aunque se posee una cuantificación global de la modificación superficial de las partículas de sílice, la disponibilidad de los grupos introducidos para reaccionar con futuros compuestos, varía.

Por estas razones se continúa la búsqueda de métodos no destructivos que permitan la cuantificación de las especies, así como su posible disponibilidad a futuras reacciones. Una aproximación hacia esto fue desarrollada por Del Campo *et al* [76] utilizando espectroscopía de UV-Visible.

2.6.1. Resonancia Magnética Nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) es considerada una de las herramientas analíticas más potentes gracias a su capacidad de proporcionar información única acerca de la estructura y propiedades dinámicas de un sistema. Cada núcleo, dependiendo de la orientación relativa de las moléculas, puede ser afectado por el campo magnético externo, por los campos creados por núcleos cercanos y por la distribución electrónica.

La RMN se enfoca en el estudio de núcleos que poseen un número impar de protones y neutrones y por tanto, presentan un momento magnético intrínseco. Este momento magnético surge de su espín, el cual está determinado por el número cuántico del espín (I). Si el número combinado de protones y neutrones en un isótopo dado es par, entonces $I = 0$. Los núcleos frecuentemente empleados en RMN son el ^1H , el ^{13}C y el ^{15}N .

La resonancia aprovecha que los núcleos atómicos resuenan a una frecuencia directamente proporcional a la fuerza de un campo magnético ejercido, de acuerdo con la ecuación de la frecuencia de precesión de Larmor ec. 2.2:

$$\nu = \frac{\omega_p}{2\pi}, \quad (2.2)$$

donde ω_p es el momento angular del espín del protón.

Cuando se aplica un campo magnético externo el espín se alinea a lo largo de este con dos posibles orientaciones: a favor o en contra con la menor energía para el espín orientado a favor. La diferencia de energía de estos espines está determinado por la energía de

interacción de Zeeman ec. 2.3:

$$\Delta E = g \mu_B B, \quad (2.3)$$

donde g es el factor de Landé, μ_B el magnetón de Bohr y B el campo magnético externo aplicado.

I. RMN en estado sólido

Los espectros de resonancia magnética nuclear en sólidos y en solución se rigen bajo el mismo principio pero los espectros obtenidos en estado sólido muestran señales anchas que son el resultado principalmente de las interacciones dipolo-dipolo debido a la restringida movilidad de los átomos y moléculas [77]. Las principales interacciones responsables del ensanchamiento de las señales son la anisotropía del desplazamiento químico, los acoplamientos dipolares (homo y heteronucleares) y el acoplamiento cuadrupolar.

Se han desarrollado técnicas que permiten obtener espectros de alta resolución conservando en lo posible la información que aportan estas interacciones: giro con ángulo mágico (MAS, Magic Angle Spinning), polarización cruzada (CP, Cross Polarization) o secuencias multipulso específicas para sólidos (CRAMPS, Combined Rotation and Multiple Pulse Spectroscopy).

II. Giro al ángulo mágico (MAS)

El giro al ángulo mágico desarrollado por Andrew E.R. [78] y Lowe I.J. [79] permite obtener señales más angostas mediante la remoción significativa de las interacciones dipolo-dipolo. Los autores demostraron que las interacciones dipolares anisotrópicas podían ser suprimidas introduciendo movimientos artificiales al sólido. Esta técnica incluye girar la muestra sobre un eje orientado a 54.74° respecto al campo magnético externo Fig. 2.17. De modo que la técnica funcione, el giro debe ocurrir a una razón mayor o igual al ancho de banda dipolar.

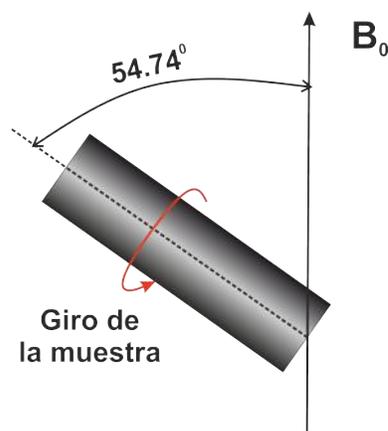


Figura 2.17: Representación esquemática de la técnica MAS. El eje de giro de la muestra es orientado con un ángulo de 54.74° (ángulo mágico) respecto al campo magnético estático B_0 .

Para describir el experimento RMN MAS se utiliza el siguiente Hamiltoniano:

$$H = H_{CS} + H_D^I + H_D^{II}, \quad (2.4)$$

donde H_{CS} es el término de desplazamiento químico, H_D^I representa los acoplamientos dipolares heteronucleares, y H_D^{II} describe los acoplamientos dipolares homonucleares. La protección química afecta la frecuencia, la cuál está determinada por la interacción Zeeman:

$$H_0 = -\mu \cdot B_0 \quad (2.5)$$

entre un momento magnético nuclear μ y un campo magnético externo estático B_0 . La μ puede ser expresada en términos del operador nuclear del espín I como $\mu = -\gamma\hbar I_z B_0$, y la ec. 2.4 es reescrita como:

$$H_0 = -\gamma \hbar I_z B_0 \quad (2.6)$$

donde \hbar es la constante de Planck. A pesar de que la interacción Zeeman es dominante y generalmente determina la cuantización en la descripción teórica del eje z, contiene información estructural dentro de ella que es removida de la descripción mediante una transformación en el marco rotatorio en la frecuencia de la RMN a lo largo del eje z [80]. En el

estado sólido, las interacciones del espín nuclear son anisotrópicas y pueden ser descritas mediante tensores de segundo orden. La protección química se escribe como:

$$H_{CS} = [\sigma_{ISO} \gamma B_0 + \frac{1}{2} \delta [3\cos^2\theta - 1 - \eta\sin^2\theta\cos(2\phi)]] I_z \quad (2.7)$$

La interacción dipolar entre dos espines aparece en virtud del pequeño campo magnético creado a su alrededor. El Hamiltoniano dipolar heteronuclear está dado por:

$$H_D^{IS} = \frac{-\mu_0}{4\pi} \hbar \sum_i \sum_j \frac{\gamma^I \gamma^S}{r_{ij}^3} \frac{1}{2} (3\cos^2\theta_{ij} - 1) 2I_z^i S_z^j \quad (2.8)$$

mientras que el Hamiltoniano dipolar homonuclear es descrito por:

$$H_D^{II} = \frac{-\mu_0}{4\pi} \hbar \sum_i \sum_j \frac{\gamma^2}{r_{ij}^3} \frac{1}{2} (3\cos^2\theta_{ij} - 1) (3I_z^i I_z^j - \mathbf{I}^i \cdot \mathbf{I}^j) \quad (2.9)$$

donde r_{ij} es la magnitud de la distancia del vector r_{ij} entre el núcleo i y j , y θ_{ij} es el ángulo entre r_{ij} y el eje z . Nótese que la dependencia de la orientación molecular en las ecuaciones 2.7-2.9 es de la forma $(3\cos^2\theta - 1)$, donde θ es el ángulo que describe la orientación del tensor de interacción del espín. MAS es una técnica elegante que promedia todas las interacciones anisotrópicas descritas por los tensores de segundo orden, si la frecuencia de rotación excede el acoplamiento más largo entre los espines considerados.

El ángulo mágico ($\theta = 54.74^\circ$) satisface la condición $(3\cos^2\theta - 1 = 0)$, entonces cuando la muestra se coloca en un rotor orientada en el ángulo mágico y girada en alta frecuencia, las bandas producidas por la parte anisotrópica desaparecen y el espectro consiste sólo en señales angostas en los desplazamientos isotrópicos. Únicamente el término $\sigma_{ISO}\gamma B_0$ de la ec. 2.7 permanece y se obtiene un espectro de alta resolución en estado sólido.

III. Polarización cruzada (CP)

La composición elemental de compuestos orgánicos es primordialmente hidrógeno, carbono, nitrógeno y oxígeno, de los cuales los primeros tres elementos presentan spin 1/2.

Los espines de los protones con alta abundancia natural también presentan un alta relación giromagnética γ , los cuales son los dos principales factores que determinan la sensibilidad de un experimento de RMN. Por lo tanto, los protones tienen la mayor sensibilidad de todos los espines. Sin embargo, los acoplamientos dipolares homonucleares entre los espines de ^1H son considerables. Además la topología de los protones en moléculas es tal que forman una red densa de espines fuertemente acoplados, con acoplamientos totales efectivos de ~ 50 kHz. Estas interacciones inducen severos ensanchamientos de señales en los sólidos. La baja abundancia de ^{13}C , ^{15}N , ^{29}Si por ejemplo, resultan inevitablemente en un espectro de RMN menos sensible. También los tiempos de relajación de núcleos diluidos son largos debido a la ausencia de interacciones dipolares homonucleares que inducen transiciones de relajación. Para mejorar la sensibilidad en RMN en estado sólido, se utiliza un marcado de isótopos. Es posible mejorar aún más la resolución de los picos y la intensidad de la señal en el experimento MAS mediante la transferencia de la magnetización transversa del ^1H a una especie diluida vía la polarización cruzada en combinación con un alto poder de desacoplamiento protónico [81].

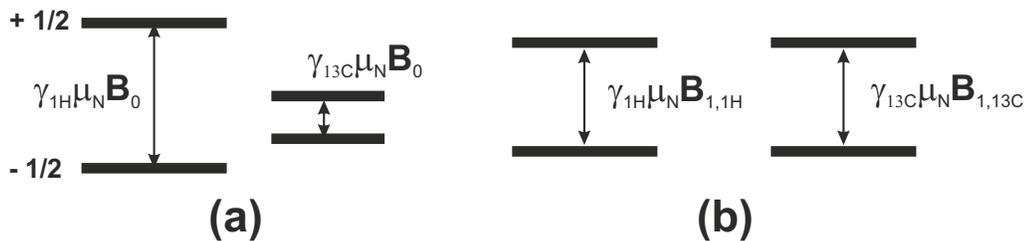


Figura 2.18: Niveles de energía de los espines ^1H y ^{13}C : (a) La transferencia no es posible (b). Con el marco rotatorio, la transferencia de magnetización es posible dado que la energía de separación está determinada por el campo rotatorio.

La separación entre los niveles de energía de los espines con orientación a favor o en contra para el ^1H exceden la separación del ^{13}C ($\gamma_{^1\text{H}}/\gamma_{^{13}\text{C}} = 4$). Por lo que la polarización de ^1H en un campo magnético B_0 es mucho mayor que la polarización para el ^{13}C . En un campo magnético B_0 no es posible la transferencia de magnetización longitudinal del ^1H a ^{13}C Fig. 2.18 (a). Sin embargo, si se aplica un campo rotatorio B_1 Fig. 2.18 (b) con una fase x , y la polarización también se encuentra a lo largo de x , entonces la diferencia de energía entre los estados $| -1/2 \rangle$ y $| +1/2 \rangle$ en el campo rotatorio puede ser variada independientemente

para diferentes especies nucleares, lo que hace la transferencia posible. Esto se conoce como la condición de Hartmann-Hahn.

IV. RMN CPMAS aplicado a partículas de sílice superficialmente modificadas con APTES

La combinación de ^{29}Si y ^{13}C RMN CPMAS proveen una buena aproximación para el estudio de los derivados de APTES en la superficie de partículas de sílice.

Estudios de los espectros ^{13}C de RMN CPMAS de las estructuras de APTES que yacen en las partículas de sílice revelan que los grupos amino en muestras preparadas en tolueno seco pueden estar enlazados por puentes de hidrógeno o estar protonado por silanoles ácidos presentes en la superficie de las partículas [43]. La cantidad relativa de la forma protonada aumenta con la cantidad de agua presente en la superficie de la sílice. En este mismo tipo de modificaciones se ha encontrado que las reacciones con grupos etoxi incrementan respecto a la cantidad de agua presente en la superficie. La sílice hidratada también afecta el ambiente químico de los grupos amino en muestras preparadas en solución acuosa y en este caso las reacciones de los grupos etoxi ocurre por completo [42].

Los espectros de ^{29}Si RMN CPMAS proveen información sobre la naturaleza del enlace del silano a la superficie de la sílice a través de un enlace siloxano (Si-O-Si). En general, se observan tres tipos: con uno (-49 ppm), dos (-58 ppm) o tres (-66 ppm) enlaces siloxano Fig. 2.19 (a).

El número de enlaces siloxano aumenta con la cantidad de agua presente en la superficie. Pero, aunque un poco de agua es necesaria para optimizar la reacción, demasiada agua puede interferir hidrolizando *a priori* el silano, formando fracciones de silano Si-OEt en el volumen o en la superficie de la partícula impidiendo futuros enlaces siloxano con un silano adyacente. Se ha observado que los procedimientos de curado pueden incrementar la cantidad de enlaces siloxano. Aunque temperaturas de curado de más de 150 °C son requeridas [43].

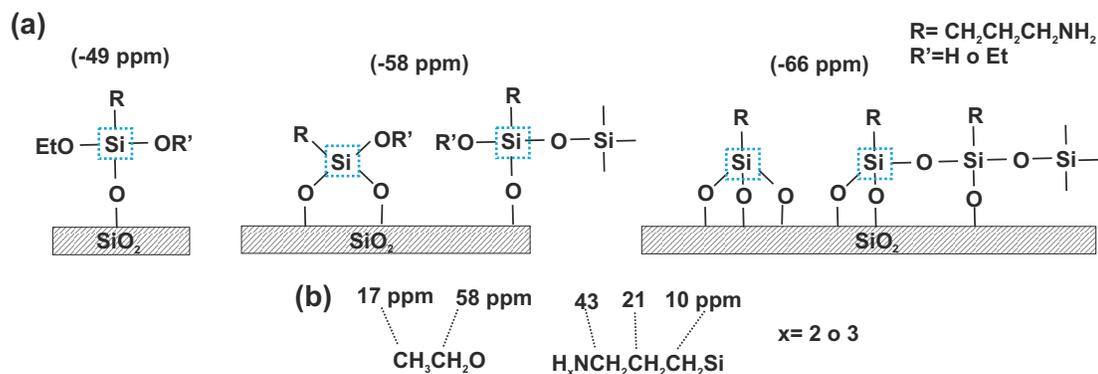


Figura 2.19: Especies observadas en la funcionalización de la superficie de sílice con APTES utilizando la técnica de RMN CPMAS. (a) ²⁹Si CPMAS y (b) ¹³C CPMAS. El núcleo de silicio marcado en azul corresponde al silano utilizado.

Complementariamente, los espectros de ¹³C brindan información sobre el silano adsorbido en la superficie de la partícula o enlazado a ella (10, 21 y 43 ppm) Fig. 2.19 (b). Las señales mayormente observadas son los grupos etoxi del silano que no reaccionaron (17 y 58 ppm). De la información de ambos espectros es posible estimar la fracción de grupos etoxi que han reaccionado, los grupos etoxi restantes sin reaccionar y el número de enlaces siloxano por comparación de la intensidad de las señales. Sin embargo, debido a la polarización mediante el núcleo de hidrógeno esto no es lo más recomendable para la cuantificación de los grupos amino.

2.6.2. Fundamentos de espectroscopía de fluorescencia y UV-Visible

El fundamento de la espectroscopía radica en la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica). Por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la caracterización de distintas moléculas [82]. Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. También presentan distintos niveles de energía. Cuando la luz es absorbida por una molécula, se promueve un

salto desde el estado basal al estado excitado (de mayor energía) Fig. 2.20 (a). Y sólo se absorberá la energía que permita el salto al estado excitado. Cada molécula tiene una serie de estados excitados (bandas) que la distingue del resto de las moléculas. Como consecuencia, la absorción que presenta una molécula a distintas longitudes de onda (espectro de absorción) constituye una señal de identidad de la misma.

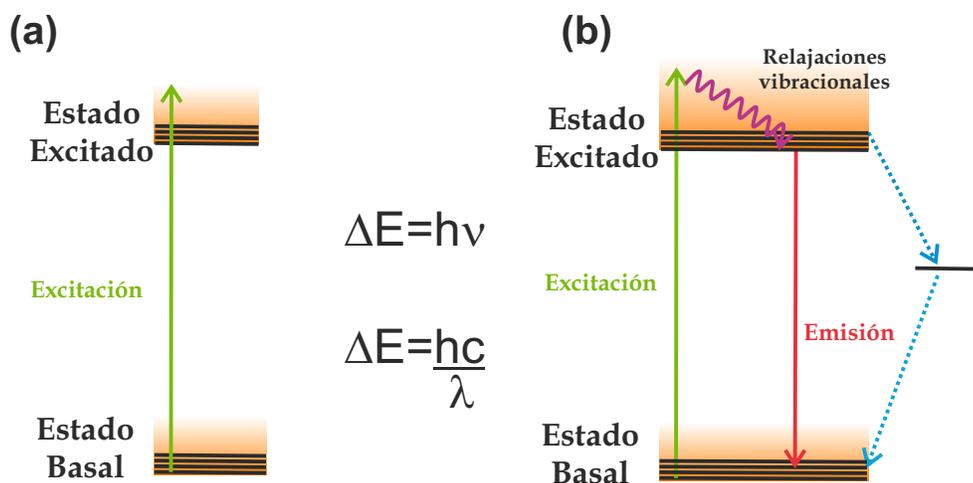


Figura 2.20: Diagrama de niveles de energía de una molécula. (a) Se promueve del estado basal al estado excitado mediante la aplicación de luz en el rango UV-Visible. (b) Posteriormente la molécula se relaja de vuelta al estado basal liberando energía en forma de fotones (fluorescencia). La diferencia de energía entre el estado basal y el estado excitado requiere una cantidad específica de energía que, a su vez es inversamente proporcional a la longitud de onda aplicada.

La longitud de onda en la cual el fotón incidente se absorbe es determinada por la diferencia en los niveles de energía disponibles de las diferentes sustancias presentes en la muestra $\Delta E = h\nu$. Ésta es la selectividad de la espectrometría de absorbancia, la capacidad de generar fuentes de fotones (luz) que son absorbidas sólo por algunos componentes en una muestra. En la espectroscopía de absorción, los fotones absorbidos no son emitidos de nuevo (como en la fluorescencia) sino que la energía que se transfiere al compuesto químico en la absorbancia de un fotón se pierde por medios no radiativos, como la transferencia de energía por calor a otras moléculas.

La región UV se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos,

grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV. Por lo que esta técnica es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos. Diversos factores (pH, concentración de sal, disolvente, etc.) alteran la carga de las moléculas provocando desplazamientos de las bandas de los espectros UV.

En la región visible se aprecia el color visible de una solución que corresponde a las longitudes de onda que transmite, no que absorbe Tabla 2.4. El color que absorbe es el complementario del color que transmite. Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la disolución.

Longitud de onda (nm)	Color de luz que absorbe	Color de luz que transmite
390-435	Violeta	Amarillo o verdoso
435-490	Azul	Amarillo
490-580	Verde	Rojo
580-595	Amarillo	Azul
595-650	Naranja	Azul verdoso
650-780	Rojo	Verde azulado

Tabla 2.4: Longitudes de onda aproximadas con su respectivo color de absorción y transmisión.

Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda de intensidad I_0 incide perpendicularmente sobre una disolución de un compuesto químico que absorbe luz, el compuesto absorberá una parte de la radiación incidente (I_a) y dejará pasar el resto (I_t), de forma que se cumple $I_0 = I_a + I_t$ Fig. 2.21. Por medio de este concepto, es posible determinar experimentalmente dos parámetros. El primero es la *transmitancia* que es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que atraviesa la muestra (I_t), y la cantidad de luz que incidió sobre ella (I_0); y se representa normalmente en tanto por ciento: $\%T = I_t/I_0 * 100$.

La relación entre %T y la concentración no es lineal, pero asume una relación logarítmica inversa. El segundo parámetro es la absorbancia que indica la cantidad de luz absorbida

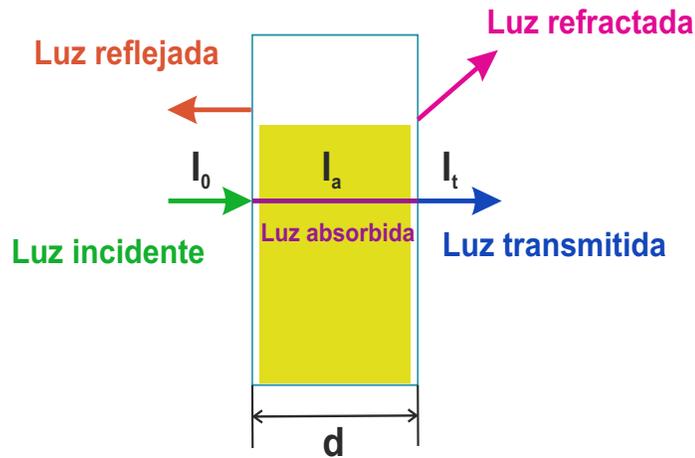


Figura 2.21: Absorción de cierta parte de la radiación incidente.

por la muestra y se define como: $A = \log(1/T)$, por lo que $A = \log(I_t/I_0)$. Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales ($I_0 = I_t$), la transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda, y el valor de A es $\log(1)=0$. La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que atraviesa la luz a través de la solución del compuesto y de la concentración de éste. La ley que expresa esta relación es conocida como la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \log(I_0/I_t) = \epsilon d C \quad (2.10)$$

donde d es la distancia que recorre la luz a través de la disolución, C es la concentración de la disolución y ϵ es una constante de proporcionalidad denominada *coeficiente de extinción* con unidades $M^{-1}cm^{-1}$ que es específica para cada compuesto. La ley de Lambert-Beer se cumple para disoluciones diluidas. Para valores altos de concentración, ϵ varía debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc.

Complementariamente, la espectrometría de fluorescencia se refiere principalmente a estados vibracionales y electrónicos. En general, las especies objeto de estudio tendrán un estado electrónico basal (un estado de baja energía) de interés, y un estado electrónico excitado de mayor energía. Dentro de cada uno de estos estados electrónicos hay diferentes estados vibracionales. En la espectroscopía de fluorescencia, primero se excita la mues-

tra mediante la absorción de un fotón de luz, desde su estado electrónico basal a uno de los distintos estados vibracionales del estado electrónico excitado. Las colisiones con otras moléculas causan que la molécula excitada pierda energía vibracional hasta que se alcanza el estado vibracional más bajo del estado electrónico excitado Fig. 2.20 (b).

La molécula desciende luego a uno de los distintos niveles de vibración del estado electrónico basal, emitiendo un fotón en el proceso. Como las moléculas pueden caer a cualquiera de los diferentes niveles de vibración en el estado basal, los fotones emitidos tendrán diferentes energías y, por lo tanto, frecuencias. Mediante el análisis de las diferentes frecuencias de luz emitida por espectrometría de fluorescencia, junto con sus intensidades relativas, se puede determinar la estructura de los diferentes niveles de vibración. En un experimento típico, se miden las diferentes frecuencias de luz fluorescente emitida por una muestra, manteniendo la luz de excitación a una longitud de onda constante. A esto se le llama espectro de emisión. Un espectro de excitación se mide mediante el registro de una serie de espectros de emisión utilizando luz de diferentes longitudes de onda. Por último, la molécula en forma excitada libera la energía absorbida en distintos mecanismos hasta el estado energético fundamental la cual puede ser complementariamente medida mediante espectroscopía de fluorescencia.

2.6.3. Aplicación de la espectroscopía de fluorescencia y UV-Visible para la cuantificación de grupos amino.

Gracias a su alta sensibilidad y su directa dependencia en la concentración, la técnica de espectroscopía de fluorescencia puede utilizarse para cuantificar los grupos amino en las partículas de sílice. Ritter *et al* [44] utilizaron esta técnica para dicho propósito. La reacción clave del método es la de aminas primarias con fluorescamina Fig. 2.22.

Con el fin de evitar la dispersión de la luz en el espectrofotómetro causado por las partículas, la red de silicio es descompuesta previo a la adición de fluorescamina. La reacción de la intrínsecamente no fluorescente fluorescamina con las aminas primarias (ahora completamente accesible), dan lugar a un derivado fluorescente. Dado que la reacción es 1:1, la

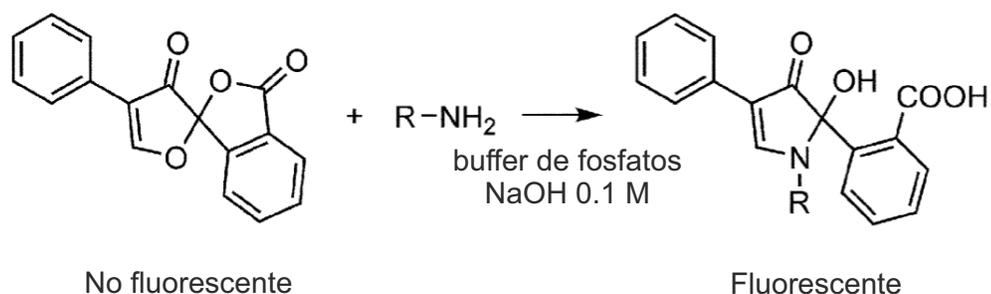


Figura 2.22: Reacción de la fluorescamina con un grupo amino primario que da lugar a un compuesto fluorescente.

intensidad de fluorescencia permite obtener la cantidad generada de este reactivo que es directamente proporcional a la cantidad de grupos amino liberados por la partícula.

El ensayo fluorimétrico es una gran herramienta para la cuantificación de grupos amino presentes en la superficie. Pero, la mayor desventaja de este método es que incluye la destrucción de la partícula. Además, la subsecuente conjugación de un compuesto a la superficie de la partícula también depende de las propiedades del mismo, como el tamaño; y no se asegura que todos los grupos amino presentes sean partícipes en una futura conjugación. Por lo que, la disponibilidad de los grupos amino a reaccionar se ve afectada por dichos parámetros.

Del Campo *et al* idearon un método no destructivo que permite dicha cuantificación utilizando una molécula relativamente pequeña (4-NBA) que es sensible a la luz UV. Su método, en general consiste en una titulación colorimétrica que incluye una reacción con un agente sensible a la luz UV: 4-nitrobenzaldehído (4-NBA). La reacción entre la amina y los grupos aldehído bajo condiciones anhidras generan un grupo imino Fig. 2.23.

El volumen de disolución de 4-NBA que no reacciona es eliminado y el grupo imino es hidrolizado de regreso a las precursoras en un volumen conocido de agua para producir 4-nitrobenzaldehído cuya absorbancia puede ser medida por espectroscopía UV-Vis ($\lambda_{abs} = 282\text{nm}$). El número de moléculas de aldehído hidrolizadas es proporcional al número de moléculas de imina presentes. Dado que el 4-NBA en exceso es desechado, el número

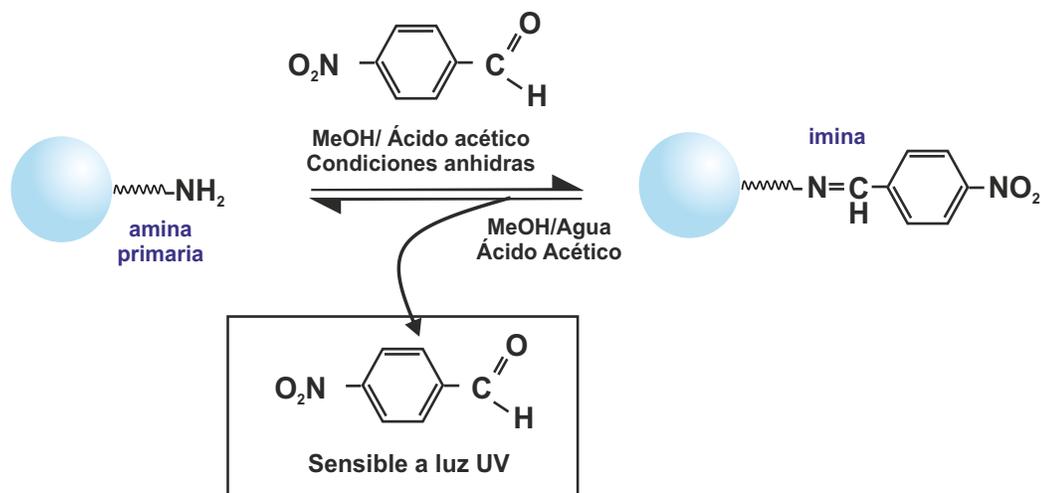


Figura 2.23: Esquema de la reacción de los grupos amino superficiales con un agente sensible a la luz UV (4-NBA).

ro de moléculas de aldehído hidrolizadas corresponderán al número de aminas primarias que existían inicialmente. De este modo es posible conocer la cantidad de grupos amino superficiales que se encuentran disponibles para reaccionar con un futuro compuesto.

A pesar de la gran ventaja de esta técnica que es no destructiva hacia las partículas, es importante tomar en cuenta que la formación de iminas a partir de una amina primaria es un mecanismo que incluye la formación de agua *per se* Fig. 2.24. Además, el pH del medio es crucial en el proceso de formación de la imina ya que en el segundo paso (formación de la carbinolamina), está catalizado por el ácido. Por lo que se debe asegurar la eliminación de agua durante la reacción y controlar el pH del medio.

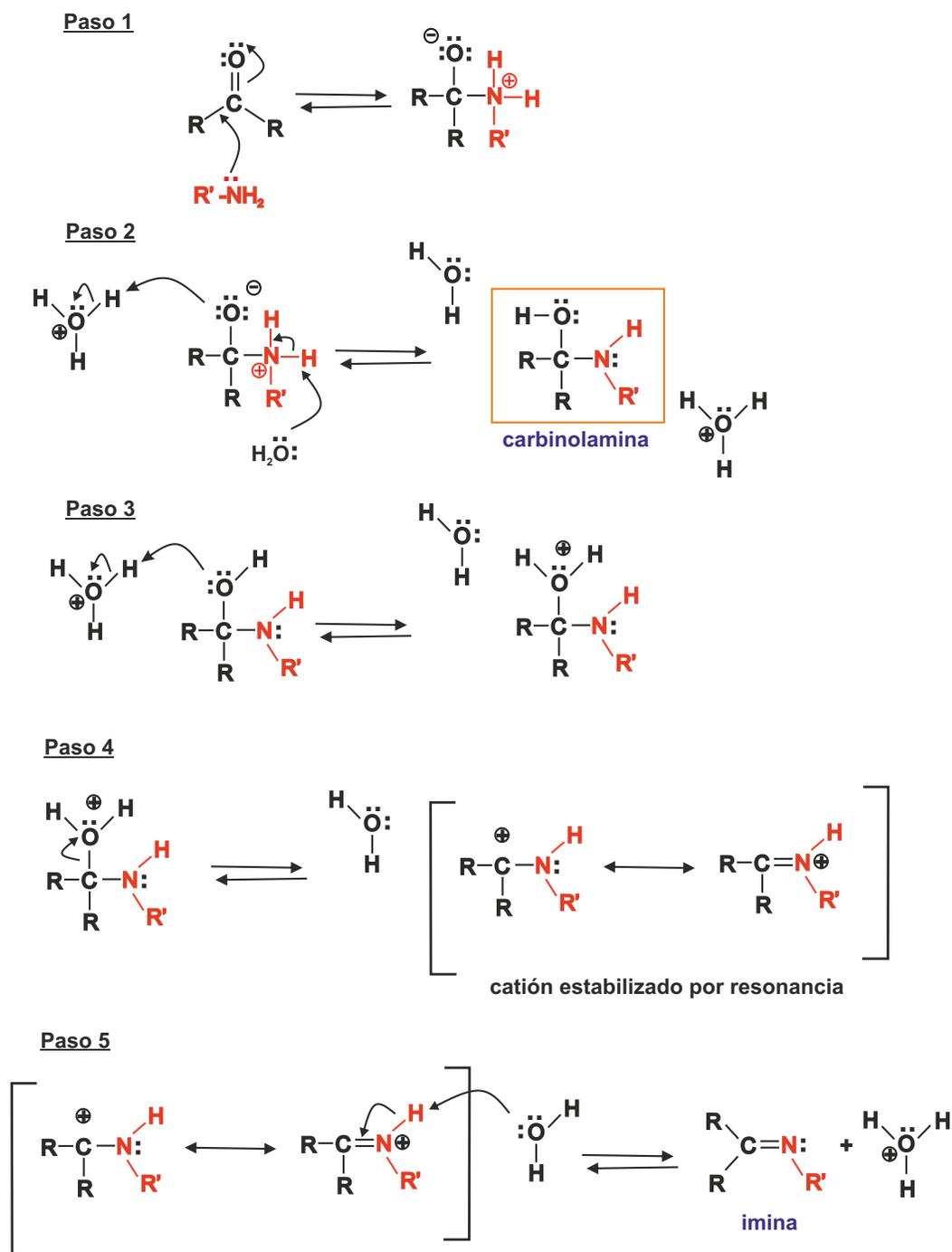


Figura 2.24: Mecanismo de reacción de la formación de iminas en medio ácido.

Capítulo 3

Procedimiento Experimental

En este capítulo se detalla el procedimiento de los métodos experimentales utilizados: la preparación de las muestras, los parámetros establecidos para la obtención de distintos tipos de espectros y la evaluación de los datos obtenidos.

3.1. Preparación de coloidosomas

Se utilizaron partículas de sílice con diámetros de 500 nm (S47) y 3 μm . Previo a la modificación, se realizaron ciclos de lavado para limpiar las partículas. En el primero se utilizaron aproximadamente 2 mL por cada 50 mg de partículas de ácido crómico formado a partir de dicromato de potasio hasta no observar ningún cambio en la coloración inicial del ácido (café). Después, se enjuagaron en la misma proporción de ácido a partículas con solución piraña ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ al 30 % w/w en una proporción 7:3 v/v), con el fin de activar la superficie. Las partículas fueron enjuagadas mediante ciclos de centrifugación-redispersión con agua desionizada hasta obtener un pH neutro.

Se utilizó como base una modificación al método propuesto por Granick *et al*; realizado en experimentaciones previas dentro del grupo de trabajo. El método y parámetros de ajuste para la preparación de 50 mg de partículas de 3 μm incluyeron la dispersión de las partículas en 5 mL de una disolución acuosa de bromuro de diodecildimetilamonio (DDAB) con

concentración $C = 0.044 \text{ g/L}$ ó $\text{CMC}/6$. La concentración de DDAB fue ajustada de manera que las partículas de sílice fueran inmersas aproximadamente a la mitad de su volumen. Por separado se fundieron 0.5 g de cera parafina a $75 \text{ }^\circ\text{C}$. La dispersión se añadió a la cera una vez que ésta se encuentre completamente fundida. La mezcla fue agitada durante 20 min con una barra magnética de agitación con el fin de obtener una emulsión estable de cera en agua (O/W). Posteriormente las gotas fueron enfriadas para formar coloidosomas sólidos, los cuales fueron filtrados y enjuagados con agua desionizada para remover el DDAB en exceso y las partículas no inmersas Fig. 3.1.

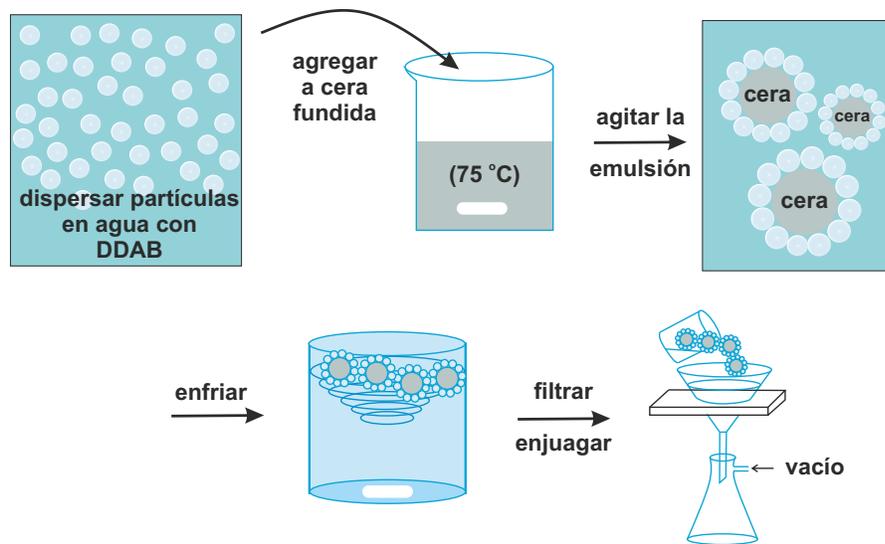


Figura 3.1: Representación esquemática de la síntesis de coloidosomas.

Posteriormente se realizó un escalamiento del método para partículas de 500 nm . El método seguido fue el mismo que para las partículas de $3 \text{ } \mu\text{m}$, salvo que para estos se realizó un primer ajuste a la cantidad de cera, partículas y volumen de disolución de DDAB; y posteriormente se ajustó la concentración de DDAB para sumergir las partículas a la mitad de su volumen. Los parámetros finales para la preparación de 50 mg de partículas de 500 nm inmersas a la mitad de su volumen fueron 15 mL de una disolución de DDAB con $C = 0.011 \text{ g/L}$ ó $\text{CMC}/3.9$ y 1.5 g de cera parafina. Detalles de este ajuste se describen en la sección 4.1.

3.2. Modificación superficial en coloidosoma y caracterización con AuNPs

Como se mencionó en la sección 2.4, se eligieron tres silanos para la modificación del hemisferio hidrofílico de las partículas de sílice. La silanización se realizó en vapor y/o en solución dependiendo de las características de cada silano. La modificación en vapor se realizó con APDES, gracias a su baja temperatura de ebullición, siguiendo el método de Jiang *et al* [17]. Los coloidosomas se colocaron en un filtro que se conectó a un tubo donde el silano fue burbujeadado con un flujo moderado de nitrógeno durante 10 mins. Fig. 3.2.

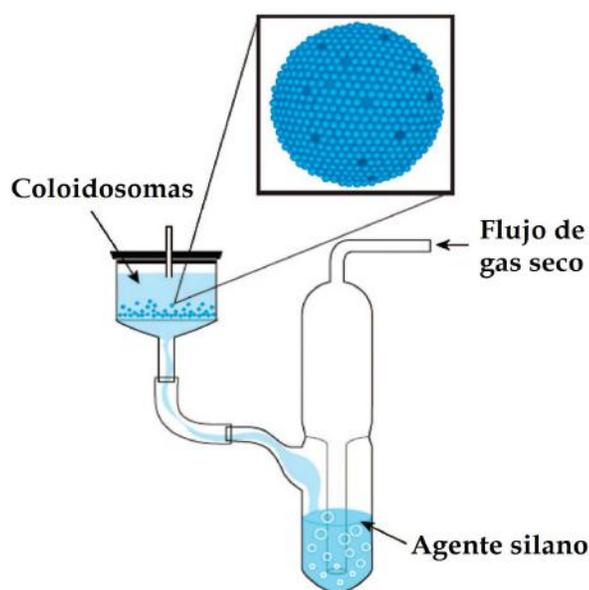


Figura 3.2: Representación esquemática de deposición en vapor de DCDMS y APDES en la parte desprotegida de las partículas de sílice inmersas en cera.

Las silanizaciones en solución se realizaron colocando los coloidosomas en un vial con cantidades iguales de silano (~ 0.5 mL) en 10 mL de etanol. Se permitió reaccionar durante 24 h con agitación leve. Los silanos utilizados para la modificación en solución fueron APDES, APTES y MPTMS.

La caracterización de la modificación con los distintos métodos y silanos utilizados se realizó mediante la posterior adsorción de nanopartículas de oro (AuNPs) a los coloidosomas. Para esto, se preparó una disolución de nanopartículas de oro con ~ 30 nm de diámetro siguiendo

el método estándar de Frens [83]. La síntesis utiliza volúmenes (20 mL) y concentraciones iguales ($C = 5 \times 10^{-4}$ M) de una disolución acuosa de cloruro de oro (III) como precursor y citrato de sodio como agente reductor Fig. 3.3. Primero, la disolución de cloruro de oro (III) se calentó hasta ebullición. a esta disolución se agregó la disolución de citrato de sodio previamente calentada. La mezcla se agitó vigorosamente hasta observar una coloración malva permanente (~ 30 nm) Fig. 3.3.

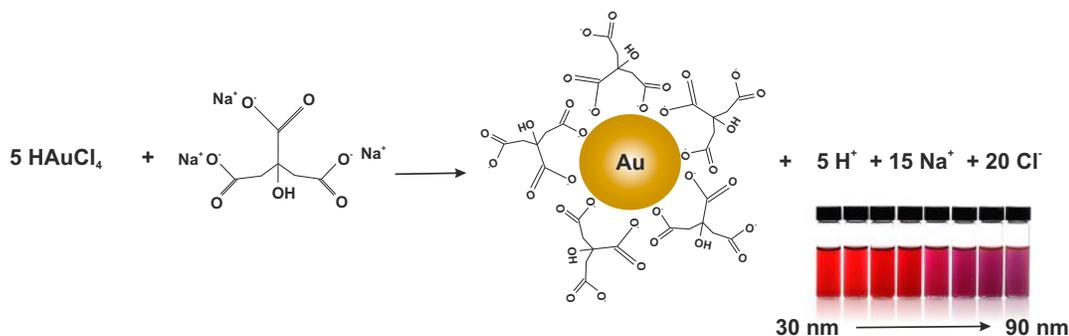


Figura 3.3: Representación esquemática de la síntesis de AuNPs con diámetro 30 nm siguiendo un método estándar. La imagen insertada del lado de productos corresponde al color de las disoluciones de distintos tamaños de nanopartículas de oro.

Una vez que la disolución de AuNPs se enfrió, se agregaron 5 mL de ésta a un vial con coloidosomas y se permitieron adsorber a la sílice modificada con agitación leve durante 24 h. Los coloidosomas se enjuagan con agua desionizada utilizando un filtro y fueron después observados mediante SEM. Se utilizó un microscopio de barrido electrónico JEOL 7800F. Las imágenes obtenidas fueron realizadas a las condiciones siguientes: voltaje de 1.0 kV, distancia de trabajo de 2.8 a 5.0 mm, UED, haz de luz suave (GB) y corriente de sonda igual a 6. Se obtuvieron imágenes con amplificaciones desde $150\times$ hasta $40,000\times$ dependiendo del tipo de muestra.

3.3. Modificación superficial de partículas de sílice con APTES

Utilizando el silano que proporcionó la mejor modificación en coloidosoma (APTES), se realizó la modificación de partículas sílice para encontrar las condiciones de reacción que proporcionaran la mayor funcionalización de la partícula.

Para este propósito, se utilizaron partículas de sílice con diámetros de 320 nm, 500 nm, 1 y 3 μm con índices de polidispersidad alrededor del 3 %. Previo a la modificación superficial, las partículas se limpiaron en la misma forma que para la preparación de coloidosomas (sección 3.1). La silanización con 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) se llevó a cabo en diferentes formas, las cuales se detallan en la sección 4.3.

Para cada muestra, cierta cantidad (ajustada para tener la misma área superficial total) de partículas de sílice limpias se hizo reaccionar con cierta cantidad de APTES conservando la relación $0.44 \text{ g}_{\text{APTES}}/\text{m}^2$ en un disolvente determinado. El cálculo detallado de esta relación se describe en las ecuaciones 3.1 a 3.7. El área total de partículas se obtiene de la forma siguiente:

$$A_P = A_{1P} N_P, \quad (3.1)$$

siendo A_P el área total de partículas, A_{1P} el área de una partícula y N_P el número total de partículas.

El número total de partículas se obtiene mediante,

$$N_P = \frac{m_P}{m_{1P}}, \quad (3.2)$$

siendo m_{1P} la masa de una partícula y m_P la masa total de partículas utilizadas.

La masa de una partícula,

$$m_{1P} = V_{1P} \rho_{1P}, \quad (3.3)$$

siendo V_{1P} el volumen de una partícula, y ρ_{1P} la densidad de una partícula que fue tomada como 2 g/mL.

Sustituyendo 3.2 y 3.3 en 3.1,

$$A_P = \frac{A_{1P} m_P}{V_{1P} \rho_{1P}}, \quad (3.4)$$

Sustituyendo el área y volumen de una partícula en 3.4,

$$A_P = \frac{4\pi R^2 m_P}{\frac{4}{3}\pi R^3 \rho_{1P}}, \quad (3.5)$$

donde R es el radio de la partícula.

Finalmente si simplificamos la ecuación 3.5

$$A_P = \frac{3 m_P}{R \rho_{1P}}, \quad (3.6)$$

y,

$$m_s = 0.44 \frac{3 m_P}{R \rho_{1P}}, \quad (3.7)$$

Se tomaron como referencia las condiciones de reacción de Sen *et al.* [47] puesto que reportaron un buen recubrimiento superficial. Aunque algunas variaciones en el tiempo de reacción, temperatura y concentración de silano fueron realizadas con el fin de mejorar la funcionalización. Estas variaciones se abordan en la sección 4.3. Al término de las reacciones, las partículas se lavaron mediante el proceso de sedimentación-redispersión con su respectivo disolvente de reacción tres veces y dos últimas veces con etanol.

El secado de disolventes se llevó a cabo en un matraz Schlenk a reflujo bajo atmósfera inerte. El montaje del sistema de secado de disolventes se muestra en la Fig. 3.4. El etanol se secó mediante la adición de hidróxido de potasio a reflujo durante toda una noche. Minutos antes de utilizar el etanol, éste se destiló bajo atmósfera inerte y se depositó en un matraz seco con ayuda de una cánula seca procurando mantenerlo todo el tiempo bajo condiciones inertes. El tolueno se secó con sodio metálico, se añadieron dos gotas de benzofenona como indicador. Una vez que la mezcla viró a azul marino se procedió a destilar y después se depositó en un matraz seco bajo atmósfera inerte.



Figura 3.4: Montaje del sistema de secado de disolventes. La coloración azul indica que el disolvente se encuentra completamente seco y listo para destilar.

3.4. Caracterización de la modificación superficial de partículas de sílice

3.4.1. RMN en estado sólido

Se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) en estado sólido de ^{13}C y ^{29}Si en abundancia natural con frecuencias de 75.4 y 59.5 MHz, respectivamente en un espectrómetro Bruker ASX300 utilizando una sonda CPMAS de 4 mm. El giro al ángulo mágico fue realizado a 8 kHz ^{13}C y 5 kHz ^{29}Si con el fin de remover las bandas laterales de giro. Los espectros de ^{13}C CPMAS fueron obtenidos con un tiempo de contacto de 2 ms

y un tiempo de reciclo de 5 s. Los espectros de ^{29}Si fueron adquiridos utilizando técnicas de pulso simple (SPMAS) o polarización cruzada con espín al ángulo mágico (CPMAS) con un tiempo de contacto de 5 ms y un tiempo de reciclo de 18 s. Un total de 11,200 ^{13}C y 10,400 ^{29}Si acumulaciones fueron obtenidas para cada espectro. Todos los desplazamientos químicos se muestran en partes por millón.

3.4.2. RMN en disolución

Los espectros de RMN en solución para ^1H y ^{13}C fueron obtenidos con un espectrómetro Bruker Advanced a 300 MHz ^1H y 75.4 MHz ^{13}C en EtOD- d_6 como disolvente.

3.4.3. Cuantificación de la densidad de grupos amino

Se realizaron dos tipos de ensayos: el primero por fluorimetría con fluorescamina para la cuantificación de grupos amino totales y el segundo por colorimetría con 4-nitrobenzaldehído para la cuantificación de grupos amino disponibles 2.6.3.

I. Ensayo fluorimétrico con fluorescamina

El procedimiento seguido fue una variación del propuesto por Ritter *et al* [44]. Para la medición de las muestras se disolvieron 15 mg de partículas silanizadas con APTES (S47 R = 428 nm) en 5 mL de una disolución acuosa de NaOH 0.1 M. Después se adicionaron 2 mL de la disolución buffer de fosfatos a una celda de cuarzo limpia medidos con micropipeta. Enseguida se adicionaron 100 μL de partículas silanizadas disueltas y 1 mL de una disolución fresca 1 mM de fluorescamina en acetona. Los espectros de emisión fueron recolectados inmediatamente a una $\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm.

La curva de calibración se preparó del mismo modo: se agregaron 2 mL de la disolución buffer a la celda, seguido de alícuotas de 100 μL de diferentes diluciones de APTES desde 10^{-9} M hasta 10^{-7} M en la disolución de partículas disueltas (1.7 mg/mL) y finalmente 1 mL de una disolución fresca con concentración 1 mM de fluorescamina en acetona Fig. 3.5 (a).

Es importante mencionar que la medición de las muestras y la curva de calibración fueron recolectadas el mismo día para evitar el uso de fluorescamina descompuesta.

El blanco establecido fue una disolución de 2 mL de buffer de fosfatos, 100 μ L de partículas disueltas y 1 mL de acetona Fig. 3.5 (b). La disolución de partículas se preparó con 170 mg de partículas de sílice (S15 con PD = 6.4%) en 100 mL de una disolución de NaOH 0.1 M para obtener una concentración final de 1.7 mg/mL. La disolución buffer de fosfatos se preparó con 13.28 g de monofosfato de sodio anhidro (NaH_2PO_4) y 0.94 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en 500 mL de agua para obtener una concentración final de 0.2 M y un pH de 8.0.

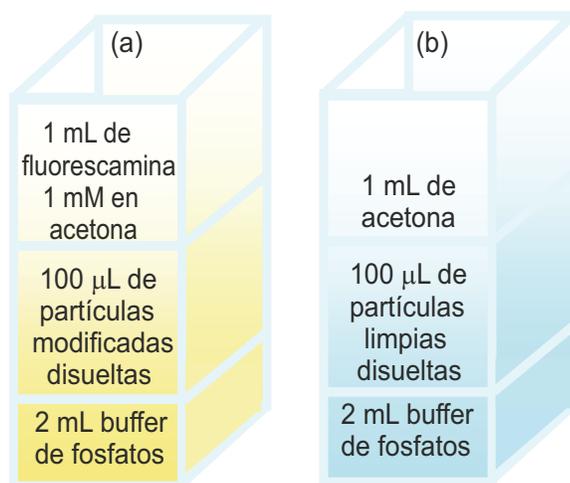


Figura 3.5: Esquema de las celdas de cuarzo preparadas para la medición en espectroscopía: (a) muestra, (b) blanco. La adición de cada disolución se agrega en el orden que se indica desde la parte inferior a la parte superior de las celdas.

II. Ensayo colorimétrico con 4-NBA

El procedimiento seguido fue escalado del propuesto por Del Campo *et al* [76], el cual se llevó a cabo de la siguiente manera: se colocaron 20 mg de partículas modificadas (S47 R = 428 nm) en un vial de 20 mL con una bolita de malla molecular, el vial se cerró con un tapón de goma y se selló con papel parafilm. Se pinchó un globo de nitrógeno, se permitió el

intercambio el aire dentro del vial pinchando una punta de jeringa y se volvió a sellar con papel parafilm. Después, con una cánula seca, se agregaron 4 mL de una disolución 0.8 % v/v de ácido acético glacial en metanol anhidro denominada *disolución de acoplamiento*. El procedimiento para el secado del metanol fue el mismo que el utilizado para el etanol, en un matraz Schlenk.

Las partículas fueron enjuagadas cuatro veces con la disolución de acoplamiento bajo atmósfera de nitrógeno con el fin de mantener las condiciones anhidras. Posteriormente se agregaron 4 mL de una disolución de 4-NBA (7 mg en 10 mL de disolución de acoplamiento) y se permitió reaccionar durante 3 h. Al finalizar la reacción se removió el sobrenadante y las partículas se enjuagaron nuevamente con cuatro lavados de 4 mL (c/u) de disolución de acoplamiento manteniendo en todo momento la atmósfera de nitrógeno.

Después se adicionaron 4 mL de una disolución con un contenido de 49.9 % v/v de H₂O, 49.9 % v/v de metanol y 0.2 % v/v de ácido acético glacial denominada *disolución de hidrólisis* y se dejó agitar durante 1 h más. Al finalizar el tiempo de agitación se removió el sobrenadante e inmediatamente se midió la absorbancia en UV-Vis con el máximo de absorbancia a $\lambda_{\text{abs}} = 282 \text{ nm}$. La cantidad de 4-NBA en la disolución hidrolizada fue calculada por interpolación utilizando una curva de calibración construida a partir de un rango de disoluciones estándar de 4-NBA preparadas por separado.

La recolección de espectros se realizó en una celda de cuarzo previamente lavada con ácido crómico seguido de agua destilada, etanol destilado y acetona. El ensayo de colorimetría con 4-NBA, se llevó a cabo en un espectrofotómetro Cary Eclipse UV/VIS. El blanco establecido fue una disolución con 49.9 % v/v contenido de H₂O, 49.9 % v/v de metanol y 0.2 % v/v de ácido acético glacial. Inicialmente se realizó una medición de metanol y se escogió como primer blanco. Después se realizó una medición con el blanco de la muestra para verificar que los disolventes no estuvieran contaminados. La celda fue enjuagada por lo menos 3 veces con metanol entre cada medición.

El ensayo fluorimétrico se llevó a cabo en un espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Bio. Los parámetros del fluorímetro para la recolección de los espectros de emisión se fijaron a barrido intermedio, voltaje del fotomultiplicador medio, aperturas (*slits*) de ex-

citación y emisión de 5 nm, y la detención del barrido (emission spectra stop) en 800 nm. La longitud de excitación se fijó a $\lambda_{exc} = 365$ nm realizando 5 promedios de barrido. El punto base para la intensidad de emisión fue escogido a $\lambda_{emi} = 480$ nm. La recolección de espectros de fluorimetría se inició excitando cada blanco a diferentes longitudes de onda para verificar que ninguno estuviera contaminado. Posteriormente, para la recolección de espectros de las muestras se realizó un barrido inicial a la longitud de onda escogida para observar el máximo y enseguida se recolectaron los 5 promedios. La celda fue enjuagada por lo menos 3 veces con solución buffer de fosfatos entre cada medición.

3.5. Conjugación de RBITC con partículas silanizadas

La decoración de partículas de sílice modificadas con grupos amino se realizó mediante diferentes series de experimentos. El primer experimento se realizó fijando un tiempo de reacción de 18 h y variando la concentración de RBITC (5, 10, 30 o 100 mg) en 20 mL de etanol absoluto. Estas disoluciones de RBITC fueron añadidas a 20 mg de partículas de 3 μm modificadas con grupos amino dentro de un vial cubierto con papel aluminio bajo atmósfera de nitrógeno con agitación constante Fig. 3.6. Para la siguiente serie de experimentos se escogió la concentración de 5 mg de partículas de 3 μm en 20 mL de etanol absoluto y se varió el tiempo de reacción desde 3 h hasta 80 h. Esta serie de experimentos se realizó tres veces con el fin de observar reproducibilidad.

3.5.1. Visualización de partículas conjugadas con RBITC mediante MOF

Las partículas decoradas con RBITC fueron observadas en un microscopio de escaneo láser confocal equipado con un láser de $\lambda = 555$ nm montado en un Axioscopio Zeiss A1 (Carl Zeiss, Alemania). Se escogió la apertura máxima del pinhole correspondiente a 13.55 AU. La excitación del cromóforo se llevó a cabo con el láser y la emisión fue recolectada con un filtro a $\lambda = 605 \pm 30$ nm. Se utilizaron objetivos de inmersión en aceite (Fluar 40 \times /NA 1.30 y Plan-apocromato alfa 100 \times /NA 1.46). Las muestras fueron preparadas utilizando dos

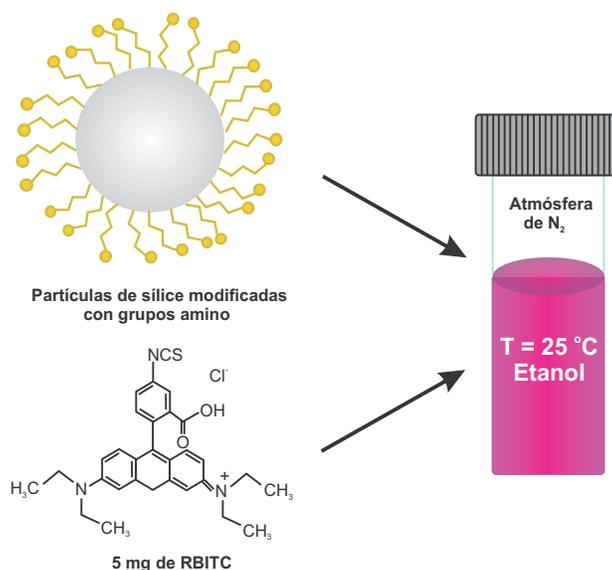


Figura 3.6: Representación esquemática de la decoración de partículas de sílice con un compuesto fluorescente (RBITC).

gotas de partículas bien dispersas en la mezcla etanol/tolueno 1:9 colocadas en un portaobjetos selladas con un cubre objetos. Las condiciones de escaneo se mantuvieron iguales para todas las muestras, fijando el tiempo de exposición a 15.49 s, tamaño de imagen a 2048×2048 píxeles, intensidad de láser al 2% y ganancia de la cámara a 600. Las imágenes fueron guardadas con un formato TIFF, 16 bit en escala de grises. El área de intensidad correspondiente a cada partícula fue analizada en el software Image J, mayores detalles sobre el uso del programa se encuentran en el Apéndice I. Al menos cien partículas fueron analizadas, evitando los agregados, y sus intensidades fueron promediadas. El experimento comenzando por la modificación superficial con APTES hasta el análisis de imagen fue repetido 3 veces. Los resultados reportados son el promedio de esos tres experimentos, donde las barras de error representan la desviación estándar del promedio.

3.5.2. Estimación de la concentración de RBITC mediante espectroscopía de fluorescencia y UV Visible

Para estimar la concentración del cromóforo presente en la superficie de la partícula, se utilizó el método de Giesche *et al* [84]. Una vez modificadas las partículas, se tomaron 10 mg de las mismas y se disolvieron en 5 mL de una disolución de NaOH 1 M. La especie fluorescente desprendida después de la disolución de partículas fue medida por espectroscopía UV/VIS y fluorescencia. Primero se realizó la identificación del máximo de absorbancia en UV/VIS en $\lambda_{\text{abs}} = 500$ nm, correspondiente a la banda principal de la RBITC. Después se excitó a esa longitud de onda para obtener los espectros de emisión. La concentración de RBITC fue calculada a partir de interpolaciones a la curva de calibración realizada en NaOH 1 M y en NaOH 1 M con partículas no modificadas disueltas en la misma concentración que para las muestras (2 mg/mL).

3.5.3. Estudio de la estabilidad de la RBITC en diferentes medios y tiempos de almacenamiento mediante RMN

Se prepararon 3 disoluciones de RBITC con concentraciones (5×10^{-8} , 1×10^{-8} y 5×10^{-7} M) en etanol y en NaOH 1 M y se almacenaron durante 7 días. Después del tiempo de almacenamiento, se agregó poco a poco cierta cantidad de una disolución de HCl 1 M a las muestras disueltas en etanol hasta alcanzar un pH ácido (~ 2) y se almacenó durante 9 días más.

Se realizaron mediciones iniciales y a diferentes tiempos de almacenamiento en un fluorímetro Varian Cary Bio. Se recolectaron únicamente espectros de emisión con los parámetros del fluorímetro establecidos en la sección 3.4.3.

3.6. Síntesis y caracterización de partículas Janus

Todos los estudios previos permiten fijar los numerosos parámetros para la síntesis de partículas Janus. Por lo que el método final establecido es el siguiente: Para sintetizar aproximadamente 50 mg de partículas Janus de 3 μm y 500 nm, se forman sus respectivos coloidosomas. El hemisferio expuesto de las partículas en coloidosoma se silaniza con DCDMS en vapor. Los coloidosomas son posteriormente enjuagados con etanol y la cera se disuelve con cloroformo mediante ciclos de centrifugación-redispersión. El último ciclo de lavado se realiza en una disolución de etanol en tolueno 1:9 v/v. El hemisferio no modificado es silanizado con APTES bajo las condiciones utilizadas para la muestra SA3.

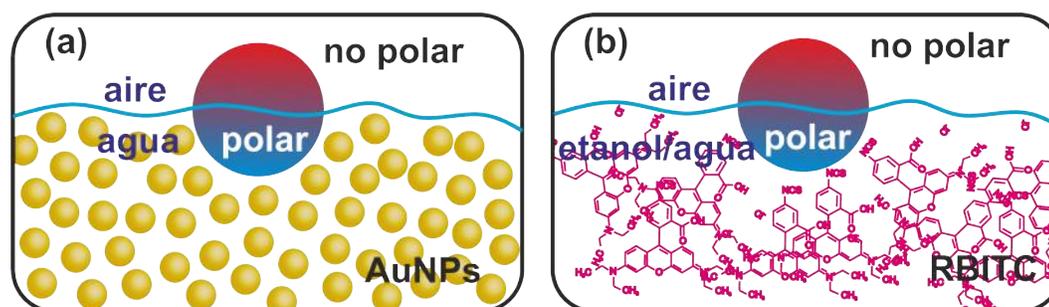


Figura 3.7: Representación esquemática de la decoración del hemisferio polar de las partículas Janus mediante la adsorción de: (a) AuNPs y (b) RBITC.

Para caracterizar las partículas mediante SEM, se adsorben AuNPs al hemisferio hidrofílico de las partículas Janus. Esto se realiza mediante la deposición de 2 mL de una dispersión de 2 mg/mL de partículas Janus en cloroformo sobre una interfase aire/agua. Posteriormente la fase acuosa es intercambiada por una disolución acuosa con alto contenido de nanopartículas de oro Fig. 3.7 (a). Después de 24 h de adsorción, las partículas se recolectan de la interfase con ayuda de una pipeta Pasteur. Las partículas son enjuagadas con agua desionizada para remover el exceso de nanopartículas de oro no adsorbidas.

En el caso de las partículas Janus fluorescentes, la fase líquida de agua es lentamente sustituida por etanol y posteriormente con una disolución de RBITC 9.33×10^{-4} M Fig. 3.7 (b). Aproximadamente seis horas después las partículas son recolectadas y enjuagadas con etanol absoluto.

Capítulo 4

Resultados y Análisis

4.1. Preparación de coloidosomas

El primer paso para obtener partículas Janus es mediante la protección de uno de los hemisferios de la partícula. En este trabajo se utiliza sílice como material base para las partículas Janus y el método de síntesis es el de emulsión (protección-deprotección) que incluye la formación de coloidosomas.

Sin embargo, el escalamiento a distintas cantidades o tamaños de partículas no es tan trivial puesto que son varios los parámetros que rigen la correcta formación de los coloidosomas. Entre ellos se encuentra la relación de cantidad de partículas hacia la cantidad de cera, ya que el área superficial depende directamente de esta última. Si bien, un exceso de cera ayuda a que todas las partículas formen un coloidosoma; gran parte de la cera quedará expuesta desperdiciando este espacio. Si por el contrario, la cantidad de cera es insuficiente; muchas partículas quedarán sin formar parte de un coloidosoma y al momento de enfriar la emulsión para sellar las partículas en la cera, muchas de estas quedarán dispersas en el agua de enjuague. Además la falta de espacio puede ocasionar también la formación de una segunda capa de partículas.

Otro parámetro es la relación del volumen de DDAB hacia la cantidad de cera. Para la correcta formación de una emulsión (O/W) es necesario que la cantidad de la fase aceitosa

Síntesis	Diámetro (nm)	m_p (mg)	C_{DDAB}	V_{DDAB} (mL)	m_{cera} (g)
JA	3000	50	CMC/6	5	0.5
J9	500	50	CMC/6	5	0.5
J10	500	20	CMC/6	5	0.5
J11	500	30	CMC/6	5	0.5
J13	500	50	CMC/6	15	1.5
J19	500	50	CMC/6	15	1.5

Tabla 4.1: Parámetros establecidos para síntesis de coloidosomas. m_p : masa total de partículas, C_{DDAB} : concentración de tensoactivo utilizada en términos de dilución de su concentración micelar crítica, V_{DDAB} : volumen de tensoactivo adicionado y m_{cera} : cantidad de cera parafina.

se encuentre en menor proporción de lo contrario la emulsión se invertirá formando una emulsión agua en aceite (W/O).

La relación del volumen de DDAB hacia la cantidad de partículas también es importante para que éstas tengan un mayor volumen de dispersión y no tiendan a formar agregados.

Finalmente, la concentración de DDAB es un factor clave para la inmersión de las partículas de sílice en la cera. Si la solución está muy diluida, los coloidosomas se formarán pero las partículas apenas lograrán sumergirse en la cera. Por el contrario, si la concentración de DDAB es muy alta, puede ocasionar que las partículas se sumerjan por completo en la cera. Esto debido a que la alta concentración de tensoactivo tratará de revertir la emulsión a agua en aceite (W/O); aunque esto se ha observado únicamente en proporciones del 50 % de la fase aceitosa [85].

En el presente estudio se reprodujo inicialmente la síntesis del trabajo realizado por el grupo anterior para la preparación de coloidosomas a partir de 50 mg de partículas de sílice de 3 μm con el fin de verificar su reproducibilidad (JA) Fig. 4.1. Una vez rectificada la correcta formación de coloidosomas con partículas sumergidas en aproximadamente un 50 % su volumen, se procedió a ajustar los parámetros para formar coloidosomas a partir de partículas de 500 nm.

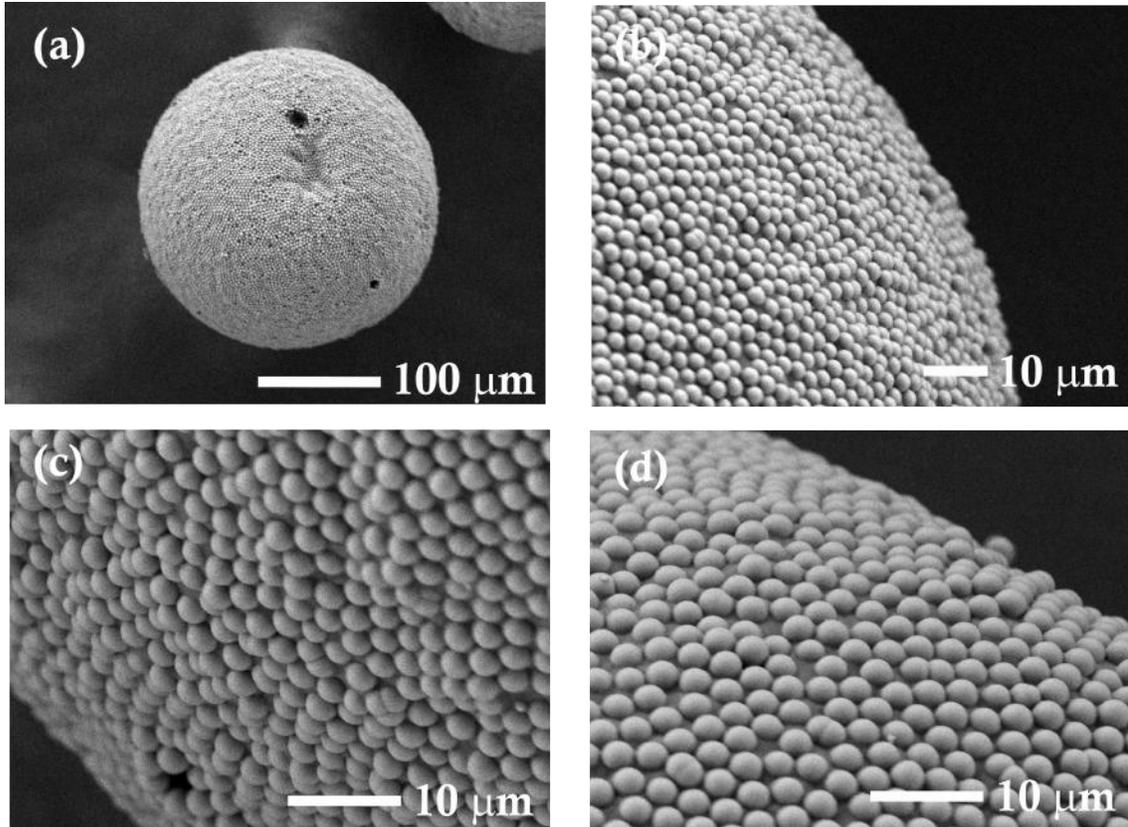


Figura 4.1: Imagen SEM de partículas de sílice de 3 μm inmersas en cera. (a) Acercamiento a un coloidosoma completo, (b)-(d) Acercamiento a la superficie del coloidosoma para verificar la inmersión de $\sim 50\%$.

Los parámetros establecidos en las primeras aproximaciones para el escalamiento a partículas de 500 nm se describen en la Tabla 4.1. La primera línea (JA) corresponde a la referencia: la síntesis de coloidosomas de 3 μm . Cabe señalar que se prefirió utilizar la concentración de tensoactivo en términos de su concentración micelar crítica (1.8 mM) [85] por practicidad. Durante la síntesis de los coloidosomas es importante observar que la emulsión se estabilice. También, en el análisis de las imágenes, se debe verificar el recubrimiento de la cera en coloidosoma. Esto se traduce como el rendimiento de la síntesis: a mayor recubrimiento, mayor rendimiento.

Se decidió comenzar por la reproducción de la síntesis JA para partículas de 500 nm (J9). La Fig. 4.2 (a) muestra un acercamiento a la superficie de esta síntesis. En apariencia, el recubrimiento es homogéneo y muy denso. Sin embargo, al momento de enjuagar los

coloidosomas el agua quedó un poco turbia, lo que indica que la interfase de la emulsión no fue suficiente para acomodar todas las partículas entonces hubo un exceso de ellas en el volumen. Por esta razón, se disminuyó la cantidad de partículas para la síntesis J10. Las imágenes de esta síntesis demuestran dos resultados: el primero es que la emulsión no estabilizó correctamente, lo que dió lugar a la formación de varios clústers de cera Fig. 4.2 (b). Esta incorrecta formación no es deseable puesto que se desconoce si existen partículas bajo la cera. El segundo resultado es que en varias regiones de los coloidosomas existen huecos Fig. 4.2 (c), lo cual indica un exceso de interfase. Esto permite aumentar un poco la cantidad de partículas para la siguiente síntesis, sin sobrepasar claramente los 50 mg.

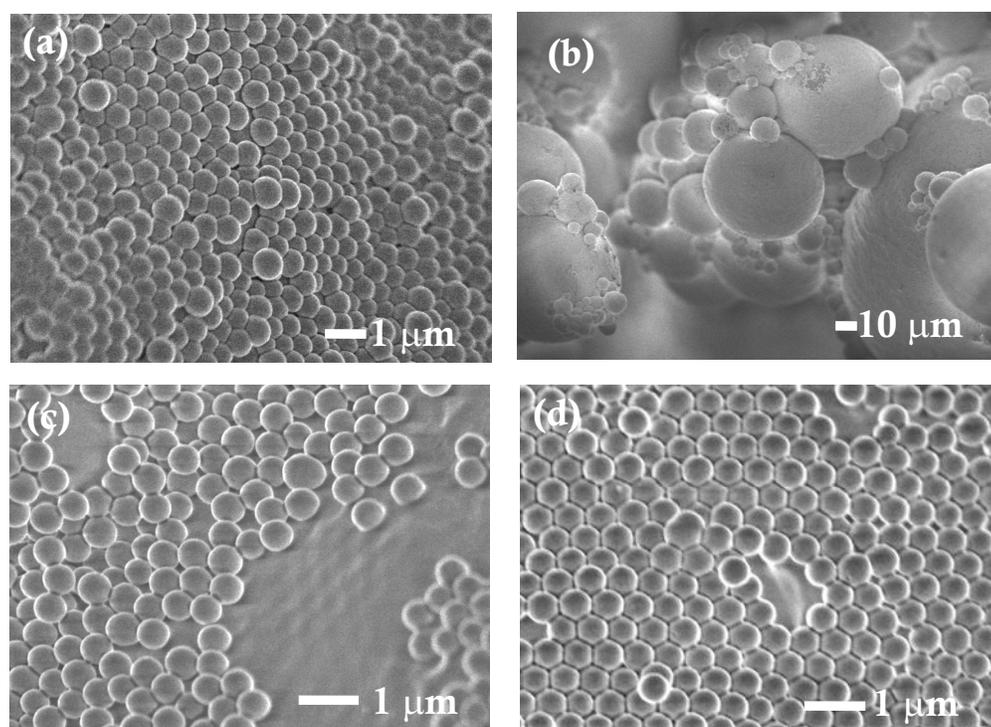


Figura 4.2: Imágenes SEM de partículas de sílice inmersas en cera: (a) síntesis J9 (50 mg de SiPs), (b) y (c) síntesis J10 (20 mg de SiPs) y (d) síntesis J11 (30 mg de SiPs).

En la síntesis J13 Fig. 4.2 (d) se observa un mayor recubrimiento de la superficie de los coloidosomas. Sin embargo, pese a los buenos resultados de esta síntesis, es deseable obtener la mayor cantidad de partículas en un lote. Por lo que se decidió aumentar la interfase escalando la cantidad de cera. Puesto que el aumento de aceite en agua podría generar una desestabilización de la emulsión, se decidió escalar en la misma proporción

el volumen de agua manteniendo la misma concentración de tensoactivo y los 50 mg de partículas (síntesis J13). Los resultados de esta última síntesis se muestran en la Fig. 4.3. A pesar de que no hubo exceso de partículas en la síntesis J13, la formación de coloidosomas fue altamente irregular Fig. 4.3 (a), lo cual tampoco es conveniente debido ya que se desconoce si existen partículas por debajo de los pedazos de cera sobre el coloidosoma. Esto también indica que la emulsión no tuvo oportunidad de estabilizarse por completo.

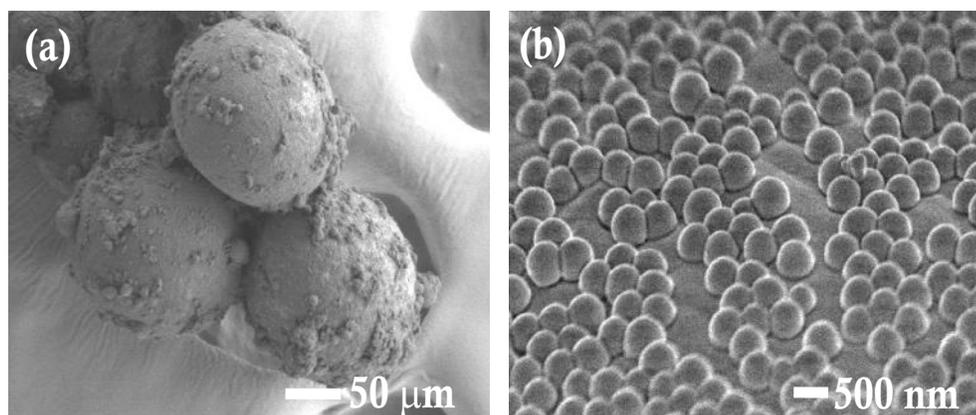


Figura 4.3: Imágenes SEM de partículas de sílice inmersas en cera ($m_{\text{cera}} = 1.5 \text{ g}$, $V_{\text{DDAB}} = 15 \text{ mL}$) (a) síntesis J13 (b) síntesis J19 (20 mg de SiPs).

Posteriormente se decidió aumentar a 60 mg la cantidad de partículas con el fin de obtener una mayor cantidad de partículas Janus. No obstante, la emulsión no estabilizó correctamente y al aumentar el volumen de tensoactivo y de cera se tuvieron dificultades con los viales para una correcta agitación, la cual es de suma importancia para la síntesis de coloidosomas ya que ayuda a formar gotas de cera de manera homogénea. Por lo tanto, se repitió la síntesis J13 con mayor precaución para observar su reproducibilidad (J19), y en este caso se observó una correcta formación de coloidosomas, un recubrimiento homogéneo y la inmersión de las partículas en la cera. Fig. 4.3 (b).

Gracias a los buenos resultados obtenidos a partir de la síntesis J19, se eligió a esta muestra como nueva referencia. Los parámetros fijos son la masa de partículas (50 mg), la masa de cera (1.5 g) y el volumen de la disolución de DDAB en agua (15 mL). Por tanto, el único parámetro libre es la concentración de tensoactivo la cual dicta la inmersión de las partículas en la cera. La variación de la concentración de tensoactivo se muestra en la Tabla 4.2.

Síntesis	Diámetro (nm)	m_p (mg)	C_{DDAB}	V_{DDAB} (mL)	m_{cera} (g)
J24	500	50	CMC/5.5	15	1.5
J26	500	50	CMC/4.4	15	1.5
J28	500	50	CMC/4.2	15	1.5
J31	500	50	CMC/3.9	15	1.5
J34	500	50	CMC/3.6	15	1.5
J35	500	50	CMC/3.5	15	1.5
J36	500	50	CMC/3.4	15	1.5

Tabla 4.2: Parámetros establecidos para obtener mayor inmersión de las partículas de sílice en la cera, tomando como referencia la muestra J19. Se sigue la misma notación que en la Tabla 4.1.

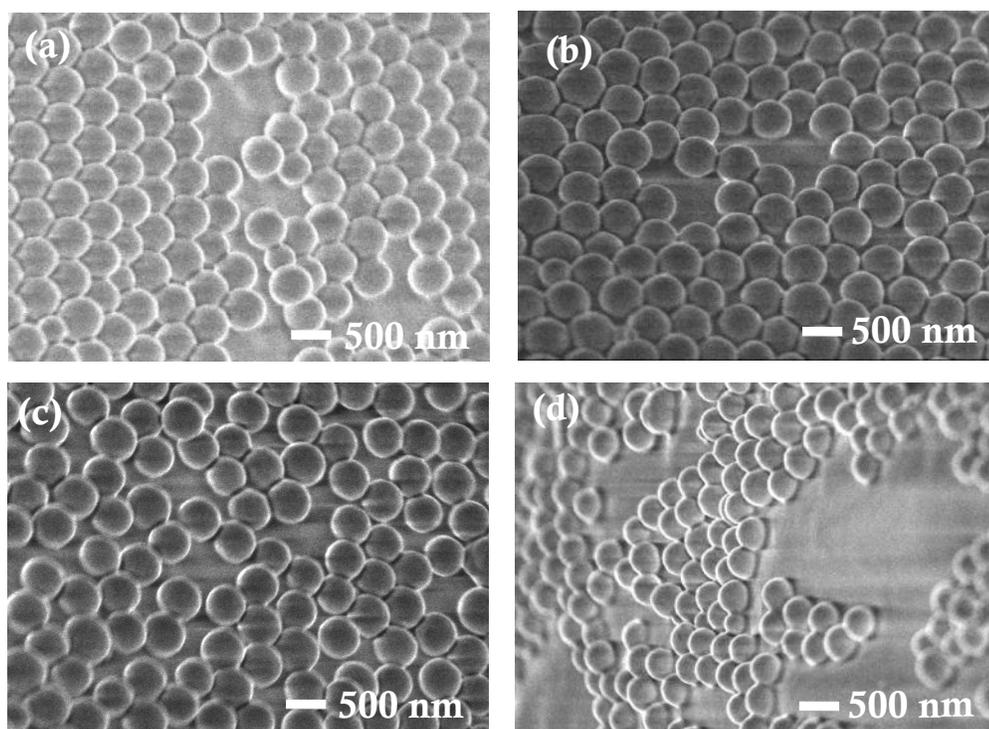


Figura 4.4: Imágenes SEM de partículas de sílice inmersas en cera (a) síntesis J24: CMC/5.5, (b) síntesis J26: CMC/4.4, (c) síntesis J28: CMC/4.2, (d) síntesis J31: CMC/3.9

La Fig. 4.4 demuestra la relación de inmersión de las partículas a mayor concentración de tensoactivo. Es muy difícil cuantificar el balance Janus a simple vista. Para esto es necesario contar con agentes visuales que lo permitan como la adsorción de nanopartículas de oro posterior a la modificación superficial de la parte expuesta de la partícula. Hasta esta sección únicamente se pueden comparar con una referencia.

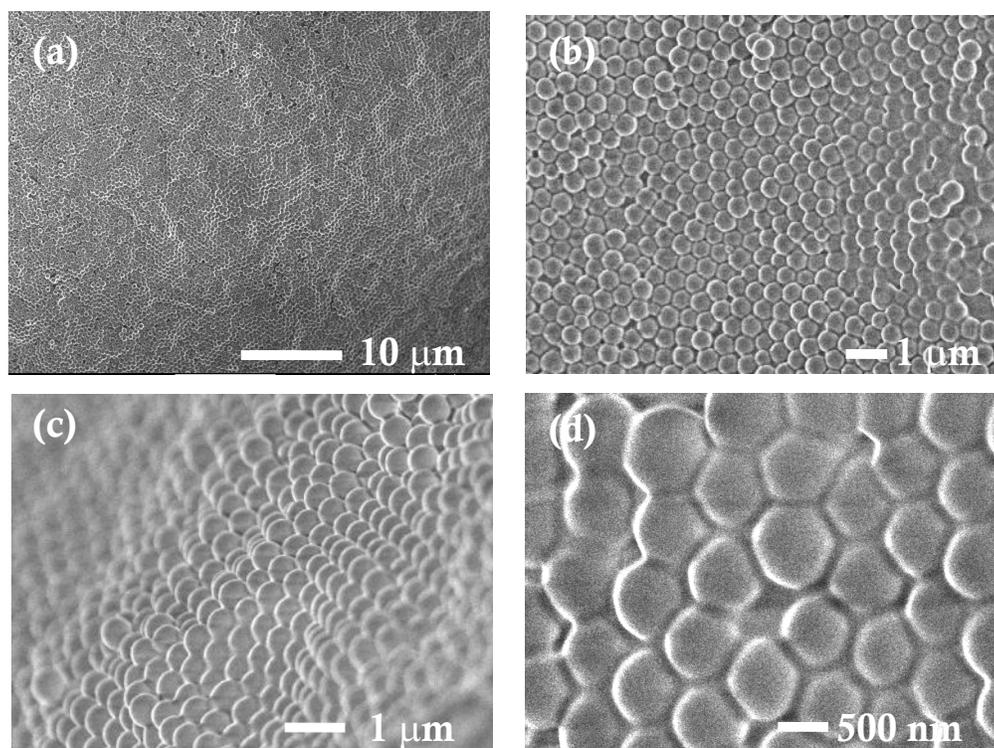


Figura 4.5: Imágenes SEM de síntesis J34: CMC/3.6, inmersión ~50 % .

Las referencias elegidas fueron el trabajo previo del grupo para partículas de 3 μm y el trabajo de Perro *et al* [60]. En todas las síntesis a partir de J20 se observó una correcta estabilización de la emulsión, una correcta formación de coloidosomas y recubrimientos altos y homogéneos de los mismos. Sin embargo, para obtener una inmersión aproximada del 50 % fue necesario aumentar la concentración de tensoactivo hasta su CMC/3.6 que corresponde a la síntesis J34 (Fig. 4.5). En este caso, debido al alto recubrimiento es difícil observar bien la inmersión de la partícula. Pero, una señal de esto es que las partículas se encuentran más empaquetadas y no puede distinguirse fácilmente su forma esférica.

Otro indicio de que la síntesis J34 tiene un balance aproximado del 50 % es que las siguientes síntesis (J35 y J36) Fig. 4.6 demostraron que la emulsión se invirtió, generando que muchas de las partículas quedaran completamente sumergidas en la cera. También al momento del enfriamiento de los coloidosomas quedaron grandes pedazos de cera lo que señala una estabilización incorrecta de la emulsión. Como se mencionó previamente, la frontera entre un balance Janus del 50 % y la inversión de la emulsión es muy notoria debido al ángulo de contacto; por lo que un pequeño cambio en la concentración de tensoactivo es decisivo en la inmersión de las partículas.

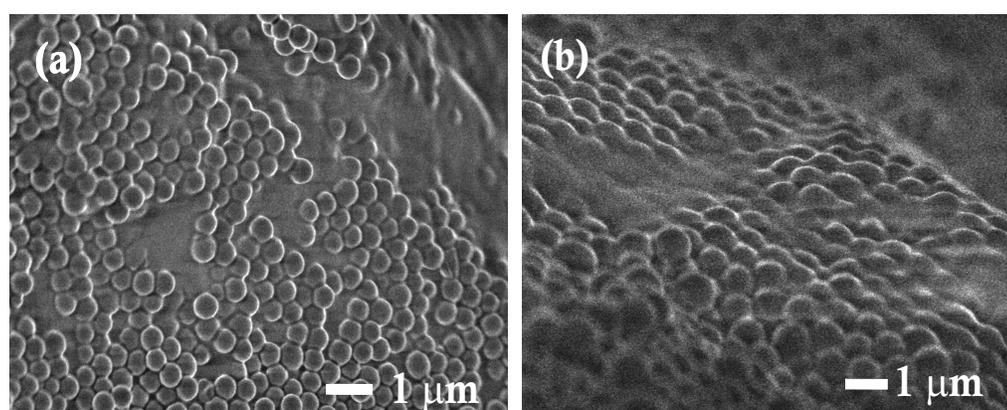


Figura 4.6: Imágenes SEM de síntesis (a) J35: CMC/3.5 y (b) J36: CMC/3.4.

4.2. Modificación superficial en coloidosoma y caracterización con AuNPs

Se han realizado modificaciones de partículas de sílice con distintos agentes silanos con el fin de probar su efectividad [41, 46]. Pero como se abordó anteriormente, sólo unos cuantos sirven de referencia para la modificación de partículas de sílice inmersas en cera [17, 34]. En este caso se escogieron los dos métodos más conocidos para modificación superficial: en vapor con APDES y en disolución con APDES, APTES y MPTMS. Las propiedades clave para escoger entre una técnica u otra es la temperatura de ebullición del silano y su volatilidad. Esto se debe a que para la modificación superficial en vapor se realiza un burbujeo en el silano [17] Fig. 3.2. En este caso el APDES presenta una baja temperatura de

ebullición (80 °C) y puede ser utilizado tanto para modificación en vapor como en solución. Por el contrario, para el caso del APTES y el MPTMS esto no es posible debido a sus altas temperaturas de ebullición (165 °C y 213-216 °C, respectivamente).

Cabe recordar que la modificación de partículas de sílice inmersas en cera tiene ciertas restricciones. La primera es que únicamente permite el uso de disolventes polares, puesto que el uso de un disolvente no polar disolvería la cera. Esto ocasionaría desde la exposición de una mayor superficie de las partículas hasta la destrucción de los coloidosomas. La segunda es que tampoco es deseable aumentar la temperatura, ya que esto fundiría la cera ocasionando las mismas consecuencias del punto anterior.

Finalmente, la agitación, que en muchas ocasiones favorece la homogenización de disoluciones y estabilización de sistemas; tampoco es posible puesto que muchas de las partículas que se encuentran sumergidas en la cera se desprenderían de la misma ocasionando grandes pérdidas de material. Para realizar la modificación con estos silanos, se eligieron los lotes J24 a J28 de coloidosomas preparados. Una vez modificadas, se les adsorbieron AuNPs para su visualización en SEM. La Fig. 4.7 corresponde a las mejores imágenes obtenidas en SEM.

Es importante analizar la Fig. 4.7 con cautela dado que existen muchos parámetros que definen tanto la correcta modificación de las partículas como la adsorción de AuNPs. La imagen que resalta más entre las distintas modificaciones es la correspondiente a la Fig. 4.7 (b) en la cual se utilizó la técnica en vapor. La ventaja de la silanización en vapor es que cumple con todas las restricciones impuestas por los coloidosomas. Pero, la modificación superficial puede ser muy pobre como para no conjugar ninguna nanopartícula de oro.

Contrario a la silanización en vapor, la modificación en solución con agentes silanos es comúnmente utilizada para el caso de partículas coloidales [41, 43]. Sin embargo, aunque ha sido ampliamente estudiada, no se tienen establecidos parámetros fijos para una buena modificación superficial de partículas. Esto, aunado al problema que presenta sistema en coloidosomas *per se* complica la silanización de las partículas. Al regresar a la Fig. 4.7 (a), la pobre modificación superficial que se dió con el APDES se enfatiza en solución. A pesar de que existen algunas AuNPs adsorbidas a la superficie, varias de ellas se aglomeran

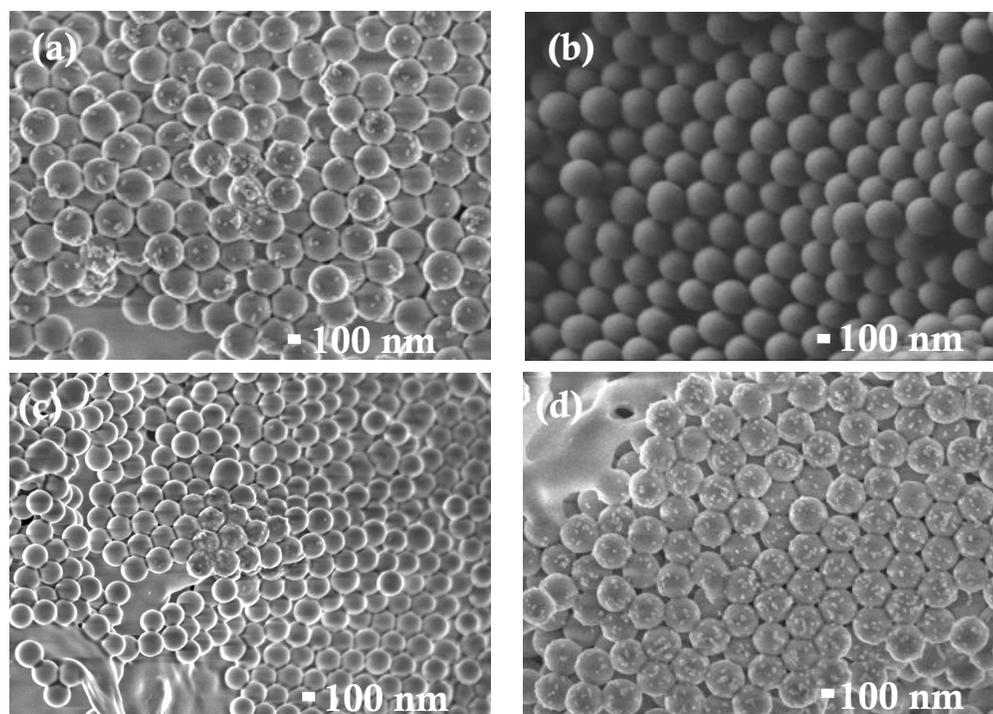


Figura 4.7: Imágenes SEM de modificación superficial de partículas de sílice inmersas en cera (coloidosomas) con diferentes silanos y técnicas (a) APDES en disolución, (b) APDES en vapor, (c) APTES en disolución y (d) MPTMS en disolución.

en ciertas zonas. Lo que indica una modificación no homogénea generando rugosidad en forma de parches en la superficie de la partícula. Esto es muy común en la silanización de superficies y se atribuye principalmente a la aglomeración de moléculas del silano en la superficie [49]. Lo anterior se evita comúnmente mediante un aumento de la temperatura o la disminución de agua en el medio [43, 47, 49].

No obstante el sistema de coloidosomas no permite la variación de estos parámetros. Si se observa ahora la Fig. 4.7 (c), en la cual se utilizó MPTMS como agente silano, la conjugación de AuNPs resulta ser también muy pobre. En esta muestra, es importante mencionar que comúnmente se realiza la conjugación de AuNPs cargadas negativamente con grupos tioles [39] lo cual no se realizó para esta adsorción. Finalmente, se tiene la muestra modificada con APTES Fig. 4.7 (d), la cual muestra una conjugación más uniforme de las AuNPs que es resultado de una modificación homogénea. Aunque, aún no es lo suficientemente densa debido a que existen muchos clústers de AuNPs agregadas y huecos. Por medio de

estos resultados es posible elegir el agente silano más adecuado para la visualización de las partículas anfifílicas con AuNPs. La gran ventaja del APTES es que existen diversos estudios que muestran su estabilidad en ciertos disolventes y su interacción con la superficie de las partículas de sílice [51]. Sin embargo, la silanización de las partículas en coloidosoma restringe ampliamente el estudio de una mejor modificación con el silano por lo que se retrocede un paso al estudio de la modificación completa de partículas de sílice. Los resultados se muestran a continuación.

4.3. Modificación superficial de partículas de sílice con APTES

La visualización de las partículas Janus requiere de un alto recubrimiento del agente visual que se escoja. Una buena modificación superficial de la partícula puede brindar una mayor conjugación del agente visual. De ahí la importancia del estudio de las condiciones de reacción necesarias para obtener la mayor cantidad de grupos disponibles. Como se concluyó en la sección anterior, el APTES es un agente silano ampliamente utilizado y el que demostró una mejor conjugación de AuNPs ante un sistema muy limitado como son los coloidosomas. Entonces, previo a la obtención de partículas anfifílicas se decidió realizar un análisis más detallado sobre la modificación superficial de partículas de sílice con dicho silano. Se conoce que la superficie de partículas de sílice limpias está cubierta con grupos hidroxilos (-OH) enlazados a átomos de silicio conocidos como silanoles.

La molécula de APTES Fig. 2.9 (a) cuenta con tres sitios que potencialmente pueden unirse con los silanoles de la superficie. Sin embargo, cuando hay poca cantidad de agua presente en el medio de reacción no todos los grupos etoxi de las moléculas de APTES son hidrolizados, por lo que algunos restos de estas moléculas pueden encontrarse en la superficie de las partículas después de la silanización. Después de realizar la modificación con APTES se obtienen diferentes estructuras en la superficie de la partícula las cuales están representadas en la Fig. 4.8.

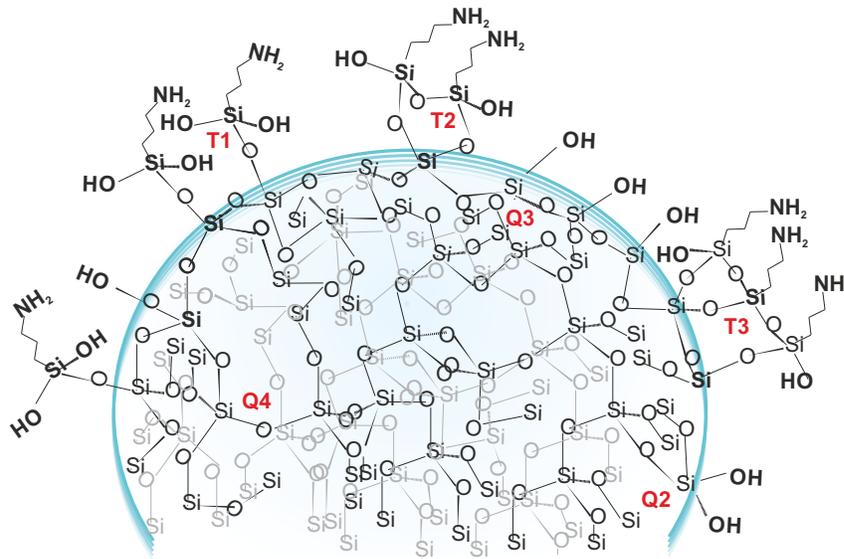


Figura 4.8: Diferentes tipos de átomos de silicio, átomos de silicio unidos a uno, dos o ningún grupo hidroxilo (Q) y tipos de enlace con las moléculas de APTES en la superficie de la partícula (T).

Como consecuencia, las diferentes estructuras obtenidas dan lugar a diferentes tipos de átomo de silicio los cuales pueden distinguirse y/o cuantificarse mediante la técnica de RMN ^{29}Si SPMAS. Con el fin de confirmar que la superficie de partículas de sílice estuviera limpia y evaluar los grupos hidroxilos disponibles se obtuvo el espectro de ^{29}Si RMN SPMAS para partículas limpias no modificadas el cual se observa en la Fig. 4.9.

Principalmente existen dos picos en el espectro de partículas no modificadas. El pico en -112 ppm corresponde al átomo de silicio de tipo Q4 que se encuentra en el bulto de la partícula. El pico en -103 ppm es el átomo de silicio de tipo Q3 unido a un solo hidroxilo y el pequeño hombro en -93 ppm es el átomo de silicio de tipo Q2 unido a dos hidroxilos. Si se toma en cuenta que la intensidad de los picos de los espectros de RMN SPMAS son proporcionales a la cantidad de las especies presentes, es posible concluir que la mayoría de los silanoles son simples (vecinales) con una pequeña fracción de geminales.

A pesar de que la técnica de RMN SPMAS tiene la ventaja de proveer un análisis cuantitativo de las señales, la más grande desventaja es que se requieren largos tiempos de adquisición resultando en un alto costo de experimento. Por lo que la RMN CPMAS $^1\text{H} \rightarrow ^{29}\text{Si}$ o $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ es una alternativa a esta desventaja debido a que esta última técnica mejora la sensibilidad de la baja abundancia natural de los núcleos de ^{29}Si y ^{13}C , los cuales son

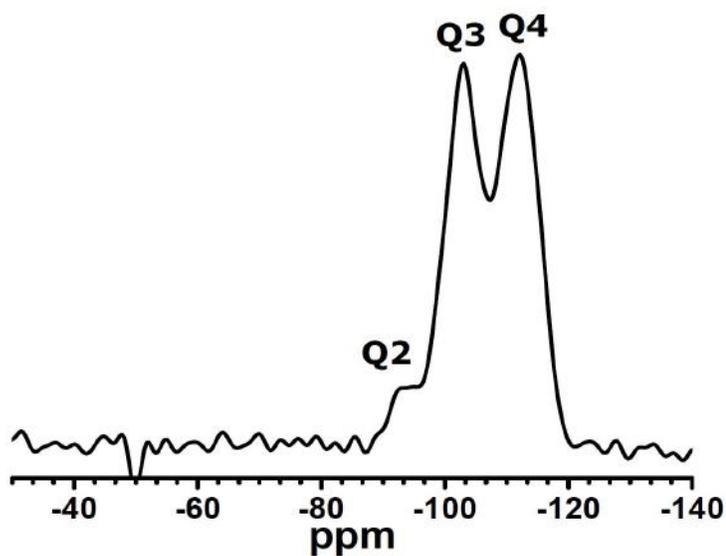


Figura 4.9: Espectro ^{29}Si RMN SPMAS de partículas limpias de sílice. Los picos en -112, -103 y -93 ppm corresponden a los átomos de sílice Q4, Q3 y Q2, respectivamente.

de nuestro interés. No obstante, la técnica consiste en polarizar el átomo que se desea observar a través de los átomos de hidrógeno; y, por esta razón las señales obtenidas en CPMAS son indirectas y no son cuantificables. A pesar de ello, se utilizó esta técnica como primer ensayo para comparar las diferentes modificaciones superficiales de las partículas (Tabla 4.3).

Las condiciones de reacción de Sen & Bruce [47] se escogieron como referencia puesto que reportaron un buen recubrimiento superficial. De este modo, se mantuvo una temperatura de reacción de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 5 h como tiempo de reacción para todas las muestras excepto para SA3 en la cual se disminuyó la temperatura a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se incrementó el tiempo de reacción a 24 h. Con el fin de reproducir las condiciones de reacción de la Ref. [47]; la muestra SA1 fue enjuagada adicionalmente con una mezcla de ácido acético glacial y metanol. Para la muestra SA4 la mezcla etanol/tolueno fue preparada 1:9 en volumen. En el caso de las condiciones secas (SA4 seco) la muestra recibió un pretratamiento de secado a $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h.

Es importante mencionar que las partículas previo a la silanización en la Fig. 4.9 presentaron los mismos picos en ^{29}Si que en la Fig. 4.10 y no mostraron ningún pico en el espectro

Muestra	Síntesis	Radio (nm)	% PD	A_p (m^2)	m_p (mg)	m_s (g)	m_s/A_p (g/m^2)	Disolvente	T (°C)	t_r (h)
SA1	S3-S5	164.9	7.6	1.36	150	0.600	0.44	tolueno	50	5
SA2	S3-S5	164.9	7.6	1.36	150	0.600	0.44	etanol	50	5
SA3	S6	310	5.6	0.73	200	0.097	0.10	etanol	25	24
SA4	S9	146.4	7.3	1.54	150	0.600	0.39	etanol/tolueno	50	5

Tabla 4.3: Condiciones de reacción utilizadas para la funcionalización con grupos amino de partículas de sílice. La segunda columna se refiere al número de síntesis de partículas de sílice obtenidas mediante el método de Stöber [37], % PD corresponde al índice de polidispersidad, m_p corresponde a la masa total de partículas, m_s es la masa de silano utilizada, m_s/A_p es la masa de silano por área total de partículas, T es la temperatura de reacción y t_r el tiempo de reacción.

de ^{13}C Fig. 4.11 Esto es una prueba de que la superficie de las partículas previo a la modificación se encontraban completamente limpias.

La intensidad del pico Q3 es ahora más alta que Q4 debido a la polarización de la fracción de $(SiO_3)-Si-OH$ comparado a la de SiO_4 . Este mismo principio aplica para el estudio de todas las muestras. La primera muestra (SA1) fue modificada en tolueno puro de acuerdo a la Ref. [47].

Con el fin de dispersar las partículas hidrofílicas en tolueno se utilizó Triton X100 como es sugerido por los autores. De acuerdo a los espectros en la Fig. 4.10, no se observa ningún pico que corresponda a otra especie más que a la de la sílice pura en el espectro de ^{29}Si . Por esta razón, fue necesario obtener espectros de ^{13}C que permiten visualizar los núcleos de carbono correspondientes a la molécula del APTES Fig. 4.11. En dichos espectros, se observan dos picos en 17 y 63 ppm, los cuales corresponden a los átomos de carbono de los grupos etoxi de la molécula de APTES o del etanol. La presencia de estos grupos indica una pobre hidrólisis del silano. Aparentemente, el agua adsorbida a la superficie de la partícula no fue suficiente para comenzar la hidrólisis del silano lo cual restringió la modificación química. Lo más probable es que el silano se encuentre únicamente adsorbido físicamente en la superficie de la partícula interactuando con los grupos hidroxilo mediante

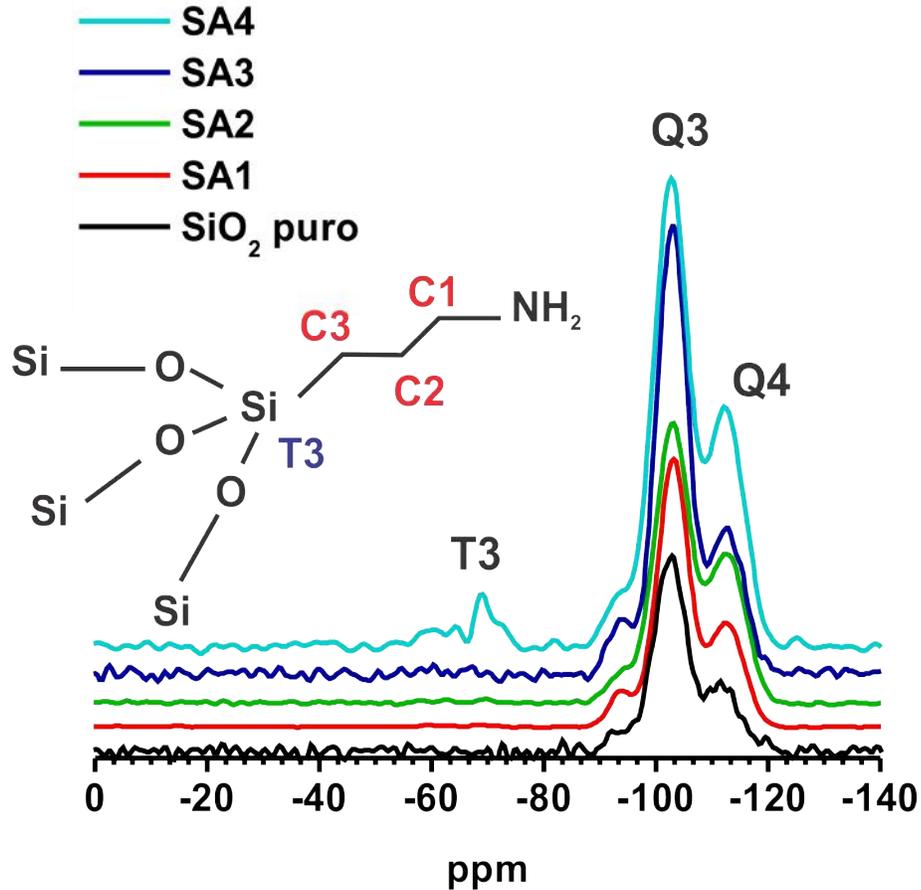


Figura 4.10: Espectros ^{29}Si CPMAS de partículas de sílice modificadas bajo diferentes condiciones. La asignación de los picos sigue la numeración de la Fig.4.8. El recuadro insertado representa la asignación de los átomos de carbono y silicio en la molécula de APTES.

puentes de hidrógeno. Esta interacción, junto con las señales del metanol (usado para los lavados de la partícula) se ve reflejada en el pequeño pico en 52 ppm [86].

Hay algunos indicios de los picos correspondientes a los átomos C1-C3 de la cadena de APTES, sin embargo, éstos se encuentran muy cerca del ruido como para hacer una conclusión contundente. Una observación importante durante la modificación de esta muestra es que debido a la alta afinidad hidrofílica de las partículas, éstas no se dispersaron completamente en tolueno aún después de la adición de una alta cantidad de Triton X100 (5 g). Por tanto, aún si todo el APTES hubiera hidrolizado, resultaría extremadamente difícil obtener una modificación superficial homogénea debido a la severa agregación de las partículas. Además, incluso después de varios ciclos de lavado, aún quedaron residuos de tensoactivo en la superficie de la partícula. Esto se ve reflejado en el pequeño pico a 72 ppm.

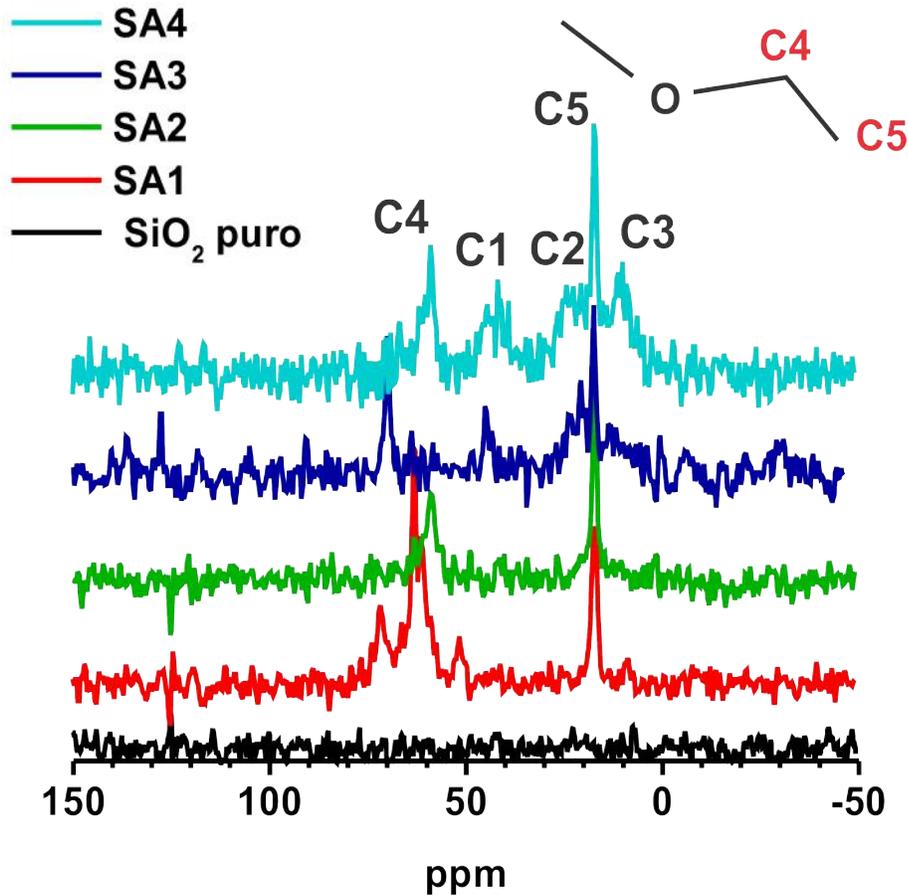


Figura 4.11: Espectros ^{13}C CPMAS de partículas de sílice modificadas bajo diferentes condiciones. El recuadro insertado representa la asignación de los átomos de carbono en los grupos etoxi. Dadas estas razones, es posible concluir que el método escogido como referencia no funcionó de la forma esperada para nuestras partículas.

En la siguiente modificación se decidió cambiar a un disolvente con mayor polaridad para evitar la agregación de las partículas. También se realizó con el fin de tener una referencia de la modificación superficial en coloidosoma. Por lo que la muestra SA2 fue modificada en las mismas condiciones que SA1 pero utilizando etanol como disolvente. Desafortunadamente, la modificación resultó peor que SA1 porque los espectros de ^{13}C CPMAS mostraron únicamente los picos correspondientes a los carbonos de los grupos etoxi. Estos picos se atribuyen a etanol química o físicamente adsorbido a la superficie de la partícula [86]. A pesar de que el etanol es un buen disolvente para el APTES, es conocido que la tasa de hidrólisis del silano es acelerada en etanol más que en tolueno.

Esta rápida hidrólisis también promueve la auto-condensación del APTES en el bulto reduciendo su contenido en la superficie. Otra razón por la cual se da una pobre modificación es la fuerte interacción entre el etanol y los grupos hidroxilo de la superficie de la sílice obstruyendo las interacciones entre el silano y la sílice y favoreciendo su condensación sobre la superficie [47, 86].

Con el fin de detener la policondensación del APTES en el bulto, en la muestra SA3 se disminuyó la concentración del silano por área total de partículas, así como la temperatura de reacción de 50 °C a 25 °C. Para compensar la esperada disminución de modificación superficial, el tiempo de reacción se aumentó de 5 a 24 h. El espectro de ^{13}C RMN en la Fig. 4.11 demuestra que la modificación mejoró respecto a la muestra SA2. Además los picos correspondientes a los tres carbonos del APTES (C1-C3) aparecen en 10, 20 y 42 ppm. A pesar de ello, en el espectro de ^{29}Si no se observa ningún pico más que aquellos de la sílice limpia. Este hecho en conjunto con los pequeños picos en el espectro de ^{13}C permite concluir que la modificación de las partículas se llevó a cabo de manera correcta pero la densidad superficial de grupos amino en la superficie fue muy baja. Sin embargo, estas condiciones pueden ser útiles en algunos casos cuando no es posible utilizar un disolvente no polar, por ejemplo, en los colidosomas. Si recordamos la modificación superficial de colidosomas de la sección anterior 4.3, esto comprueba la pobre modificación superficial de las partículas con los agentes silanos, así como la baja conjugación de AuNPs.

De acuerdo a las observaciones realizadas en los resultados precedentes, se optó por combinar las ventajas del disolvente polar y no polar. De este modo, la muestra SA4 fue modificada bajo las mismas condiciones que SA1 y SA2 pero en una mezcla de etanol/tolueno (1:9 v/v). Como se puede observar en el espectro de ^{13}C , todos los picos correspondientes al APTES aparecen de manera pronunciada. Las especies etoxi aún aparecen, lo cual puede ser el resultado de la reacción de intercambio entre los grupos hidroxilos de la sílice y etanol o de una hidrólisis incompleta del APTES por la falta de agua. A pesar de la presencia de estos grupos etoxi, el espectro de ^{29}Si también confirma la eficiente modificación mostrando un nuevo pico en -69 ppm y otro en -60 ppm correspondientes a los átomos de silicio de tipo T2 y T3, respectivamente.

Existen varias razones por las que en la muestra SA4 se logró una reacción exitosa entre el APTES y la sílice. Primero, dado que la mayoría del disolvente es no polar, la hidrólisis del APTES disminuye y su policondensación en el bulto es impedida. Esto permite que la mayor parte del silano se localice cerca de la superficie de la partícula, donde la concentración de etanol es mayor (el etanol tiene mayor afinidad a los grupos hidroxilo que a las moléculas de tolueno). Esto incrementa la probabilidad de las moléculas de APTES para enlazarse a la superficie de la partícula. Segundo, la alta temperatura mejora la movilidad de la capa de etanol superficial así como de las moléculas de APTES, mejorando así la oportunidad del silano a reaccionar con la superficie. Finalmente, una pequeña cantidad de etanol ayuda significativamente a dispersar las partículas hidrofílicas de sílice mejorando la disponibilidad de toda la superficie de cada partícula para su modificación.

Es conocido que la presencia de agua en la mezcla de reacción induce la formación de multicapas de APTES, donde las moléculas de capas superiores interactúan vía puentes de hidrógeno con la primera capa. Por esta razón, se desarrolló un experimento adicional para eliminar la influencia de agua así como la posibilidad de la formación de multicapa. Se repitió la modificación de las partículas en la misma forma que para la muestra SA4 con la diferencia de que tanto las partículas como los disolventes se secaron previo a la modificación. Los espectros de RMN CPMAS de esta última muestra no se llevaron a cabo con el fin de explorar otros métodos que permitieran una verdadera cuantificación de la densidad de grupos amino. Principalmente, se buscaron opciones más económicas, rápidas, y reproducibles.

4.4. Densidad superficial de grupos amino

La cuantificación de la densidad de grupos amino en la superficie de micro y nanopartículas de diferentes materiales, incluyendo la sílice, ha presentado ciertos retos debido a la mínima cantidad que se encuentra en ellas como se discutió en la sección 2.6.2. Por esto se requirió el uso de técnicas con mayor sensibilidad.

4.4.1. Ensayo fluorimétrico con fluorescamina

El primer método es por fluorimetría en el cual se liberan los grupos amino mediante la disolución de las partículas y posteriormente se hacen reaccionar con un fluorescamina que da lugar a un compuesto fluorescente [44]. Los espectros recolectados para la curva de calibración se observan en la Fig. 4.12 (a), la máxima intensidad de fluorescencia se observa en $\lambda = 480$ nm, tal como lo mencionan los autores. La curva de calibración correspondiente a estos espectros leídos en el máximo de intensidad de fluorescencia se muestra en la Fig. 4.12 (b).

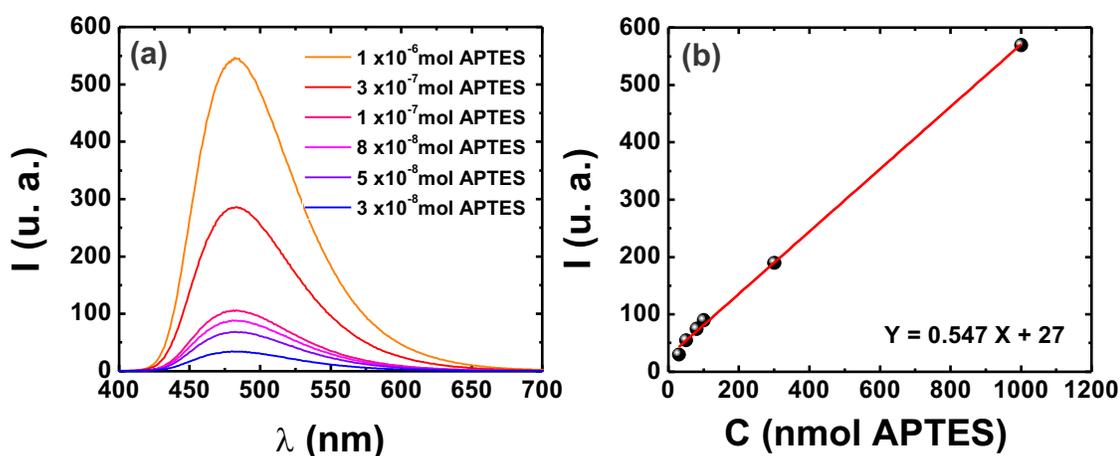


Figura 4.12: (a) Espectros de emisión de fluorescamina a diferentes concentraciones de APTES tras excitación a $\lambda_{exc} = 365$ nm. (b) Curva de calibración para fluorescamina leído a $\lambda = 480$ nm.

Los espectros recolectados de cada muestra tras la reacción con fluorescamina se observan en la Fig. 4.13. Los espectros para las muestras SA2 -SA4 verifican que el tiempo de reacción para la funcionalización con grupos es clave, siendo la muestra SA3 la que provee la menor cantidad de grupos amino. Por otra parte, el disolvente juega un papel importante, ya que a pesar del incremento en el tiempo de reacción la funcionalización de la muestra SA2 es inferior a SA4, aunque no es tan baja.

Se observa también que la muestra SA4 reproducida bajo condiciones secas, favorece la funcionalización superficial de las partículas gracias a la autocatálisis de las moléculas de APTES. Si se compara la intensidad de fluorescencia de SA4 en condiciones secas contra SA2 la diferencia es grande, sin embargo, no es tan lejana a la muestra SA4. Los grupos amino del APTES pueden ser tanto enlaces de hidrógeno o protonados por silanoles ácidos

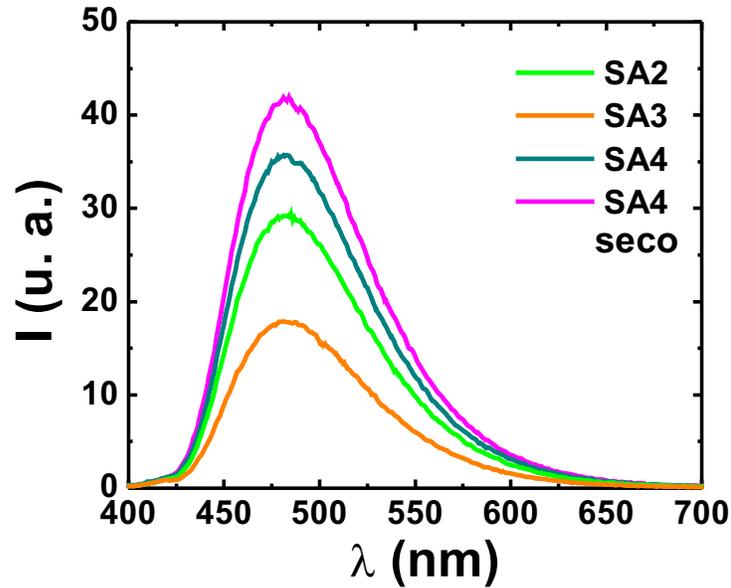


Figura 4.13: Espectros de emisión de fluorescamina después de reaccionar con los grupos amino de las muestras.

en la superficie de la sílice [43]. Sin embargo, la condensación del silano con la superficie puede ocurrir con la posterior formación del enlace covalente. Este proceso es conocido como mecanismo de desdoble [87, 88]. En la presencia de agua adsorbida a la superficie, este mecanismo es impedido; mientras que en una superficie seca es más favorable. De este modo, el recubrimiento total bajo condiciones secas es mayor, aunque una desventaja de éste método es que resulta más laborioso y costoso.

A pesar de que los espectros en la Fig. 4.13 nos brinda información importante sobre las mejores condiciones de funcionalización, el fin de este experimento es realizar una comparación de manera cuantitativa. En la Tabla 4.4 se muestra el cálculo en nmol de los grupos amino presentes y su densidad respecto al área de partículas. El cálculo del número de grupos amino existentes no es tan trivial ya que es necesario realizar algunas asunciones.

Si se considera que una molécula de APTES se enlaza a un máximo de tres grupos hidroxilo en la superficie de la partícula, teóricamente, el recubrimiento máximo de superficie será de 1.25 - 2.0 moléculas de APTES por nm^2 (si se toma como referencia que la densidad de grupos hidroxilo es de 4-6 OH/nm^2) [89]. La comparación de los valores experimentales con los valores máximos estimados elimina la posibilidad de formación de multicapa,

Muestra	Concentración total de grupos amino (nmol)	Densidad total de grupos amino (nmol/m ²)	Densidad total de grupos amino (-NH ₂ /nm ²)	Porcentaje de recubrimiento %
SA2	44.16	709.50	0.44	35
SA3	29.38	472.07	0.29	24
SA4	62.87	1010.18	0.63	50
SA4 seco	85.68	1376.55	0.86	69

Tabla 4.4: Cuantificación de grupos amino totales por área de partícula calculados a partir de la curva de calibración de la Fig. 4.13. Para el cálculo porcentual, se consideró una densidad total teórica de grupos amino de 1.25 NH₂/nm².

ya que el máximo valor correspondiente a la muestra SA4 en condiciones secas presente 0.86 moléculas por nm². Finalmente es posible obtener el porcentaje de recubrimiento comparando la cantidad de grupos amino presentes respecto al valor teórico de máxima funcionalización (1.25 -NH₂/nm²).

Es importante mencionar que lograr el recubrimiento total de las partículas es difícil según un estudio previo [88]. El problema es que sólo algunos grupos amino del APTES que forman enlaces de hidrógeno con los silanoles de la superficie pueden autocatalizar la condensación con la formación del posterior enlace covalente. Y de estas moléculas, alrededor del 32 % no logran desdoblarse y permanecen únicamente adsorbidas físicamente a la superficie. Por ende, estas moléculas son fácilmente eliminadas de la superficie durante los ciclos de lavado lo que da resultado a que sólo el 68 % restante se encuentre covalentemente unido. Si se toma en cuenta este hecho, la modificación superficial de SA4 y SA4 bajo condiciones secas puede ser considerada como satisfactoria ya que se obtuvo un recubrimiento total del 50 % y 69 %, respectivamente.

4.4.2. Ensayo colorimétrico con 4-Nitrobenzaldehído

Para evitar la destrucción de las partículas de sílice se siguió un segundo método que incluye la formación de una imina a partir de un compuesto sensible a la luz UV. Un detalle muy importante a cuidar durante la reacción es la cantidad de agua presente al inicio, ya que es una reacción reversible y si existe una cantidad inicial de agua, la cuantificación puede no ser completamente correcta. La Fig. 4.14 muestra la curva de calibración realizada para este experimento, aunque el máximo presenta un ligero desplazamiento $\lambda = 270$ nm en nuestro caso contra $\lambda = 280$ nm reportado en la Ref. [76]. Aunque existen otros estudios que muestran el máximo de absorbancia de estos espectros en 270 nm [90]. Por lo que se utilizó este valor para la lectura del sobrenadante de 4-NBA que reaccionó con partículas modificadas en espectros posteriores de 4-NBA Fig. 4.15.

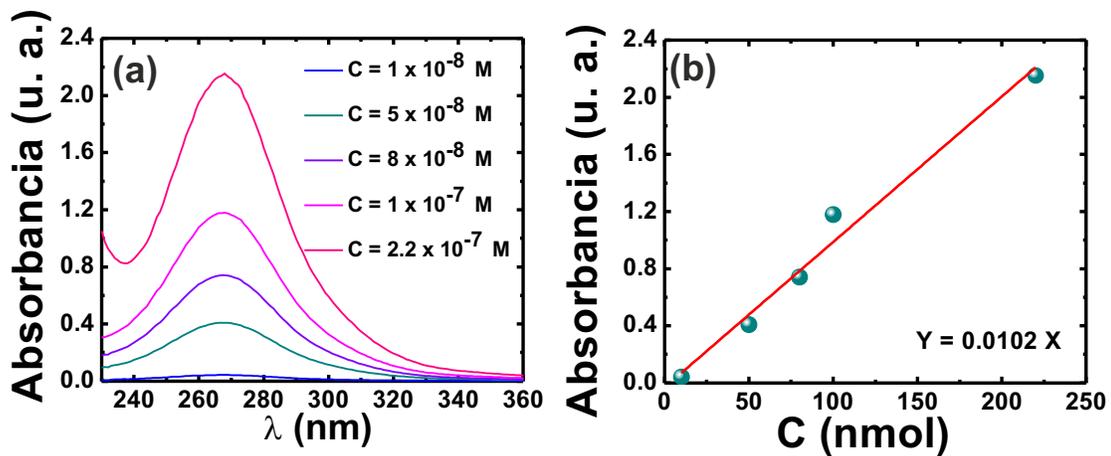


Figura 4.14: (a) Espectros de absorción de distintas concentraciones de APTES en disolución de hidrólisis. El máximo de absorbancia se lee en $\lambda = 270$ nm. (b) Curva de calibración realizada con los espectros obtenidos en (a).

A pesar de que es posible observar una tendencia en la Fig. 4.15 (a) la señal de 4-NBA que debería observarse en 270 nm se desvanece y aparece una señal en 240 nm. Esta última señal puede deberse a un desplazamiento de la señal principal, además de que las señales tampoco se encuentran bien definidas. Dado que en este ensayo las partículas son sedimentadas, la baja definición de la señal puede ser producto de una pequeña cantidad de partículas presentes en el sobrenadante. Por lo que se decidió filtrar las muestras para

evitar la dispersión de la luz causada por las partículas. En la Fig. 4.15 (b) se observa una notable mejora en los espectros aunque aún se observa un desplazamiento del máximo de la intensidad de la señal. No obstante para la comparación de las muestras se realiza la lectura a 270 nm.

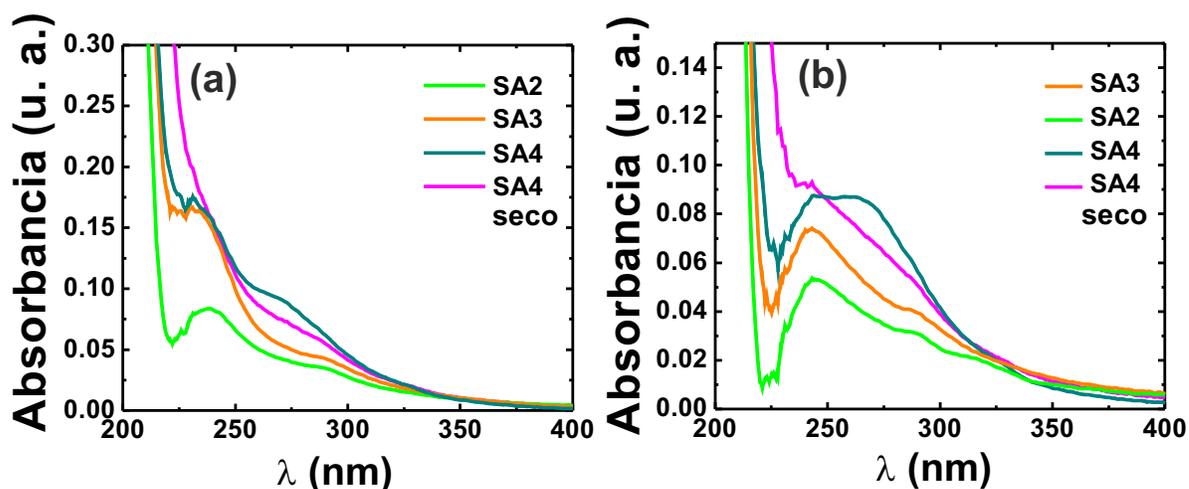


Figura 4.15: Espectros de absorción del sobrenadante con 4-NBA después de reaccionar con los grupos amino de las muestras (a) sin filtrar (b) después de filtrar.

La Tabla 4.5 concentra la información sobre la cantidad de grupos amino disponibles respecto a la molécula del 4-NBA. Si comparamos esta información con la obtenida respecto a la fluorescamina Tabla 4.4, se observa una gran disminución de los grupos amino que finalmente reaccionan con otra molécula. Esto posiblemente debido a que algunas moléculas de APTES se encuentran únicamente adsorbidas en la superficie interactuando con los silanoles en ella. También, a pesar de la alta cantidad de grupos amino que puede haber en la partícula como en la muestra SA4 en condiciones secas, el tamaño del 4-NBA puede ocasionar impedimento estérico entre grupos aminos.

Otra observación importante es respecto a las muestras SA4 y SA4 seco, que aunque la diferencia de recubrimiento total de grupos amino es cerca de un 20 %, para la disponibilidad a reaccionar se reduce a una diferencia de tan sólo el 6 %, lo cual indica que si bien el recubrimiento en las condiciones secas es alto de acuerdo al ensayo fluorimétrico, no todos los grupos amino se encuentran disponibles para reaccionar y dependen de la naturaleza del compuesto que también se desee conjugar. Sin embargo, una diferencia

Muestra	Concentración disponible de grupos amino (nmol)	Densidad disponible de grupos amino (nmol/m ²)	Densidad disponible de grupos amino (-NH ₂ /nm ²)	Porcentaje de disponibilidad %
SA2	8.33	133.82	0.08	19
SA3	9.87	158.60	0.10	34
SA4	12.5	201.47	0.13	20
SA4 seco	12.2	195.60	0.12	14

Tabla 4.5: Cuantificación de grupos amino disponibles por área de partícula calculados a partir de la curva de calibración de la Fig. 4.14. El cálculo porcentual se realizó con base en la densidad total de grupos amino de la Tabla 4.4.

importante entre los métodos es que la modificación de SA4 seco requiere de una mayor cantidad de material y cuidado respecto a la modificación de la forma SA4. Por esta razón se recomienda utilizar un método más sencillo. La cantidad de 4-NBA enlazado se calcula de 7.8×10^5 moléculas/partícula o 0.13 moléculas/nm². El cálculo se detalla en el Anexo B. Este estudio brinda información importante acerca de la conjugación de nuevas moléculas a la superficie silanizada de las partículas. No obstante, la reacción con 4-NBA no se recomienda hasta este punto para la cuantificación rigurosa. La primera razón, es el cuidado que debe tenerse al momento de llevar a cabo la reacción. Como se mencionó en la sección 2.6.3, la reacción debe llevarse a cabo bajo condiciones anhidras. Ya que la existencia de trazas de agua puede ocasionar la formación prematura del precursor (4-NBA). Esto es un gran problema, ya que la reacción genera agua *per se* y si ésta no es eliminada continuamente, puede haber errores en la cuantificación de los grupos amino ya que la cantidad de moléculas de 4-NBA hidrolizadas de vuelta disminuirá. Además se observó experimentalmente tanto un desplazamiento, como un ensanchamiento en el máximo de absorbancia. Lo cual, en parte puede deberse a la presencia de partículas en el medio, pero no se descarta la presencia de algún otro compuesto. La ventaja, empero, es que es un método no destructivo e indica que la conjugación de cualquier molécula a los grupos amino requiere un estudio cuidadoso.

4.5. Estudio de las condiciones de conjugación con Rodamina B Isotiocianato (RBITC)

4.5.1. Microscopía Óptica Confocal (MOF)

Dado que una de las formas de visualización de partículas Janus es mediante microscopía de fluorescencia, se decidió realizar un estudio previo para encontrar las condiciones de reacción que otorgaran la mayor intensidad de fluorescencia de las partículas. La muestra SA4 fue escogida para el estudio de conjugación de la RBITC como función de la concentración y tiempo de reacción.

La proporción de cantidad de partículas modificadas respecto a la cantidad de RBITC utilizada para su decoración rige la cantidad final de cromóforo que quedará conjugado en la superficie de la partícula y por tanto su intensidad de fluorescencia final. Podría pensarse que tan sólo un poco de exceso de RBITC de acuerdo a la cantidad estequiométrica necesaria para conjugar todos los grupos aminos conduciría a una mayor fluorescencia. Sin embargo, estudios previos demuestran que la cantidad de RBITC requerida para tener una notable conjugación resulta ser mucho mayor de lo que se cree [91]. Por esta razón, lo ideal es encontrar que la relación de esta proporción sea la menor posible ya que la RBITC si bien, es un compuesto ampliamente utilizado tiene un alto valor en el mercado.

Para elegir la cantidad óptima de este cromóforo se modificaron 4 sets de 10 mg de partículas de sílice de 3 μm en la misma forma que SA4. Posteriormente, cada set se conjugó con una cantidad diferente 5, 10, 30 o 100 mg de RBITC en 20 mL de etanol absoluto. El tiempo de reacción se fijó a 48 h para todas las muestras.

La Fig. 4.16 muestra las imágenes adquiridas mediante MOF, donde las partículas más brillantes corresponden a la mayor cantidad de tinte utilizado. De acuerdo a la Fig. 4.17 se puede verificar que la intensidad de fluorescencia tiene una variación proporcional respecto a la concentración de RBITC utilizada. Este resultado es esperado puesto que una mayor presencia de moléculas de RBITC en el medio se encuentra disponible para reaccionar e incluso adsorberse a la superficie de las partículas.

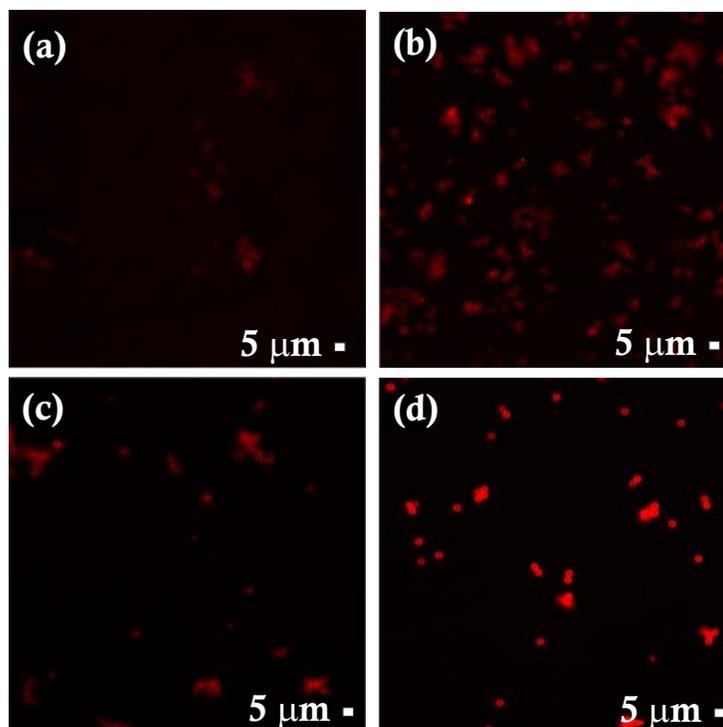


Figura 4.16: Imágenes de partículas de sílice decoradas con RBITC vistas en MOF a diferentes concentraciones (a) 5 mg (b) 10 mg (c) 30 mg y (d) 100 mg.

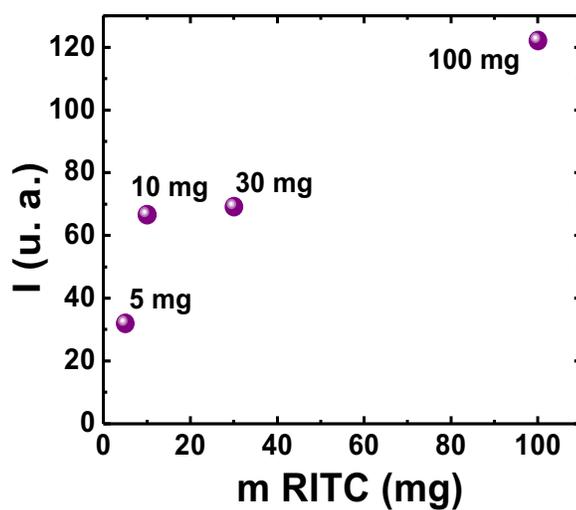


Figura 4.17: Intensidad de fluorescencia de las partículas vistas en MOF como función de la concentración de RBITC utilizado en la síntesis.

Si ahora observamos las imágenes obtenidas mediante MOF, se podría bien elegir a la muestra con mayor concentración de RBITC que es la que otorga una mayor fluorescencia. Por otra parte, de esta misma serie de imágenes podría descartarse la muestra de 5 mg en la cual no se tiene una buena apreciación de las partículas. No obstante, para realizar este estudio las condiciones para la adquisición de imágenes del microscopio se mantuvieron igual para todas las muestras. Por lo que la variación de los parámetros de adquisición de imagen del microscopio puede mejorar la visualización de la muestra. En la Fig. 4.18 se comprueba que al variar los parámetros de adquisición del microscopio es posible mejorar notablemente la visualización de la muestra, incluso la muestra que en la Fig. 4.16 (a) demostraba no tener una gran intensidad de fluorescencia. Por esta razón, se decidió utilizar la menor cantidad de RBITC para las siguientes etapas de estudio.

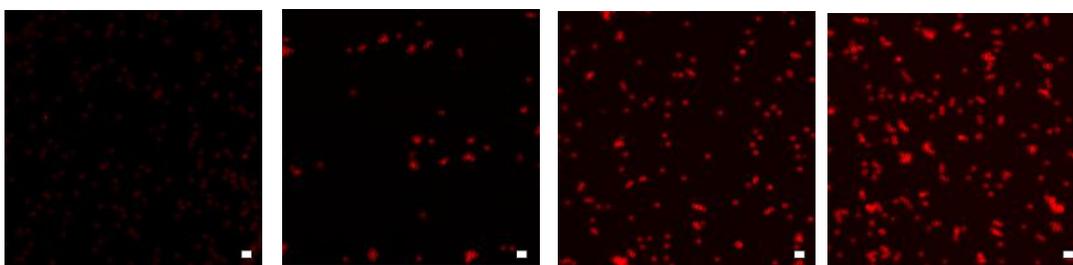


Figura 4.18: Visualización en MOF de muestra con 5 mg de RBITC variando las condiciones de adquisición del microscopio. Barras de escala = 5 μm .

Como se mencionó, la intensidad de fluorescencia de las partículas se rige por varios aspectos, y como recién se observó, la concentración es uno de ellos. Después de ajustar la cantidad de RBITC a utilizar para aún obtener una buena intensidad de fluorescencia para visualizar mediante MOF, se decidió ajustar el tiempo de reacción de la RBITC con las partículas. Para esto, se modificaron partículas con diámetro de 1 μm en la misma forma que SA4 manteniendo la proporción de 0.44 $\text{g}_{\text{APTES}}/\text{m}^2$ y después se hicieron reaccionar con 5 mg de RBITC en etanol a diferentes tiempos de reacción.

La visualización de las partículas en MOF y sus respectivos tiempos de conjugación se muestran en la Fig. 4.19. A simple vista puede observarse que a cortos tiempos la intensidad de fluorescencia es baja. A medida que aumenta el tiempo de conjugación, la intensidad de fluorescencia de las partículas crece; pero a tiempos largos de reacción la fluorescencia-

cia decae nuevamente. Lo anterior puede corroborarse incluso en el color rosado de las muestras en la Fig. 4.20, en la cual los tiempos 24 y 32 h tienen un color más pronunciado.

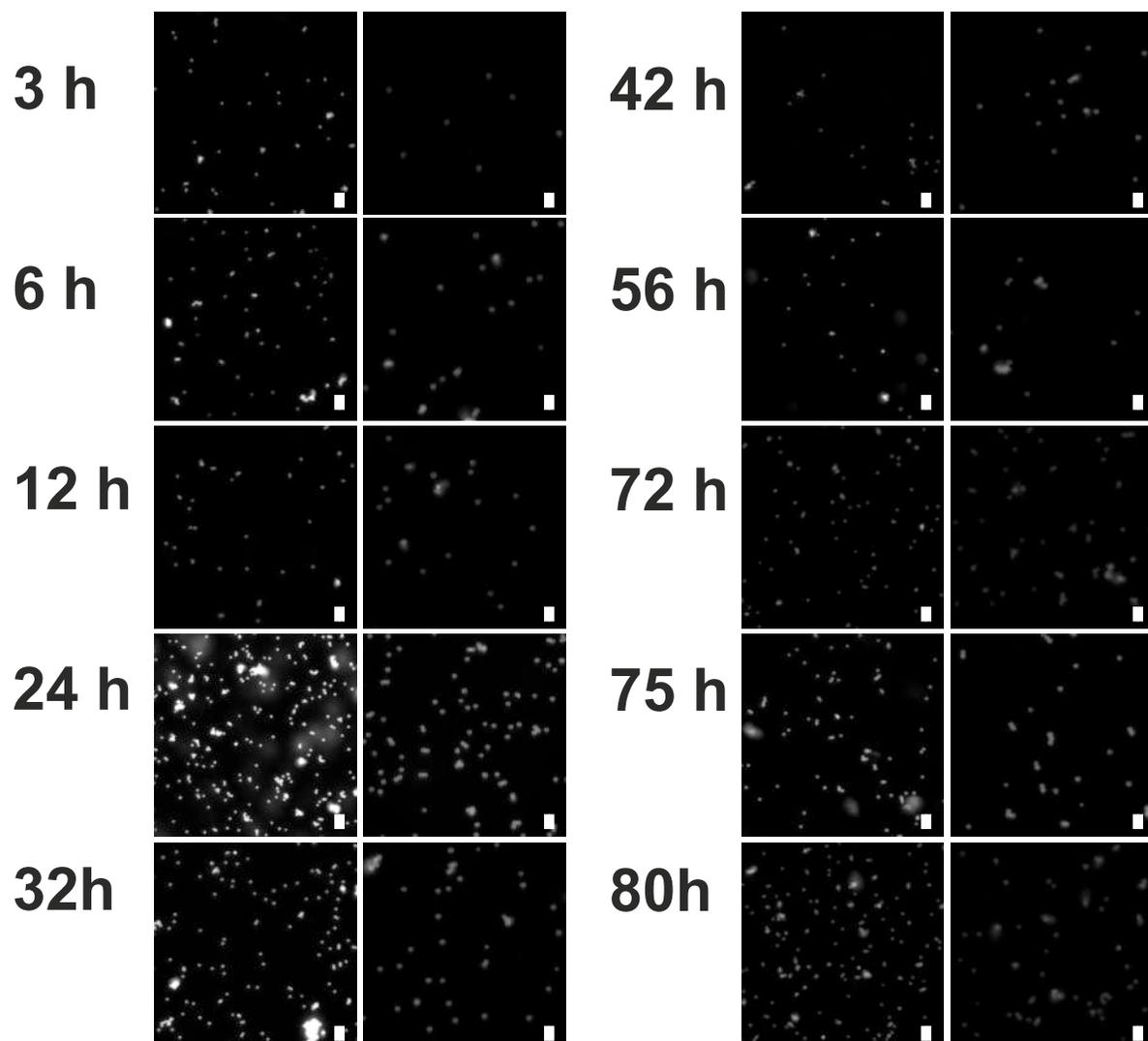


Figura 4.19: Intensidad de fluorescencia de las partículas vistas en MOF como función del tiempo de reacción con RBITC. Barras de escala = 6 μm .

Para corroborar esta tendencia se utilizó el programa ImageJ que cuantifica el valor promedio de escala de grises (el uso del programa se describe en el Anexo A) de las imágenes obtenidas en MOF Fig. 4.21. Este gráfico permite verificar una tendencia que primero incrementa con el tiempo de reacción hasta 24 h y posteriormente decae con un pequeño pico a 75 h. Aunque existen variaciones en la intensidad, es posible apreciar el máximo de intensidad a 24 h.

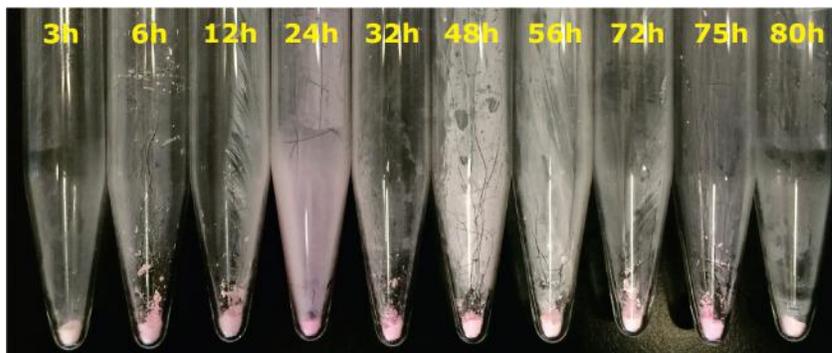


Figura 4.20: Fotografía de las partículas modificadas, la variación en la intensidad del color rosa se debe a las diferentes cantidades de RBITC conjugada. A simple vista se aprecia una mayor intensidad entre 24 y 32 h.

Esto es importante y sorprendente porque lo esperado es que el aumento en el tiempo de reacción favorezca el enlace de una mayor cantidad de moléculas de RBITC a la superficie de la partícula, y como resultado, obtener una mayor intensidad de fluorescencia.

Existen dos posibles razones que pueden explicar el efecto opuesto que se observa: i) el cromóforo se desactiva porque existen muchas moléculas unidas a la superficie y ocasionan una fotodesactivación al momento de ser visualizadas ó ii) la concentración superficial del cromóforo disminuye a largos tiempos de reacción y, por tanto su fluorescencia.

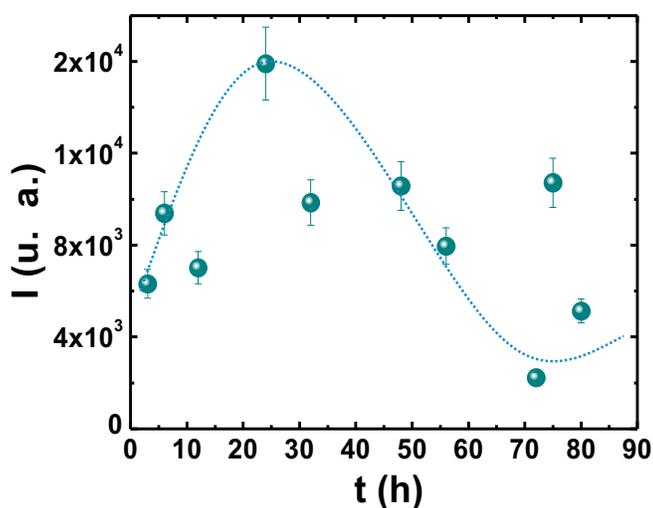


Figura 4.21: Intensidad de fluorescencia de las partículas vistas en MOF como función del tiempo de reacción con RBITC. Las líneas punteadas se colocaron como guía visual.

Desafortunadamente la microscopía óptica confocal no nos brinda la oportunidad de con-

firmar lo que le sucede al cromóforo puesto que esta técnica no cuantifica la cantidad de moléculas de RBITC presentes en las partículas. Por lo que es necesario utilizar otras técnicas como espectroscopía UV-Visible o incluso de fluorescencia en los casos donde la concentración es muy baja. Una alta concentración a largos tiempos de reacción confirmaría una desactivación fluorescente, mientras que si la tendencia se mantiene, indicaría que de algún modo la cantidad de moléculas de RBITC en la superficie de la partícula disminuye.

4.5.2. Espectroscopía de Fluorescencia y UV-Vis

Para revisar las ideas presentadas en la sección anterior, se disolvieron 10 mg de cada muestra en una disolución 1 M de NaOH. Se midió la concentración de la RBITC enlazada al APTES de las partículas modificadas Fig. 4.22 (a) y (d), que probablemente tendría un grupo hidroxilo en vez de un átomo de silicio debido a su desacomplamiento de la partícula y posterior hidrólisis en la disolución de NaOH. Para verificar que la formación de Na_2SiO_3 no modificara la solubilidad de la RBITC y su fluorescencia, se realizó también la curva de calibración de la RBITC en NaOH 1 M con partículas de sílice disueltas en una concentración de 2 mg/mL, dicha concentración de partículas es igual a la concentración de las muestras Fig. 4.22 (b) y (e).

El coeficiente de extinción de la RBITC se calculó a partir de la curva de calibración Fig. 4.22 (c) (rojo) a partir de la ec. 2.10 ($A = \epsilon d C$). Al graficar la absorbancia contra la concentración, la pendiente corresponde a ϵd ; y si $d = 1$ cm se encuentra que el coeficiente de extinción de la RBITC en NaOH 1 M es igual a $5.9 \times 10^6 \text{ (Mm)}^{-1}$ del cual se conoce que depende de la polaridad del medio y del pH, por lo que es diferente más no tan lejano de los coeficientes de extinción encontrados para otros derivados de la rodamina [92]. Asimismo, se calculó el coeficiente de extinción de la curva de calibración con la adición de las partículas de sílice a la disolución de RBITC Fig. 4.22 (c) (verde) que es $6.3 \times 10^6 \text{ (Mm)}^{-1}$, el cual es muy cercano al obtenido previamente en la disolución de hidróxido de sodio sin partículas. Considerando el coeficiente de extinción en presencia de partículas de sílice, se procedió a disolver 10 mg de las muestras en NaOH 1 M. Los espectros recolectados se muestran en la Fig. 4.23.

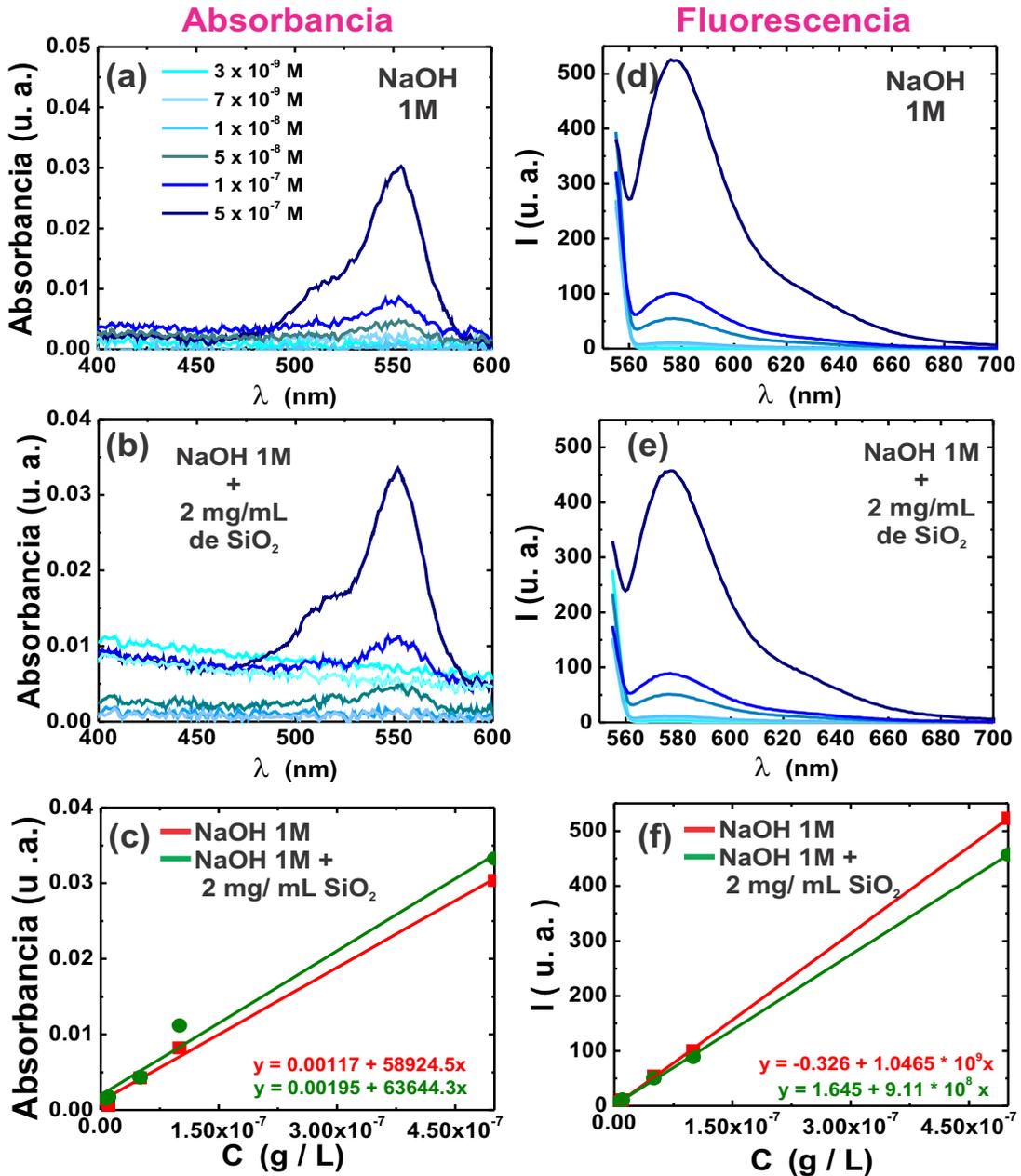


Figura 4.22: Espectros de absorbancia y fluorescencia de RBITC en NaOH 1 M (a) y (d) y RBITC en NaOH 1 M con la adición de 2 mg/mL de partículas de sílice (b) y (e). Curvas de calibración obtenidas a partir de los espectros superiores.

Los valores de concentración para los tiempos de reacción a 24 y 32 h fueron muy altos ocasionando una saturación en la señal de fluorescencia, por lo que no pudieron obtenerse tales curvas. Sin embargo, el cálculo de la concentración de RBITC presente, se realizó utilizando los espectros de absorbancia Fig. 4.24. Se observa que las mediciones tanto de

la absorbancia en UV/VIS y de la emisión de fluorescencia concuerdan con la estimación de la concentración del cromóforo. La concentración sigue muy bien la tendencia obtenida mediante microscopía óptica Fig. 4.21, aumenta hasta 24 h y decae gradualmente.

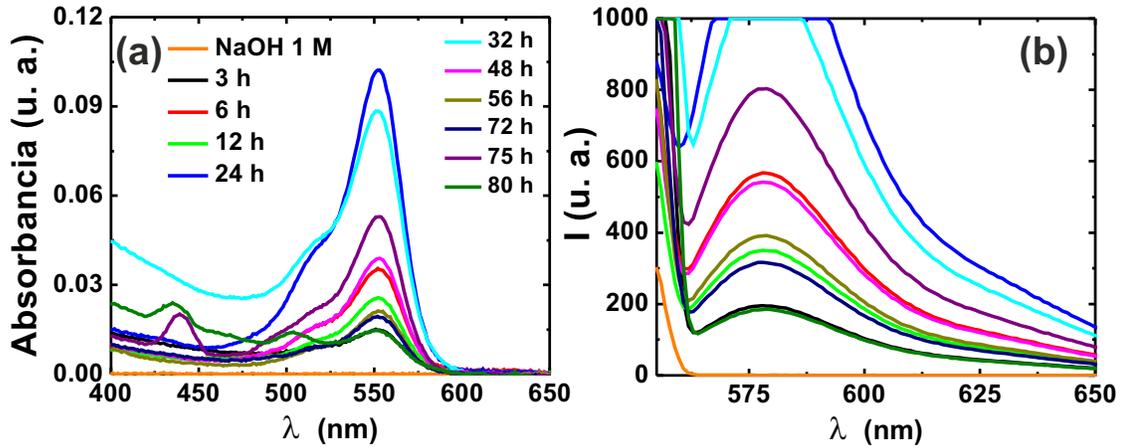


Figura 4.23: Espectros de (a) absorbancia y (b) fluorescencia de partículas de sílice decoradas con RBITC disueltas en NaOH 1 M. Los tiempos corresponden al tiempo de reacción de las partículas con la RBITC y son los mismos para ambos gráficos.

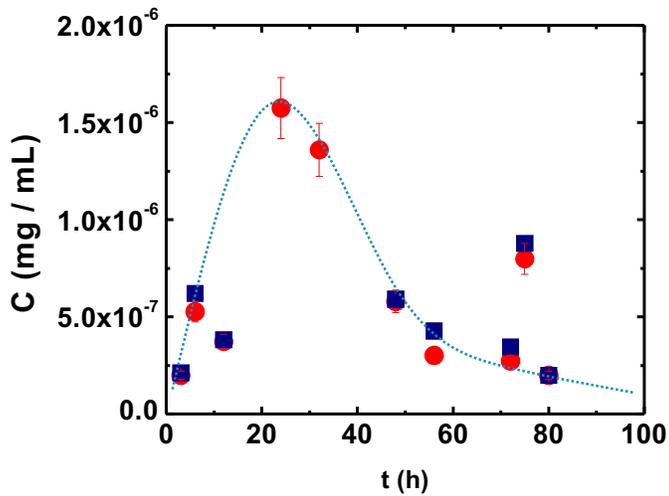


Figura 4.24: Concentración de RBITC en 5 mL de NaOH 1 M después de la disolución de 10 mg de partículas calculado a partir de UV/VIS (círculos rojos) y fluorescencia (cuadros azules). Las líneas punteadas se colocaron como guía visual.

Este resultado elimina la posibilidad de la desactivación de fluorescencia debido a la alta concentración del tinte en la superficie, puesto que la mayor intensidad de fluorescencia corresponde a la mayor concentración de la RBITC en las partículas. Además, el cálculo

de la cantidad de la RBITC enlazada resulta ser de 846 moléculas por partícula o 3×10^{-4} moléculas/ nm^2 (el cálculo se detalla en el Anexo B), por lo que las moléculas están suficientemente separadas y es muy poco probable que desactiven la fluorescencia entre ellas.

De esta forma, resta verificar la segunda idea para explicar tal decaimiento en la intensidad de fluorescencia con el tiempo. Para explorar la posibilidad de una disminución de la concentración del cromóforo en la superficie de la partícula es importante recordar que la fuerte absorbancia en el rango del campo visible de la RBITC es debido a la conjugación del xanteno. Por lo que, una disminución significativa de las señales de absorbancia y fluorescencia pueden ser debido a dos razones: i) el fluoróforo se degrada en el tiempo de manera que la conjugación del xanteno se pierde ó ii) la molécula se mantiene intacta en la parte del xanteno pero se desenlaza de la superficie de la partículas con el tiempo y es posteriormente eliminado durante el lavado de las partículas.

Es bien sabido que muchos fluoróforos tienden a descomponerse bajo ciertas condiciones como pH y temperaturas extremas, luz, exposición al oxígeno, etc. Por lo tanto, se decidió verificar la estabilidad de la RBITC en etanol puro, ya que es el disolvente utilizado en la reacción de conjugación de las partículas.

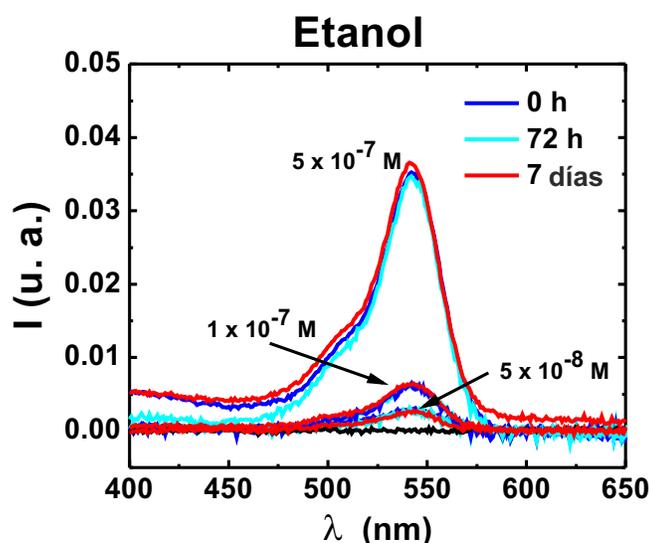


Figura 4.25: Espectros de absorción UV/VIS de RBITC en etanol a diferentes concentraciones en función del tiempo.

También se verificó su estabilidad en pH extremos como NaOH 1 M (pH = 12) y en una pequeña cantidad de HCl 1 M con etanol (pH ~ 2). La Fig. 4.25 muestra los espectros obtenidos para tres concentraciones distintas del cromóforo en etanol puro. No se observa ninguna diferencia notable en los espectros en distintas concentraciones hasta 7 días de disolución del cromóforo en este disolvente. Los espectros tienen la banda de absorción principal en $\lambda_{emi} = 540$ nm.

Posteriormente, se recolectaron los espectros en NaOH 1 M Fig. 4.26 a diferentes concentraciones de RBITC. En este caso se midió al tiempo inicial y después de 7 días que fue el tiempo más largo obtenido para etanol. En esta figura se observa que el espectro de la RBITC no cambia respecto al tiempo aunque su banda de absorción principal sufre un ligero desplazamiento hacia $\lambda_{emi} = 550$ nm. Es común observar este tipo de desplazamientos debido al cambio de la polaridad del medio, lo cual indica pequeños cambios en la transición de electrones.

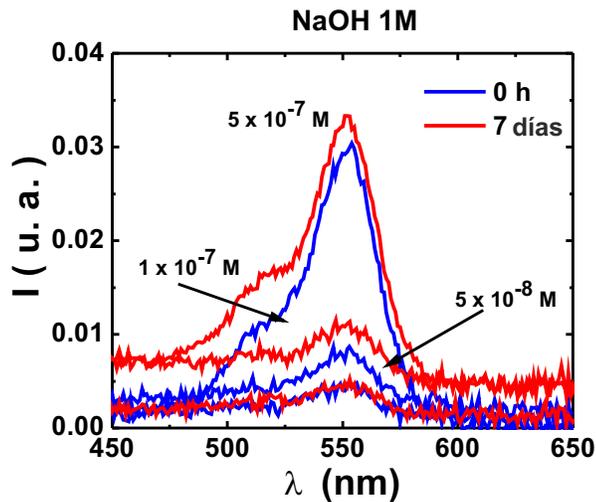


Figura 4.26: Espectros de absorción UV/VIS de RBITC en NaOH 1M a diferentes concentraciones en función del tiempo.

Este desplazamiento es esperado en el caso de la disolución de RBITC en etanol con una pequeña cantidad de HCl 1 M, ya que la fuerza y la concentración del ácido son suficientes para cambiar la polaridad del medio. Tal como se observa en la Fig. 4.27, la banda de absorción principal se observa también en $\lambda_{emi} = 550$ nm.

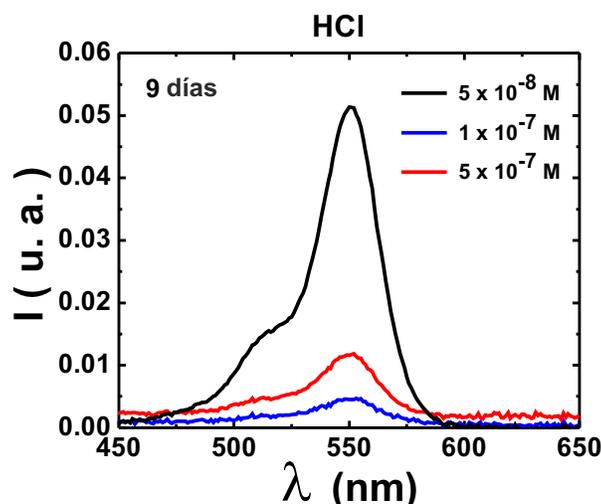


Figura 4.27: Espectros de absorción UV/VIS de RBITC en una disolución de etanol en HCl 500/1 v/v a diferentes concentraciones en función del tiempo.

Lo que es sorprendente de estos espectros es que los picos son completamente reproducibles a lo largo del tiempo. Tampoco se observa la aparición de otras bandas que indiquen una descomposición del xanteno. Por lo que se puede concluir que el fluoróforo es muy estable en todos los medios considerados al menos en el lapso de una semana. Sin embargo, para estudiar a detalle los pequeños cambios en la RBITC (principalmente en la estructura del xanteno), es necesario utilizar una técnica que provea una descripción más detallada y que nos permita al mismo tiempo, monitorear los cambios en la molécula como la RMN en disolución.

4.5.3. Estabilidad de RBITC mediante RMN

Con el fin de confirmar la estabilidad de la estructura del xanteno, se realizaron experimentos de RMN en disolución con etanol- d_6 . Para monitorear un posible cambio en la concentración de la especie principal, se utilizó pireno como estándar interno dentro de un capilar. La predicción sobre los desplazamientos del pireno en espectros de ^1H y ^{13}C realizados a partir del programa MestReNova© se muestran en la Fig. 4.28.

Dado que esta molécula es un compuesto aromático, la mayoría de sus señales se esperan a altos desplazamientos: de 8.00 a 8.20 ppm en ^1H y de 135-120 ppm en ^{13}C .

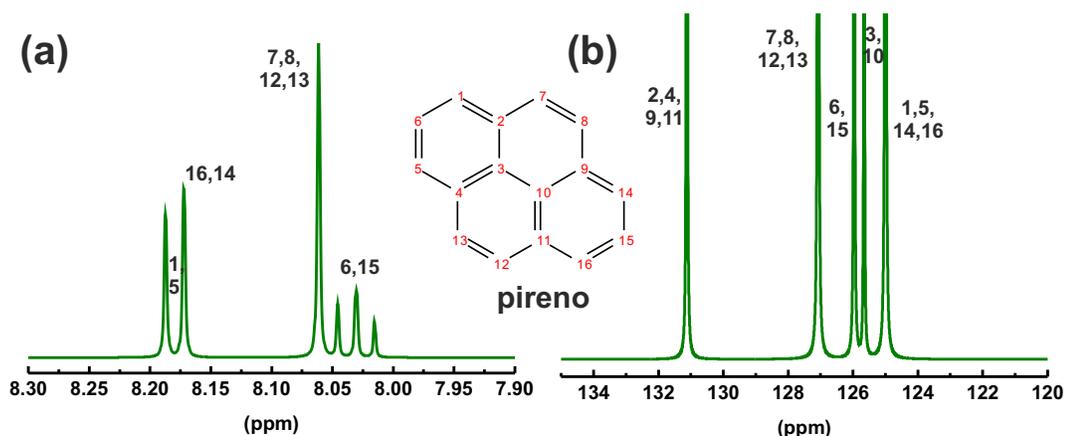


Figura 4.28: Predicción de los espectros (a) ^1H y (b) ^{13}C de la molécula de pireno utilizado como estándar. La asignación de los picos se realiza con base en la numeración de los núcleos de la molécula de pireno insertada.

Asimismo se realizó la predicción de los desplazamientos de la RBITC en espectros de ^1H y ^{13}C Fig. 4.29 (b) - (d), respectivamente.

Por una parte, en el espectro de ^1H , las señales correspondientes al anillo de benceno se esperan entre 7.5 y 8.0 ppm, las señales del grupo xanteno se esperan entre 6.0 y 7.0 ppm, mientras que los carbonos alifáticos (a-d) marcados en azul en la molécula de RBITC Fig. 4.29 (a) se esperan en desplazamientos menores entre 1.0 y 4.0 ppm. Por otra parte, en el espectro de ^{13}C , el anillo benzénico se espera entre 125 y 140 ppm, mientras que el grupo xanteno se espera entre 145-160 ppm y entre 90-120 ppm. Los carbonos alifáticos Fig. 4.29 (c) se esperan entre 10 y 60 ppm.

Las disoluciones preparadas de RBITC en etanol se midieron a distintos tiempos de almacenamiento, con un máximo de 75 h (para esta última muestra no se utilizó la referencia). En la Fig. 4.30 se muestra la asignación de las señales. Los picos de referencia aparecen entre 7.7 y 8.0 ppm interfiriendo con las señales del anillo benceno de la RBITC. Las señales de los hidrógenos del anillo xanteno aparecen entre 6.5 - 7.5 ppm, mientras los hidrógenos alifáticos de la molécula de RBITC tanto del disolvente (etanol- d_6) contribuyen a los picos a-d debajo de 4 ppm.

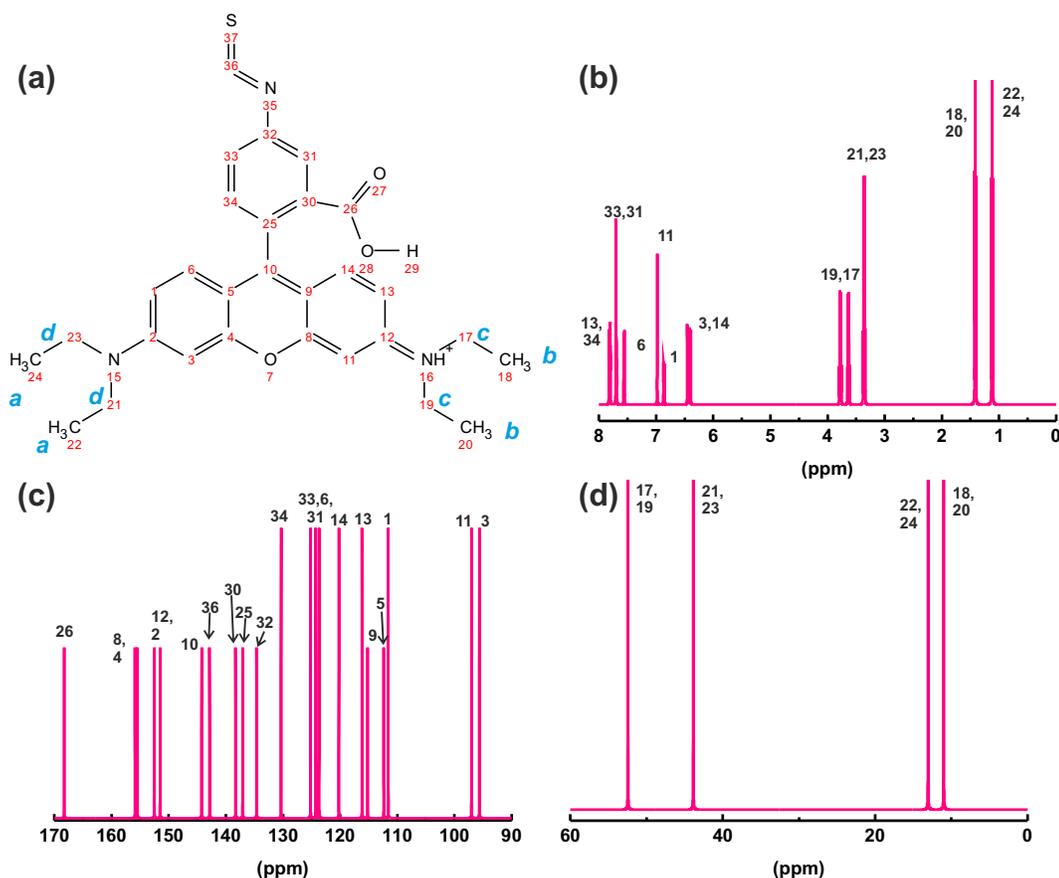


Figura 4.29: (a) Asignación de los núcleos de carbono e hidrógeno de la RBITC. Predicción de los espectros (b) ^1H y (c), (d) ^{13}C de la molécula de RBITC. La asignación de los picos se realiza con base en la numeración de (a).

Posiblemente la señal en 5.2 ppm corresponde también al disolvente. Puede observarse claramente que la estructura del cromóforo se encuentra intacto hasta 75 h en etanol. La comparación de la intensidad de señales entre la muestra y el estándar resultaron tener la misma proporción para todos los tiempos de espera indicando la concentración constante del cromóforo.

Los espectros anteriores indican una alta estabilidad de la RBITC en etanol, por lo menos hasta 75 h. Por ello, se procedió a verificar la estabilidad de esta disolución ahora en contacto con partículas de sílice dispersas para monitorear una posible N-dealquilación del tinte Fig. 4.31. Aparentemente, el contacto con las partículas tampoco afecta la estructura de la

RBITC como se puede observar en la Fig. 4.31 (a). La región de las señales correspondientes al xanteno no se ve afectado, lo cual implica que tanto la conjugación del mismo así como la absorbancia en UV/VIS y fluorescencia deben estar también intactos.

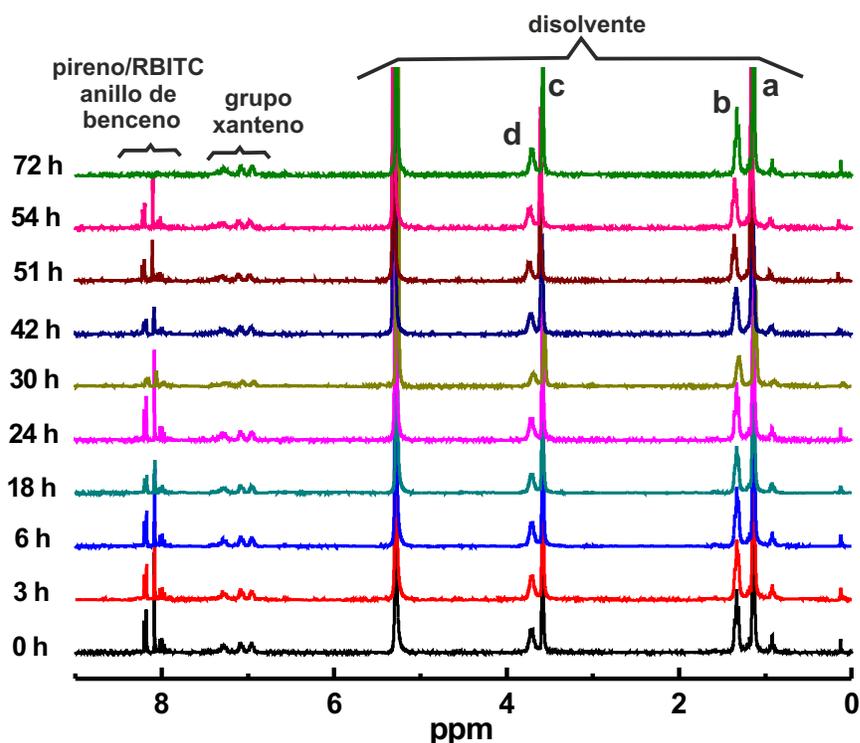


Figura 4.30: Espectros ^1H RMN del tiempo de almacenamiento de RBITC en EtOD-d_6 .

Adicionalmente, se adquirieron los espectros ^{13}C RMN del cromóforo Fig.4.31 (b), sin embargo, no fue posible obtener señales muy intensas aún después de varios días de adquisición debido a la baja solubilidad (~ 5 mg/mL) de la RBITC en etanol. A pesar de ello, existe un pequeño indicio (30 ppm) de que después de tener contacto con las partículas una parte del cromóforo se convierte a N,N,N'-Trietilrodamina, donde un grupo etil (átomos b y d) son eliminados. Es conocido que esto puede sucederle a la RBITC durante el proceso de oxidación debido a la exposición con la luz u oxígeno. Dicha N-dealquilación resulta en un desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorbancia. Sin embargo, ningún cambio de este tipo fue observado probablemente debido a que sólo una pequeña parte del cromóforo fue N-dealquilado y los espectros globales de absorción y fluorescencia no se vieron afectados.

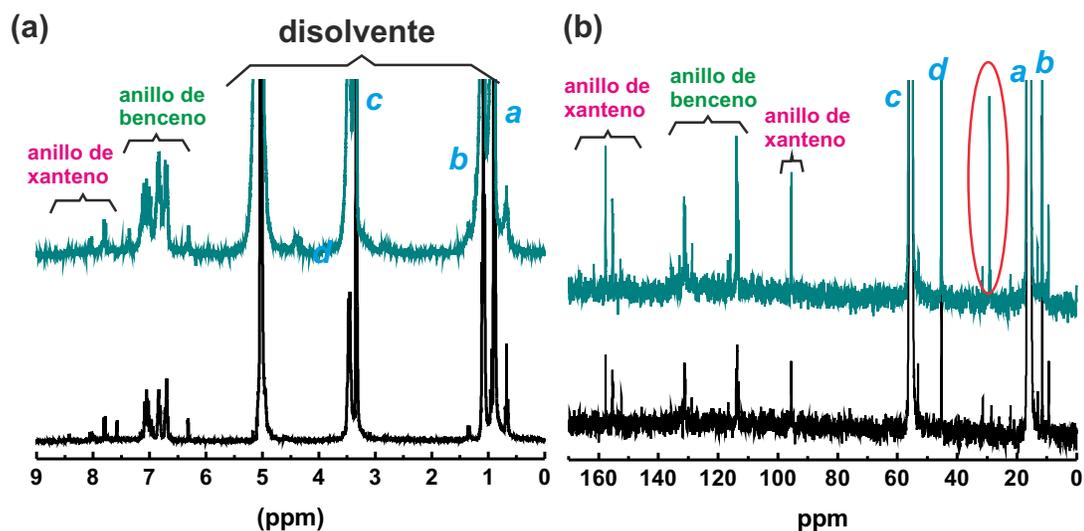


Figura 4.31: Espectros de RMN (a) ^1H y (b) ^{13}C de RBITC en EtOD- d_6 : Comparación de la RBITC después de 75 h de evolución sin partículas (negro) y en presencia de partículas (azul).

Los experimentos realizados para comprobar la estabilidad de la RBITC permiten concluir que el xanteno, que es la parte responsable de la absorción y fluorescencia, no se degrada en el tiempo aún en presencia de las partículas. Por ende, una posible razón por la cual la intensidad de fluorescencia disminuye es que el cromóforo comienza a separarse de las partículas y es eliminado durante el proceso de lavado. De este modo, la concentración total de la RBITC decae.

Para explicar esto es necesario recordar que la parte del cromóforo que reacciona químicamente con las partículas es el grupo isotiocianato formando un enlace tiourea con el grupo amino del APTES. Hay algunos reportes que indican que el grupo isotiocianato no es estable a lo largo del tiempo y que la eficiencia del enlace del cromóforo decae si se utiliza una disolución vieja del mismo [65]. Por ejemplo, hay algunos indicios de la hidrólisis del grupo isotiocianato previo a la reacción, aunque se demostró que el grado de ésta no es significativa para competir con la conjugación del grupo amino [65, 93].

No obstante, también se ha demostrado que la hidrólisis del enlace entre la tiourea y el sustrato de la amina tiene una contribución significativa [93]. Los autores demostraron que el enlace cromóforo - sustrato no es un proceso inmediato pero comienza a ser relevante

después de 48 h y alcanza su máximo cerca de 75 h de la incubación del cromóforo y sustrato en una disolución de buffer. Ciertamente, la tiourea y sus derivados pueden ser hidrolizados en agua, en medios ácidos o básicos de acuerdo al siguiente esquema [94, 95, 96]:



Por tanto, el aducto RBITC-APTES puede presentar la reacción de hidrólisis, lo que resulta en la posible formación de dos aminas: RB-NH₂ y partículas de sílice modificadas con grupos amino aparte del CO₂ y el H₂S. A pesar de ello, es necesario profundizar un poco más en el estudio de este proceso para determinar con mayor exactitud los productos finales.

Estos últimos estudios elaborados para comprender la disminución de fluorescencia en las partículas a largos tiempos de conjugación permiten descartar varias posibilidades: como la desactivación fluorescente debido a la alta concentración del tinte en la superficie, así como la fotodescomposición de la RBITC a largos tiempos de almacenamiento, en diferentes medios, e incluso en presencia de partículas de sílice disueltas.

Por el contrario, se considera con mayor peso la hidrólisis de la tiourea, que permiten explicar el deterioro del conjugado cromóforo-partícula posiblemente debido a la ruptura del enlace tiourea. Dado que este proceso es más pronunciado después de 24 h de reacción, no es recomendable exceder este tiempo de reacción para una eficiente decoración de la partícula. Esto puede aplicar potencialmente para otros derivados del grupo isotiocianato de otros cromóforos.

4.6. Síntesis y caracterización de partículas Janus

Todos los estudios anteriores se encuentran dirigidos hacia los objetivos finales de este trabajo, los cuales son la síntesis de partículas anfifílicas y su caracterización mediante técnicas ópticas. Las técnicas elegidas para la visualización de las partículas fueron SEM y MOF. Para esto fue necesario realizar la conjugación de AuNPs o de RBITC al hemisferio modificado con grupos amino de las partículas Janus. El hemisferio no polar es más difícil de visualizar ya que se desconocen las técnicas de conjugación de compuestos afines a

grupos metilo. Además se requeriría un estudio adicional previo a la conjugación de estos compuestos a las partículas Janus.

En esta sección se muestran los resultados para partículas anfifílicas de 3 μm y 500 nm. Ambas síntesis y caracterizaciones siguen los mismos métodos, lo cual resulta de gran utilidad debido a que se puede escalar a partículas de sílice de cualquier tamaño. Inicialmente se realizó la síntesis de coloidosomas de ambos tamaños. Los resultados para partículas de 500 nm se muestran en la sección 4.1 de este capítulo. Los coloidosomas para partículas de 3 μm se detallan en la misma sección.

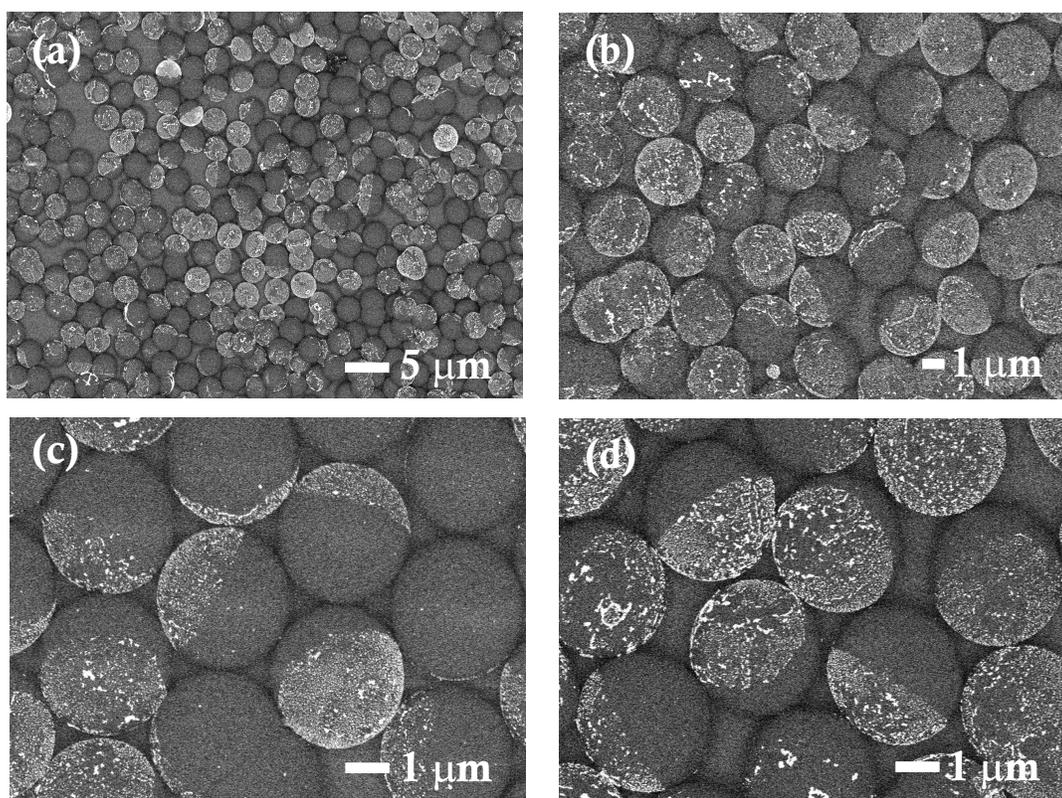


Figura 4.32: Imágenes SEM de partículas Janus de 3 μm decoradas con AuNPs.

Después de haber protegido un hemisferio de las partículas, se procedió a hidrofobizar el hemisferio expuesto en vapor con DCDMS. La cera encargada de proteger el otro hemisferio se disolvió en cloroformo y las partículas fueron enjuagadas mediante ciclos de centrifugación-redispersión con cloroformo por lo menos 10 veces y una última vez con etanol. Las

partículas secadas al vacío se modificaron posteriormente en la forma SA4 manteniendo la relación $0.44 \text{ g APTES/ m}^2$. Hasta este punto se obtienen partículas anfifílicas en las cuales un hemisferio se encuentra modificado con grupos metilo asignándole el carácter no polar y el opuesto se encuentra modificado con grupos amino asignándole el carácter polar. Se enfatiza el uso de un agente visual para caracterizar las partículas Janus puesto que al ser observadas en SEM por ejemplo, no se apreciaría ningún cambio entre las partículas limpias y las partículas modificadas. Probablemente, se observaría cierta rugosidad pero no sería posible distinguir un hemisferio del otro.

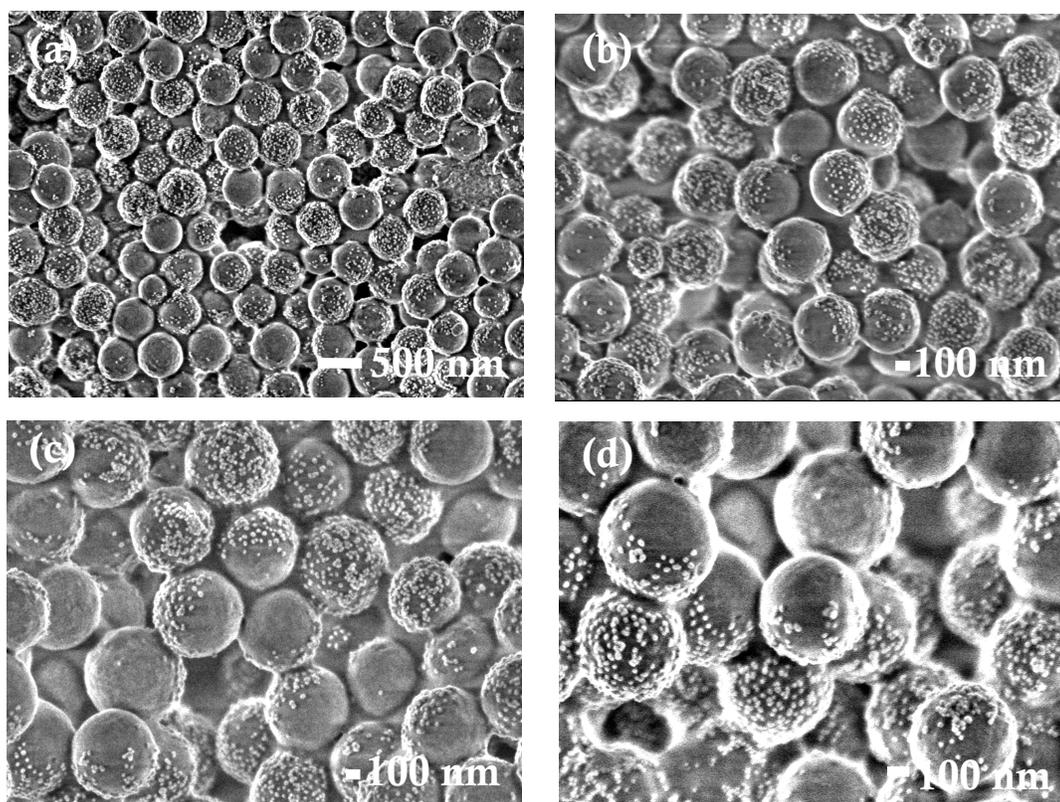


Figura 4.33: Imágenes SEM de partículas Janus de 500 nm decoradas con AuNPs.

La conjugación de otro compuesto a sólo un hemisferio de las partículas representa también un reto. Si se realiza la conjugación en el volumen por ejemplo de las AuNPs, puede ocurrir una fuerte agregación de las mismas debido a la alta densidad de grupos amino en la superficie. En otro caso, como el de la RBITC puede darse la conjugación de la misma en

el hemisferio polar, al cual es más afín pero no se descarta la posibilidad de adsorción al hemisferio no polar de la partícula. Para esto se ideó el aislamiento selectivo de un hemisferio de la partícula. Para experimentos de comportamiento de fase de sistemas coloidales se utiliza una palangana de Langmuir con el fin de obtener una interfase en donde las partículas coloidales formen una monocapa.

La interfase más común de este sistema es aire-agua. De esta forma, lo esperado al colocar una partícula Janus en la interfase es que el hemisferio polar se dirija hacia el agua, mientras que el hemisferio no polar se dirija hacia el aire. Así las posibilidades de manejo del sistema se incrementan puesto que cualquier compuesto puede colocarse o intercambiarse por el agua. De hecho, las AuNPs se encuentran dispersas en agua; lo que facilita el intercambio en la interfase. Y en el caso de la RBITC se intercambió el agua por etanol y después por una disolución de RBITC en etanol.

Con este sistema encontramos varias ventajas, sin embargo la conjugación de los compuestos varía puesto que el fenómeno que ahora la rige es la difusión. Por esto, el tiempo de conjugación debe extenderse; por ejemplo para las AuNPs el tiempo de conjugación fue de 24 h. Las figuras 4.32 y 4.33 muestran la exitosa conjugación de AuNPs de oro a un sólo hemisferio de las partículas de distintos tamaños. Se observa una alta densidad de AuNPs que facilita distinguir el balance Janus.

Pero, el tiempo no es la única limitante de este método. Puesto que para la RBITC se intercambió el agua por etanol, dejar el sistema 24 h a temperatura ambiente ocasionaría una evaporación del etanol y por tanto una pérdida de la interfase. Por esta razón se decidió realizar la conjugación con RBITC únicamente durante 6 h. Una última problemática dentro de la visualización de partículas Janus mediante MOF es el índice de refracción de la fase dispersa. Las partículas de sílice son esferas translúcidas. Por lo tanto, aunque sólo una mitad de la partícula se encuentre decorada con RBITC, la fluorescencia emitida se reflejará en todas las direcciones. Esto produce que las partículas se vean completamente fluorescentes cuando el medio donde se encuentran dispersas tiene un índice de refracción, como el agua ($n = 1.3325$) [97], muy diferente al de las partículas que se estima es $n = 1.4585$ [98].

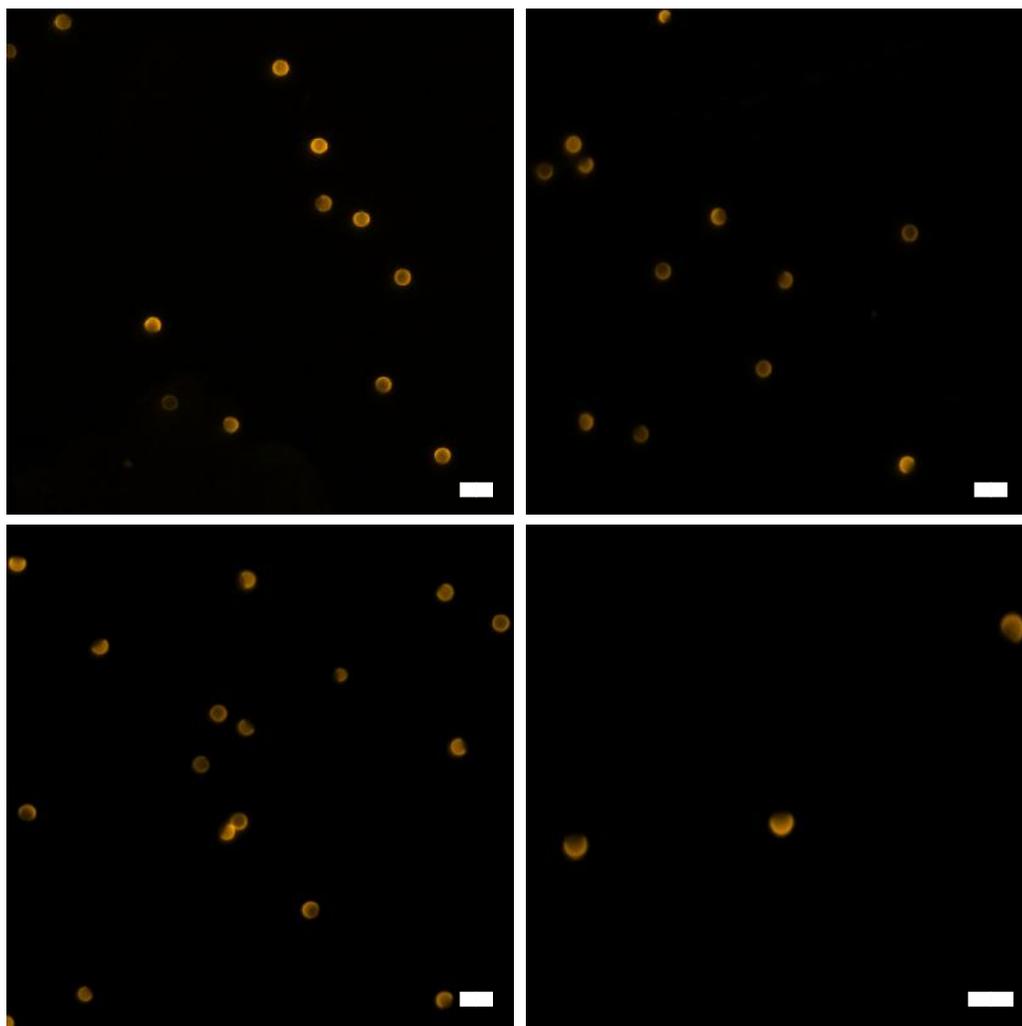


Figura 4.34: Imágenes MOF de partículas Janus de $3\ \mu\text{m}$ decoradas con RBITC. Fase continua: DBM/EtOH 50%. Las barras de escala indican $6\ \mu\text{m}$. El color de las imágenes fue cambiado a amarillo para una mejor visualización.

Por lo tanto se realizó la búsqueda de un disolvente o mezcla de disolventes que proporcionara un índice de refracción cercano al de la sílice. La mezcla de disolventes que ayuda a resolver la visualización de las partículas Janus decoradas es dibromometano (DBM) ($n = 1.5420$) [99] en etanol ($n = 1.3591$) [100] en una proporción del 50% con un índice de refracción de $n = 1.4505$. La Fig. 4.34 muestra la visualización de las partículas Janus utilizando esta mezcla de disolventes. Gracias a ello, es posible observar sólo un hemisferio de la partícula, como si estuviera cortado aunque no es así.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y ANÁLISIS

La correcta visualización y caracterización de ambos hemisferios de las partículas Janus mediante SEM y MOF permiten concluir que tanto el método utilizado para la síntesis, como los métodos la futura conjugación de AuNPs y RBITC son satisfactorios.

Capítulo 5

Conclusiones y Perspectivas

Se desarrolló un método eficiente para la síntesis de hasta 50 mg de partículas Janus de 3 μm y 500 nm a partir de partículas coloidales de sílice. La inserción selectiva de grupos funcionales capaces de otorgar el carácter anisotrópico a estas partículas presentó distintas adversidades.

Primero, para la protección de un hemisferio de la partícula se utilizó el método de emulsión Pickering que permite la formación de coloidosomas. Varios parámetros rigen la correcta formación de coloidosomas en los cuales las partículas se encuentren inmersas a la mitad de su volumen. Inicialmente, es necesario establecer una buena relación de cantidad-tamaño de partículas dispersas hacia la cantidad de cera para asegurar el recubrimiento total de la interface agua-aceite, así como una correcta estabilización de la emulsión. Posteriormente, se ajusta la cantidad de tensoactivo necesario para hidrofobizar suficientemente la superficie y sumergir las partículas a la mitad de su volumen. Los parámetros establecidos para preparar 50 mg de coloidosomas de partículas de 3 μm son: 50 mg de cera parafina, y 5 mL de una disolución de bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB) a 1/6 de su CMC. Asimismo para preparar 50 mg de coloidosomas de partículas de 500 nm son: 1.5 g de cera parafina y 15 mL de una disolución de DDAB con una relación de CMC/3.4.

Segundo, es la silanización del hemisferio expuesto de las partículas en coloidosoma con diclorodimetilsilano (DCDMS) para la inserción de grupos metilo y posteriormente modi-

ficados con 3-aminopropiltriétoxilano (APTES) para crear el hemisferio hidrofílico de la partícula. Los parámetros de modificación con APTES se optimizan previamente, ya que la funcionalización de partículas de sílice con este silano depende fuertemente del medio en que se encuentre. Un medio no polar es preferido. La cantidad de agua en el medio también es crucial ya que si bien una pequeña cantidad es necesaria para iniciar la hidrólisis del APTES, un exceso de la misma ocasiona una hidrólisis del APTES en el volumen resultando en una pobre modificación superficial. Asimismo, altas temperaturas de silanización favorecen la condensación del APTES en la superficie de la partícula. La mejor funcionalización obtenida fue manteniendo una relación $0.44 \text{ g}_{\text{APTES}}/\text{m}^2$ de partículas de sílice en una mezcla de disolventes etanol en tolueno en proporción 9:1, respectivamente, a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 h (SA4). Adicionalmente, un secado previo de las partículas a $140 \text{ }^\circ\text{C}$, así como el secado de los disolventes (SA4 seco) mejora la funcionalización aunque es un método más laborioso y costoso.

Tercero, la cuantificación de grupos amino superficiales requiere de técnicas altamente sensibles debido a la minúscula cantidad de silano acoplado. Por ello, se utiliza espectroscopía de fluorescencia. Mediante un ensayo fluorimétrico, que incluye la disolución de las partículas en NaOH 1 M se encuentra que la muestra SA4 otorga una funcionalización del 50 % mientras que la muestra SA4 bajo condiciones secas otorga una funcionalización del 69 %. En general se alcanza la mayor funcionalización de partículas de sílice estimada teóricamente en 70 %. Utilizando esta misma técnica, la disponibilidad de reacción de los grupos amino con Rodamina B Isotiocianato se estima en 846 moléculas/partícula. Esta cantidad, aunque parece pequeña es suficiente para la posterior visualización de las partículas en microscopía óptica de fluorescencia. Dado, que la disponibilidad depende del tamaño de la molécula que se desea conjugar y en búsqueda de un método no destructivo de cuantificación; se realiza un estudio por espectroscopía UV-Visible con 4-nitrobenzaldehído (4-NBA), una molécula relativamente pequeña con la cual se estima el enlace de 7.8×10^5 moléculas/partícula. Sin embargo, el método utilizado para esta última técnica se deja abierto para su mejora mediante futuros estudios ya que se observó un desplazamiento en el máximo de absorbancia en los espectros. Es una técnica que requiere de mucho cuidado experimental, así como la verificación de su reproducibilidad.

Cuarto, la intensidad de fluorescencia de la RBITC en la superficie de las partículas presentó un interesante comportamiento, del cual se realizaron estudios más profundos. El tinte mostró un máximo de fluorescencia en 24 h utilizando 5 mg del mismo en 10 mg de partículas modificadas dispersas en etanol. Se realizó un estudio exhaustivo con el fin de explicar este fenómeno comenzando por la cuantificación de la concentración de RBITC en la superficie de las partículas. La tendencia de la concentración de RBITC observada por espectroscopía de fluorescencia y UV/Vis es similar a la observada por microscopía óptica confocal lo cual descartó la hipótesis de desactivación fluorescente debido a una alta concentración del cromóforo. Posteriormente se sugirió una fotodescomposición del cromóforo puesto que es conocido que las rodaminas son moléculas sensibles a la luz y oxígeno. Tras monitorear la estabilidad de la RBITC en distintos medios y tiempos de almacenamiento; se observó mediante resonancia magnética nuclear en disolución que sólo a largos tiempos, la RBITC sufre una N-dealquilación. Sin embargo, esto no afecta los espectros globales de absorbancia y fluorescencia por lo que se sugirió una última hipótesis que incluye la separación del cromóforo de las partículas debido a la hidrólisis del enlace tiourea entre la RBITC y el grupo amino superficial. Esto último explica el decaimiento en la intensidad de fluorescencia de las muestras a largos tiempos de reacción.

Quinto, la conjugación de nanopartículas de oro (AuNPs) y RBITC al hemisferio hidrofílico de las partículas Janus es una tarea compleja debido al selecto acoplamiento de ambas especies. La conjugación de AuNPs en el volumen, por ejemplo, no es una opción viable debido a la alta densidad de grupos amino en la superficie de la partícula que ocasiona la rápida agregación de las AuNPs mezclando ambos tipos de partículas. En el caso del tinte fluorescente tampoco es una opción preferida ya que éste se adsorbe a ambos hemisferios. Para ello se utilizó el método de adsorción en una interfase agua-aire durante 24 h para el caso de las AuNPs y una reacción de 6 h en etanol-aire para el caso de la RBITC. Las partículas Janus de ambos tamaños decoradas con AuNPs son fácilmente resueltas mediante microscopía de barrido electrónico. Sin embargo la visualización en microscopía óptica de fluorescencia para el caso de las partículas fluorescentes presentó un problema de resolución debido al tamaño, por lo que únicamente las partículas de 3 μm son visualizadas. Además fue necesario utilizar una mezcla de disolventes que coincidiera con el índice

de refracción de las partículas de sílice para evitar la refracción de la luz de fluorescencia emitida en todas direcciones. La mezcla utilizada con un índice de refracción $n=1.4505$ contiene 50 % v/v de DBM en etanol.

Los resultados y conclusiones obtenidos en este trabajo contribuyen al desarrollo de futuras investigaciones de este singular tipo de partículas ya que se establece un método sistemático y reproducible para la síntesis de dichas partículas. Por mencionar algunas; este trabajo sirve como base para la mejora de la síntesis de partículas Janus. Por ejemplo, es deseable continuar el escalamiento de preparación de coloidosomas, con el fin de obtener tanto una mayor cantidad de partículas en un sólo lote como diferentes tamaños y tipos de partículas Janus.

También, la buena funcionalización de partículas de sílice abre la posibilidad de conjugación de una infinidad de compuestos gracias a la inserción del grupo amino. Asimismo, los parámetros de modificación utilizados pueden servir como punto de partida para la introducción de otros grupos funcionales e incluso para otra base, como la magnetita que también es ampliamente utilizada para modificación superficial.

La dependencia de intensidad de fluorescencia de la RBITC puede extenderse a otros cromóforos de la misma familia. Adicionalmente, la alta estabilidad de la RBITC ofrece la posibilidad del reciclado de la misma ya que sólo una mínima cantidad reacciona con la partícula. Esto reduciría costos y optimizaría el uso de la misma. Este tinte puede también ser utilizado en la síntesis de partículas de sílice no sólo superficialmente fluorescentes, si no desde el núcleo durante la síntesis de las mismas.

Anexos

Anexo A

Especificaciones de materiales y reactivos utilizados

(3-aminopropil)triétoxissilano (99 %)

(APTES) $C_9H_{23}NO_3Si$

Sigma Aldrich

densidad: 0.946 g/mL

masa molar: 221.37 g/mol

(3-etoxidimetilsilil)propilamina (97 %)

(APDES) $C_5H_{15}ON$

Sigma Aldrich

densidad: 1.057 g/mL

masa molar: 161.32 g/mol

temperatura de ebullición: 80 °C

(3-Mercaptopropil)trimetoxissilano (95 %)

(MPTMS) $C_6H_{16}O_3Si$

Sigma Aldrich

densidad: 1.057 g/mL

masa molar: 196.34 g/mol

4-nitrobenzaldehído (98 %)

(4-NBA) $4 - (NO_2)C_6H_4CHO$

Sigma Aldrich

Acetona (99.6 %)

C_3H_6O

J.T. Baker

densidad: 0.791 g/mL

masa molar: 58.08 g/mol

Ácido acético glacial (99.85 %)

CH_3COOH

Sigma Aldrich

masa molar: 151.12 g/mol

Ácido Sulfúrico (97.9 %)

H_2SO_4

J.T. Baker

masa molar: 98.08 g/mol

Alcohol etílico absoluto (99.95 %)

CH_3CH_2OH

J.T. Baker

densidad: 0.789 g/mL

masa molar: 46.06 g/mol

Benzofenona

$C_{13}H_{10}O$

Sigma Aldrich

masa molar: 182.22 g/mol

Bromuro de didodecidimetil amonio

(DDAB)

Sigma Aldrich

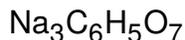
Cera parafina (99.8 %)

$C_{13}H_{10}O$

Sigma Aldrich

ANEXO A: ESPECIFICACIONES DE MATERIALES Y REACTIVOS UTILIZADOS

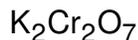
Citrato de sodio (98.0 %)



Sigma Aldrich

masa molar: 258.06 g/mol

Dicromato de potasio (99.8 %)



Fermont

masa molar: 294.18 g/mol

Cloroformo (99.9 %)

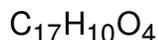


Productos Químicos Monterrey

densidad: 1.47 g/mL

masa molar: 119.38 g/mol

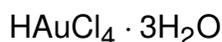
Fluorescamina (98 %)



Sigma Aldrich

masa molar: 278.26 g/mol

Cloruro de oro (III) trihidrato (99.9 %)



Sigma Aldrich

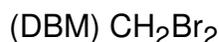
masa molar: 393.83 g/mol

Fosfato de sodio dibásico heptahidratado

Sigma Aldrich

masa molar: 268.07 g/mol

Dibromometano (99.0 %)



Sigma Aldrich

densidad: 2.477 g/mL

masa molar: 173.83 g/mol

temperatura de ebullición: 96-98 °C

Hidróxido de potasio (98.0 %)



Sigma Aldrich

masa molar: 56.1 g/mol

Diclorodimetilsilano (99.5 %)



Sigma Aldrich

densidad: 1.07 g/mL

masa molar: 129.06 g/mol

temperatura de ebullición: 70 °C

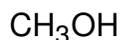
Hidróxido de sodio (Perlas) (98.3 %)



J.T. Baker

masa molar: 40.0 g/mol

Metanol (99.97 %)



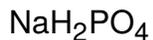
J.T. Baker

densidad: 0.792 g/mL

masa molar: 32.04 g/mol

ANEXO A: ESPECIFICACIONES DE MATERIALES Y REACTIVOS UTILIZADOS

Monofosfato de sodio anhidro



J.T. Baker

masa molar: 119.98 g/mol

Sodio metálico



Sigma Aldrich

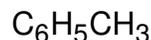
masa molar: 22.98 g/mol

Partículas de sílice de 320 nm (SiPs)



Lote S6, R=310 nm PD: 5.6 %

Tolueno (99.5 %)



J.T. Baker

densidad: 0.867 g/mL

masa molar: 92.14 g/mol

Partículas de sílice de 3 μm (SiPs)



Bangs Laboratories (Fishers, USA)

Tritón X100 (99.5 %)

Sigma Aldrich

densidad: 1.07 g/mL

masa molar promedio: 625 g/mol

Partículas de sílice de 500 nm (SiPs)



Lote S % PD:

Partículas de sílice de ~ 1 μm (SiPs)



Lote S47, R=482 nm, PD: 2.0 %

Peróxido de hidrógeno (30 %)



J.T. Baker

masa molar: 34.01 g/mol

Rodamina B Isotiocianato mezcla de isómeros



Sigma Aldrich

masa molar: 536.08 g/mol

solubilidad: 10 mg/mL (metanol A 20 °CC)

Anexo B

Cálculo de moléculas de conjugación presentes en la superficie de partículas de sílice modificadas

Se describe a detalle la estimación del número de moléculas de RBITC y de 4-NBA enlazadas a las partículas de sílice modificadas descritas en la sección de resultados y análisis 4.5.2.

Se desea obtener el número de moléculas de un compuesto en una partícula de sílice; por ejemplo la RBITC cuyo valor de concentración se obtiene a partir de la curva de calibración de la sección 4.5.2 convertida a g/mL:

$$\frac{n_{\text{RBITC}}}{\text{part}} = \frac{C_{\text{RBITC}} V_{\text{dis}} N_A}{N_{\text{part}} PM_{\text{RBITC}}}, \quad (\text{B.1})$$

donde $n_{\text{RBITC}}/\text{part}$ es la cantidad de moléculas de RBITC por partícula, C_{RBITC} es la concentración experimental de RBITC en g/mL, V_{dis} es el volumen de disolución medido en la

ANEXO B: CÁLCULO DE MOLÉCULAS DE CONJUGACIÓN PRESENTES EN LA SUPERFICIE DE PARTÍCULAS DE SÍLICE MODIFICADAS

celda de cuarzo utilizada en fluorimetría (5 mL para la RBITC), N_A es el número de Avogadro (6.023×10^{23} moléculas/mol), N_{part} es el número de partículas de sílice disueltas, y PM_{RBITC} es el peso molecular de la RBITC (546.06 g/mol).

Se tiene que el número de partículas en una masa total de partículas disueltas (m_T) en NaOH 1 M, es:

$$N_{part} = \frac{m_T}{m_{1p}} = \frac{m_T}{\rho_{1p} V_{1p}}, \quad (B.2)$$

donde m_{1p} es la masa de una partícula de sílice dada por el producto de su densidad (ρ_{1p}) y su volumen (V_{1p}).

Reescribiendo la ec. anterior B.2 en términos del volumen de una partícula:

$$N_{part} = \frac{3 m_T}{\rho_{1p} 4\pi R^3}, \quad (B.3)$$

donde R es el radio de la partícula y se asume que la densidad de una partícula es de $2 \times 10^6 \text{g/m}^3$.

Sustituyendo la ec. B.3 en la ec. B.1 se obtiene:

$$\frac{n_{RBITC}}{part} = \frac{4\pi C_{RBITC} V_{dis} N_A R^3 \rho_{1p}}{3 m_T PM_{RBITC}}, \quad (B.4)$$

Por lo que mediante la ec. B.4 se puede estimar el número de moléculas de RBITC conjugado a 10 mg de partículas de sílice de 1 μm en 5 mL de disolución.

$$\frac{n_{RBITC}}{part} = \frac{4\pi (1.58 \times 10^{-9} \frac{\text{g}}{\text{mL}}) (5\text{mL}) (6.023 \times 10^{23} \frac{\text{moléculas}}{\text{mol}}) (5 \times 10^{-7} \text{m})^3 (2 \times 10^6 \frac{\text{g}}{\text{m}^3})}{3 (0.01\text{g}) (536.06 \frac{\text{g}}{\text{mol}})}, \quad (B.5)$$

resultando:

$$\frac{n_{RBITC}}{part} = 846 \text{ moléculas de RBITC}. \quad (B.6)$$

ANEXO B: CÁLCULO DE MOLÉCULAS DE CONJUGACIÓN PRESENTES EN LA SUPERFICIE DE PARTÍCULAS DE SÍLICE MODIFICADAS

En el caso del 4-NBA, la concentración dada en nmol de grupos amino se convierte a mol y únicamente se realiza la ecuación siguiente:

$$\frac{n_{4\text{-NBA}}}{\text{part}} = \frac{C_{4\text{-NBA}} N_A}{N_{\text{part}}}, \quad (\text{B.7})$$

Si se sustituye el número de partículas el cual se calcula del mismo modo que en la ec. B.2 se obtiene:

$$\frac{n_{4\text{-NBA}}}{\text{part}} = \frac{4\pi C_{4\text{-NBA}} N_A R^3 \rho_{1p}}{3 m_T}, \quad (\text{B.8})$$

El radio de partículas y la masa total de partículas tienen el mismo valor que el utilizado para la RBITC, por lo que al sustituir los valores se obtiene:

$$\frac{n_{4\text{-NBA}}}{\text{part}} = \frac{4\pi (1.25 \times 10^{-8} \text{mol}) (6.023 \times 10^{23} \frac{\text{moléculas}}{\text{mol}}) (5 \times 10^{-7} \text{m})^3 (2 \times 10^6 \frac{\text{g}}{\text{m}^3})}{3 (0.01 \text{g})}, \quad (\text{B.9})$$

resultando:

$$\frac{n_{4\text{-NBA}}}{\text{part}} = 7.8 \times 10^5 \text{ moléculas de 4 - NBA.} \quad (\text{B.10})$$

Anexo C

Uso del software ImageJ para el análisis de partículas fluorescentes

Para comparar la intensidad de fluorescencia entre los diferentes tiempos de reacción de las partículas de sílice modificadas con APTes y la RBITC se utilizó el programa ImageJ. Las imágenes fueron guardadas en formato .tiff para conservar la mayor información posible tomada con el microscopio []. En esta sección se hace una descripción paso a paso del uso del programa y la forma en la que se llevó a cabo el análisis.

1. Una vez instalado, abrir el programa ImageJ.

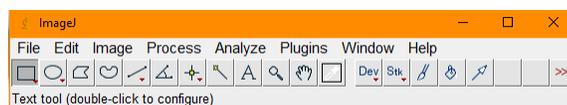


Figura C.1: Ventana de inicio del programa ImageJ.

ANEXO C: USO DEL SOFTWARE IMAGEJ PARA EL ANÁLISIS DE PARTÍCULAS FLUORESCENTES

2. Dar clic en la opción File-Open o teclear Ctrl + O al mismo tiempo.

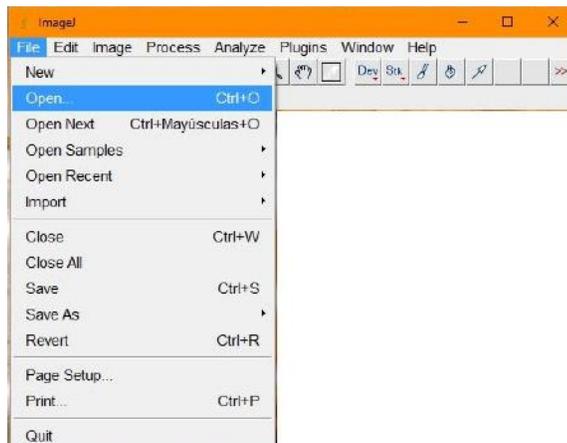


Figura C.2: Abrir imagen.

3. Se selecciona la imagen a analizar dando doble clic sobre ella o sobre el botón Abrir.

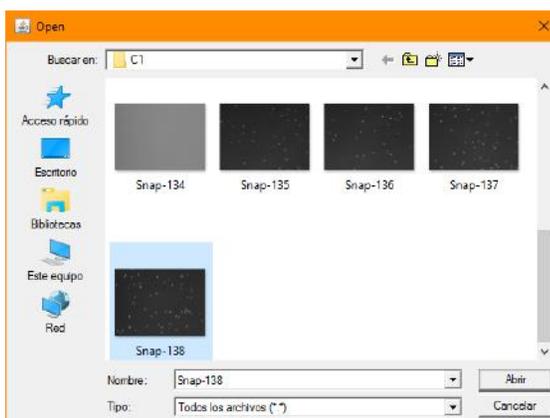


Figura C.3: Abrir imagen.

4. En algunas ocasiones el fondo de la imagen no es completamente negro, por lo que, para un buen análisis es necesario sustraerlo. La forma de hacer esto en ImageJ es dar clic en la opción Process-Substract Background.

ANEXO C: USO DEL SOFTWARE IMAGEJ PARA EL ANÁLISIS DE PARTÍCULAS FLUORESCENTES

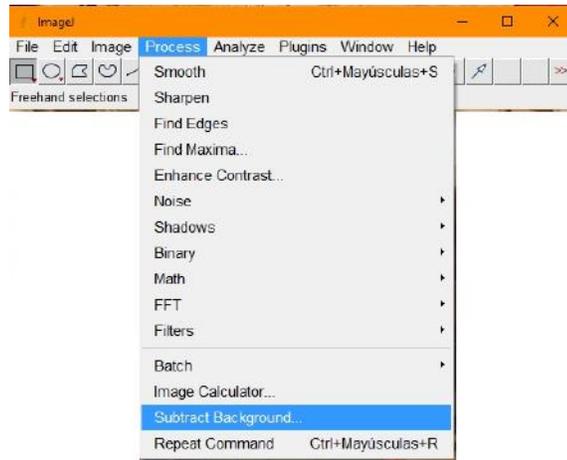


Figura C.4: Sustracción del fondo fluorescente.

5. Al abrir la opción de sustracción del fondo aparece la siguiente ventana. El *rolling ball radius* corresponde a la cantidad de píxeles que se desea tomar para la sustracción. Las demás opciones sirven para elegir el tipo de sustracción. En el caso de imágenes fluorescentes pueden escogerse las primeras dos opciones dependiendo de la cantidad de fluorescencia que exista en el fondo de la imagen. Cuando el fondo es muy oscuro y simplemente hay un foco muy fluorescente se utiliza la opción *Light background*. Cuando el fondo en general tiene cierta fluorescencia se selecciona la opción *Separate colors*. Para ver los cambios antes de elegir el tipo de sustracción, se puede seleccionar la opción de *Preview*. Una vez seleccionada la opción se da clic en OK.

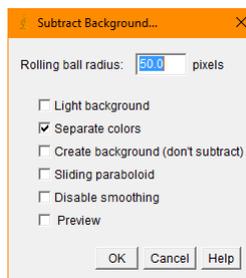


Figura C.5: Selección de opción para sustracción del fondo fluorescente.

ANEXO C: USO DEL SOFTWARE IMAGEJ PARA EL ANÁLISIS DE PARTÍCULAS FLUORESCENTES

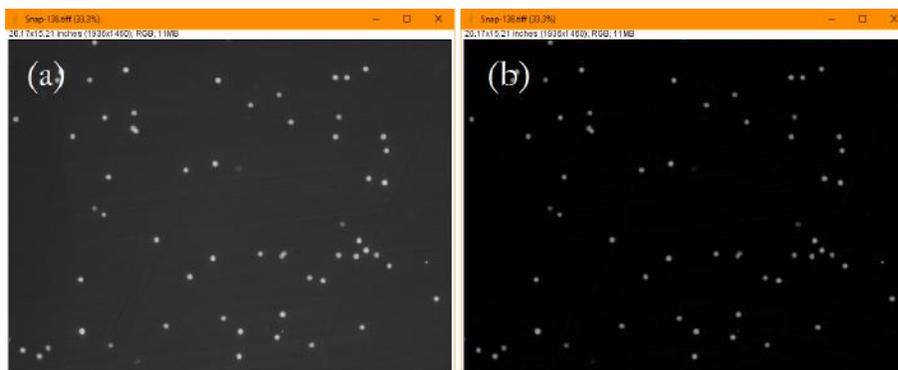


Figura C.6: Sustracción del fondo fluorescente (a) Imagen original (b) Imagen con fondo modificado.

6. Para analizar cada una de las partículas podemos ampliar y mover la imagen: la ampliamos, dando clic en la lupa y la acercamos dando clic izquierdo o utilizando el símbolo de '+' en el teclado y la alejamos dando clic derecho o apretando el símbolo '-'. Para mover la imagen, se da clic en el símbolo de la mano y se sostiene la imagen para cambiarla de lugar o presionando la barra espaciadora y dando clic izquierdo sosteniendo para cambiarla de posición.



Figura C.7: Símbolo lupa para acercarse o alejarse y símbolo mano para mover la posición de la imagen.

7. Una vez localizada la partícula, se da clic en la opción de óvalo. La partícula se rodea sosteniendo el clic izquierdo (quedará identificada por un marco color amarillo).

ANEXO C: USO DEL SOFTWARE IMAGEJ PARA EL ANÁLISIS DE PARTÍCULAS FLUORESCENTES

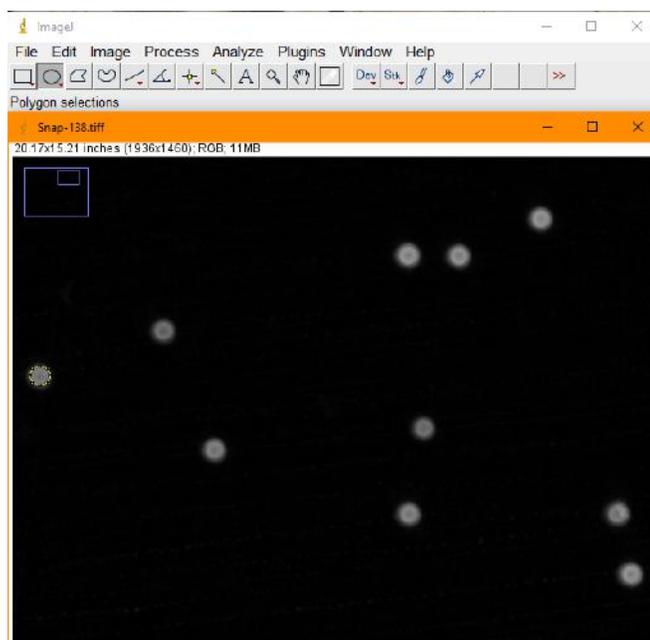


Figura C.8: Selección de una partícula.

8. Para obtener información sobre la partícula seleccionada se escogen los parámetros de análisis en la opción *Analyze-Set Measurements*.

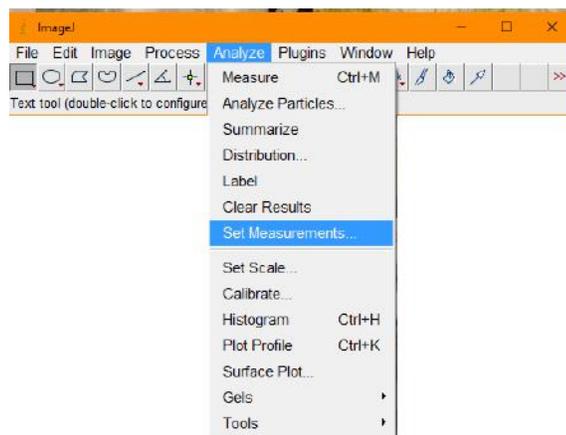


Figura C.9: Opción establecer parámetros.

9. Al seleccionar la opción *Set Measurements* se abre una ventana. Los parámetros que deseamos guardar son *Area* y *Mean gray value*. El primero analiza el número de píxeles y el segundo el valor de escala de grises promedio de los píxeles seleccionados. Para enumerar las partículas que se han analizado se selecciona la opción *Display*

ANEXO C: USO DEL SOFTWARE IMAGEJ PARA EL ANÁLISIS DE PARTÍCULAS FLUORESCENTES

label y para mantener todas las partículas seleccionadas que se analicen se activa la opción *Add to overlay*. Se da clic en el botón OK para continuar.

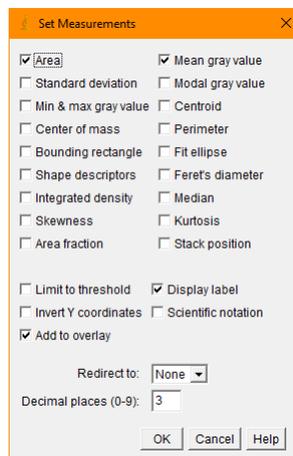


Figura C.10: Selección de parámetros de análisis.

- Una vez seleccionada la partícula se aprietan en conjunto las teclas Ctrl + M para comenzar el análisis. Automáticamente se asignará un número a la partícula rodeada y se mostraran los parámetros analizados que se escogieron en la ventana anterior

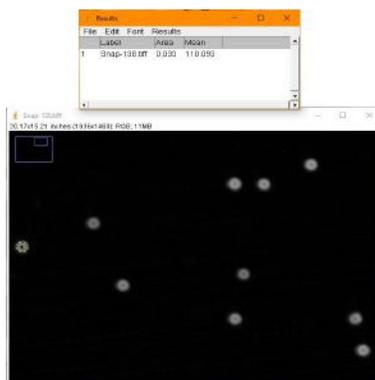


Figura C.11: Análisis de una partícula.

- Al finalizar el análisis de las partículas se guardan los datos analizados dando clic en la opción File-Save As o Ctrl + S.

ANEXO C: USO DEL SOFTWARE IMAGEJ PARA EL ANÁLISIS DE PARTÍCULAS FLUORESCENTES

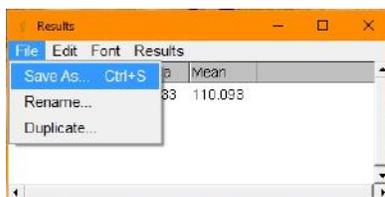


Figura C.12: Guardado de análisis.

12. Después de guardar se cierra la ventana de resultados y se procede a guardar la imagen con las modificaciones realizadas para no perder el archivo original. Para esto se selecciona la ventana de la imagen y se da clic en la opción File-Save As o Ctrl + S. Se selecciona el formato .tiff

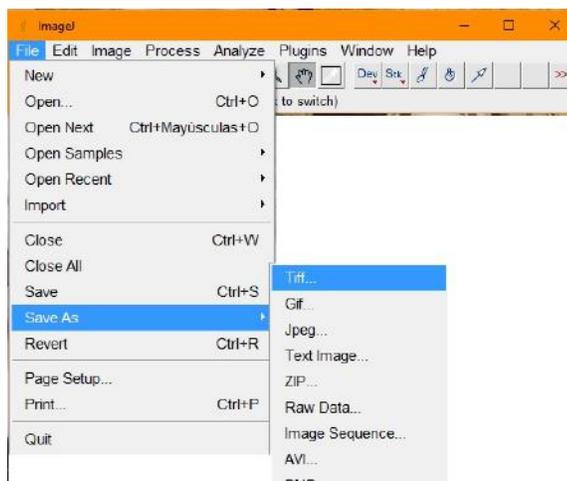


Figura C.13: Guardado de imagen analizada.

13. De este modo se mantienen ambos archivos: el original y la imagen analizada.

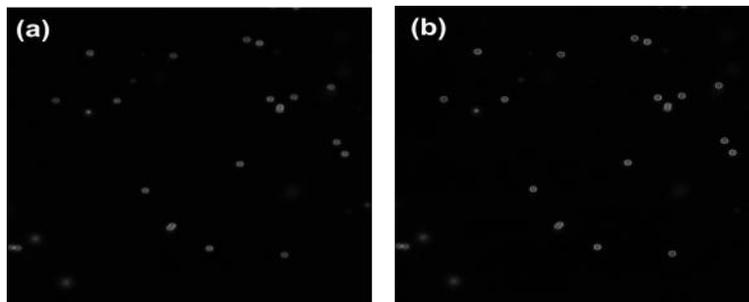


Figura C.14: Imágenes de partículas (a) archivo original (b) imagen analizada.

Bibliografía

- [1] Glotzer, S. C. & Solomon, M. J. (2014). (2007). Anisotropy of building blocks and their assembly into complex structures. *Nature Materials*, **6**(8), pp. 557-62.
- [2] Van Workum, K. & Douglas, J.F. (2006). Symmetry, equivalence, and molecular self-assembly. *Physical Review E*, **73**(3), pp. 031502.
- [3] De Gennes, P. G. (1992). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Soft Matter*, **64**(1) pp. 645-648.
- [4] Casagrande, C., Fabre, P., Raphael, E. & Veyssie, M. (1989). Janus beads - realization and behavior at water oil interfaces. *Europhysics Letters*, **9**(3) pp. 251-255.
- [5] Huang, M., Li, Z. & Guo, H. (2012). The effect of Janus nanospheres on the phase separation of immiscible polymer blends via dissipative particle dynamics simulations. *Soft Matter*, **8**(25) pp. 6834-6845.
- [6] Zhang, S., Moussodia, R.O., Sun, H.-J., Leowanawat, P., Muncan, A., Nusbaum, C. D., Chelling, K. M., Heiney, P. A., Klein, M. L., André, S., Roy, R., Gabius, H.J. & Percec, V. (2014). Mimicking biological membranes with programmable glycan ligands self - assembled from amphiphilic Janus glycodendrimers. *Angewandte Chemie*, **126**(41) pp. 11079-11083.
- [7] Fernandez-Rodriguez, M. A., Rodriguez-Valverde, M. A., Cabrerizo-Vilchez, M. & Hidalgo-Alvarez, R. (2014). Surface activity and collective behaviour of colloiddally stable Janus - like particles at the air - water interface. *Soft Matter*, **10**(19) pp. 3471-3476.

BIBLIOGRAFÍA

- [8] Tu, F. (2015). Emulsion stabilization with janus particles (Tesis doctoral) Universidad de Pensilvania, E.U.A. Recuperado de: <http://repository.upenn.edu/dissertations/AAI3709573/>
- [9] Xu, Y., Wang, L., Zhu, X. & Wang, C.-Q. (2016). Hierarchical self-assembly of protoporphyrin IX-bridged Janus particles into photoresponsive vesicles. *RSC Advances*, **6**(37), pp. 31053-31058.
- [10] Mengjiao, C., Feng, S., Jianshu, L., Zaifu, L., Chao, J., Meng, X., Liqun, Z., Wantai, Y. & Toshio, N. (2014). Macroscopic supramolecular assembly of rigid building blocks through a flexible spacing coating *Advanced Materials*, **26**(19), pp. 3009–3013.
- [11] Cole-Hamilton, D. (2010). Janus catalysts direct nanoparticle reactivity. *Science*, **327**(5961), pp. 41-42.
- [12] Ma, X., Hahn, K. & Sanchez, S. (2015). Catalytic mesoporous Janus nanomotors for active cargo delivery. *Journal of the American Chemical Society*, **137**(15), pp. 4976-4979.
- [13] Xie, H., She, Z.-G., Wang, Si., Sharma, G. & Smith J.W. (2012). One-step fabrication of polymeric Janus nanoparticles for drug delivery. *Langmuir*, **28**(9), pp. 4459-4463.
- [14] Hurtley, S. (2010). Janus drug delivery vehicle. *Science*, **328**(5981), pp. 949.
- [15] El-Sherbiny, IM. & Abbas, Y. (2016). Janus nano- and microparticles as smart drug delivery systems *Current Pharmaceutical Biotechnology*. **17**(8), pp. 673-82.
- [16] Hong, L.; Jiang, S. & Granick, S. (2006). Simple method to produce Janus colloidal particles in large quantity. *Langmuir*, **22**(23), pp. 9495-9499.
- [17] Jiang, S., Schultz, M.J., Chen, Q., Moore J.S. & Granick, S. (2008). Solvent - free synthesis of Janus colloidal particles. *Langmuir*, **24**(18), pp. 10073-10077.
- [18] Lebovka, N.I. (2014). Aggregation of Charged Colloidal Particles En. Müller, M. Polyelectrolyte Complexes in the Dispersed and Solid State I: Principles and Theory. (p. 57-96) Berlin, Heidelberg.

BIBLIOGRAFÍA

- [19] Hamley, I.W. & Roberts, W.O. (2007). Introduction to soft matter: synthetic and biological self - assembling materials. *John Wiley & Sons*.
- [20] Bergna, H. E.; & Roberts, W.O. (2006). Colloidal silica: fundamentals and applications. *CRC Taylor & Francis*, **131**, pp. 2410-2433.
- [21] Kozina, A.; Díaz-Leyva, P.; Friedrich, C.; & Bartsch, E. (2012). Structural and dynamical evolution of colloid-polymer mixtures on crossing glass and gel transition as seen by optical microrheology and mechanical bulk rheology. *Soft Matter*, **8**(4), pp. 1033-1046.
- [22] Madivala, B., Fransaer, J. & Vermant, J. (2009). Self-assembly and rheology of ellipsoidal particles at interfaces. *Langmuir*, **25**(5), pp. 2718-2728.
- [23] Jiang, S., Chen, Q., Tripathy, M., Luijten, E., Schweizer, K.S. & Granick, S. (2010). Janus particle synthesis and assembly. *Advanced Materials*, **22**(10), pp. 1060-1071.
- [24] Goyal, A., Hall, C.K., & Velev, O.D. (2008). Phase diagram for stimulus-responsive materials containing dipolar colloidal particles *Physical Reviews: E*, **77**(3), pp. 031401.
- [25] Goyal, A., Hall, C.K., & Velev, O.D. (2010). Bicontinuous gels formed by self-assembly of dipolar colloid particles. *Soft Matter*, **6**(3), pp. 480-484.
- [26] Beltran-Villegas, D.J., Schultz, B.A., Nguyen, Nguyen H.P., Glotzer, S.C. & Larson, R.G. (2014). Phase behavior of Janus colloids determined by sedimentation equilibrium *Soft Matter*, **10**(26), pp. 4593-4602.
- [27] DeLaCruz-Araujo, R.A., Beltran-Villegas, D.J., Larson, R.G. & Cordova-Figueroa, U.M. (2016). Rich Janus colloid phase behavior under steady shear *Soft Matter*, **12**(18), pp. 4071-4081.
- [28] Walther, A. & Müller, A.H.E. (2013). Janus particles: synthesis, self - assembly, physical properties, and applications. *Chemical Reviews*, **113**(7) pp. 5194-5261.
- [29] Walther, A. & Müller, A.H.E. (2012). Soft, Nanoscale Janus particles by macromolecular engineering and molecular self-assembly. En A. Walther & A.H.E. Müller, Janus

BIBLIOGRAFÍA

- particles: synthesis, self - assembly, physical properties, and applications (pp. 1-28). Cambridge, UK: *RSC Smart Materials*.
- [30] Wang, C. & Xu, C. (2012). Design, synthesis and applications of dumbbell-like nanoparticles. En A. Walther & A.H.E. Müller, Janus particles: synthesis, self - assembly, physical properties, and applications (pp. 29 - 53). Cambridge, UK: *RSC Smart Materials*.
- [31] Desimone, J.M., Wang, J-Y. & Wang, Yapei. (2012). Particle replication in non-wetting templates: a platform for engineering shape- and size-specific Janus particles. En A. Walther & A.H.E. Müller, Janus particles: synthesis, self - assembly, physical properties, and applications (pp. 90 - 107). Cambridge, UK: *RSC Smart Materials*.
- [32] Park, T.-H. & Lahann, J. (2012). Janus particles with distinct compartments via electrohydrodynamic co-jetting. En A. Walther & A.H.E. Müller, Janus particles: synthesis, self - assembly, physical properties, and applications (pp. 54 - 73). Cambridge, UK: *RSC Smart Materials*.
- [33] Zhang, C., Wei, W., Liang, F. & Yang, Z. (2012). Synthesis of Janus particles by emulsion-based methods. En A. Walther & A.H.E. Müller, Janus particles: synthesis, self - assembly, physical properties, and applications (pp. 74 - 89). Cambridge, UK: *RSC Smart Materials*.
- [34] Perro, A., Reculosa, S., Pereira, F., Delville, M.-H., Mingotaud, C., Duguet, E., Bourgeat-Lami, E. & Ravaine, S. (2005). Towards large amounts of Janus nanoparticles through a protection-deprotection route. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **44**, pp. 5542-5543.
- [35] Jiang, S. & Granick, S. (2008). Controlling the geometry (Janus balance) of amphiphilic colloidal particles. *Langmuir*, **24**(6), pp. 2438-2445.
- [36] Iler, Ralph K. (1979). The Chemistry of Silica. *John Wiley & Sons*.
- [37] Stöber, W. & Fink, A. (1968). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, **26**(1), pp. 62-69.

BIBLIOGRAFÍA

- [38] Du, J. & O'Reilly, R.K. (2011). Characterization of surface anisotropic particles with patchy, multicompartiment and Janus architectures: preparation and application. *Chemical Society Reviews* , **40**(5), pp. 2402-2416.
- [39] Westcott, S.L., Oldenburg S.J., Lee, T.R., & Halas, N.J. (1998). Formation and adsorption of clusters of gold nanoparticles onto functionalized silica nanoparticle surfaces. *Langmuir*, **14**(19), pp. 5396–5401.
- [40] Gülşin A., Mustafa, Ö., Beniz, G., Xunli, Z. & Mustafa, E. (2006) Modification of glass beads with an aminosilane monolayer. *Turkish journal of chemistry*, **30**(2), pp. 203–210.
- [41] Badley, R.D., Ford, W.T, McEnroe, F.J. & Assink, R.A. (1990). Surface modification of colloidal silica. *Langmuir*, **6**(4), pp. 792-801.
- [42] Bruce, I.J. & Sen, T. (2005). Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxysilanes and their application in magnetic bioseparations. *Applied Surface Science*, **21**(15), pp. 7029-7035.
- [43] Caravajal, G.S., Leyden, D.E., Quinting, G.R. & Maciel, G.E. (1988). Structural characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-modified silicas by silicon-29 and carbon-13 nuclear. *Magnetic Resonance Analytical Chemistry* , **60**(17), pp. 1776-1786
- [44] Ritter, H., Nieminen, M., Karppinen, M. & Brühwiler, D. (2009). A comparative study of the functionalization of mesoporous silica MCM-41 by deposition of 3-aminopropyltrimethoxysilane from toluene and from the vapor phase. *Microporous and Mesoporous Materials*. **121**(1-3), pp. 79-83.
- [45] Mader, H., Li, X., Saleh, S., Link, M., Kele, P. & Wolfbeis, O.S. (2008). Fluorescent silica nanoparticles. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1130**(1), pp. 218-223.
- [46] Pálmai, M., Nagy, L.N., Mihály, J., Varga, Z., Tárkányi, G., Mizsei, R., Szigyártó, I.C., Kiss, T., Kremmer, T. & Bóta, A. (2013). Preparation, purification and characterization of aminopropyl-functionalized silica sol. *Journal of Colloid and Interface Science*, **390**(1), pp. 34-40.

BIBLIOGRAFÍA

- [47] Sen, T. & Bruce, I.J. (2012). Surface engineering of nanoparticles in suspension for particle based bio-sensing. *Scientific Reports*, **2**(564), pp. 1-6.
- [48] Qiao, B., Wang, T., Gao, H. & Jin, Y. (2015). High density silanization of nano-silica particles using γ -aminopropyltriethoxysilane (APTES). *Applied Surface Science*, **351**, pp. 646-654.
- [49] Howarter, J.A. & Youngblood J.P. (2006). Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir*, **22**(26), pp. 11142-11147.
- [50] Gartmann, N., Schütze, C., Ritter, H., Brühwiler, D. (2010) The effect of water on the functionalization of mesoporous silica with 3-aminopropyltriethoxysilane. *Journal of Physical Chemistry Letters*, **1**(1), pp. 379-382.
- [51] Krysztafkiewicz, A. & Binkowski, S. (1999) Properties of precipitated silicas, modified with 3-aminopropyltriethoxysilane as semi-finished product for preparation of pigments. *Pigment and Resin Technology*, **28**(5), pp. 270-281.
- [52] Nakahara, Y., Takeuchi, T., Yokoyama, S. & Kimura, K. (2011). Quantitative ^1H NMR analysis of reacted silanol groups in silica nanoparticles chemically modified with monochlorosilanes. *Surface and Interface Analysis*, **43**(4), pp. 809-815.
- [53] Ishida, H., Chiang C.-H. & Koenig J.L. (1982). The structure of aminofunctional silane coupling agents: γ -aminopropyltriethoxysilane and its analogues. *Polymer*, **23**(2), pp. 251-257.
- [54] Vansant, E.F., Voort, P. & Vrancken, K.C. (1995). Characterization and chemical modification of the silica surface. *Elsevier*, **118**(2), pp. 3071 - 3071.
- [55] Naviroj, S., Culler S.R., Koenig, J.L. & Ishida, H. (1984). Structure and adsorption characteristics of silane coupling agents on silica and E-glass fiber; dependence on pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, **97**(2), pp. 308-317.
- [56] Chiang, C.-H., Ishida H. & Koenig, J.L. (1980). The structure of γ -aminopropyltriethoxysilane on glass surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, **74**(2), pp. 396-404.

BIBLIOGRAFÍA

- [57] Plueddemann E.E.P.(1974). Interfaces in Polymer matrix composites, New York: *Composite Materials; Vol. G* Academic Press.
- [58] McConnell, M.D., Kraeutler, M.K., Yang, S. & Composto, R.J. (2010). Patchy and multi-region Janus particles with tunable optical properties. *Nano Letters*, **10**(2), pp. 603-609.
- [59] Lan, J., Chen, J., Li, N., Ji, X., Yu, M. & He, Z. (2016). Microfluidic generation of magnetic-fluorescent Janus microparticles for biomolecular detection. *Talanta*, **151**(2), pp. 126-131.
- [60] Perro, A., Meunier, F., Schmitt, V. & Ravaine, S. (2008). Production of large quantities of "Janus" nanoparticles using wax-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **332**(1), pp. 57-62.
- [61] Song, Y. & Chen, S. (2014). Janus nanoparticles: preparation, characterization, and applications. *Chemistry – An Asian Journal*, **9**(2), pp. 418-430.
- [62] Chegel, V., Rachkov, O., Lopatynskiy, A., Ishihara, S., Yanchuk, I., Yoshihiro, N., Hill J.P. & Ariga, K. (2012). Gold nanoparticles aggregation: drastic effect of cooperative functionalities in a single molecular conjugate. *The Journal of Physical Chemistry C.*, **116**(4), pp. 2683-2690.
- [63] Petit, L., Manaud J.-P., Mingotaud, C., Ravaine, S. & Duguet, E. (2001). Sub-micrometer silica spheres dissymmetrically decorated with gold nanoclusters. *Materials Letters*, **51**(6), pp. 478-484.
- [64] Beija, M., Afonso, C. A. M. & Martinho, J. M. G. (2009). Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chemical Society Reviews*, **38**(8), pp. 2410-2433.
- [65] Hermanson, G. T. (2013). Bioconjugate techniques. *Academic Press*.
- [66] Sjöback, R., Nygren, J. & Kubista, M. (1995). Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica acta*, **51** part A L7-L21.

BIBLIOGRAFÍA

- [67] Kubin, R. F. & Fletcher, A. N. (1982). Fluorescence quantum yields of some Rhodamine dyes. *Journal of Luminescence*, **27**(4), pp. 455-462.
- [68] Kim, J.-S., Yoon, T.-J., Yu, K.-N., Noh, M. S., Woo, M., Kim, B.-G. & Cho, M.-H. (2006). Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. *Journal of Veterinary Science*, **7**(4), pp. 321–326.
- [69] Liu, L., Chen, Lu., Liang, J., Liu, L., & Han, H. (2016). A Novel Ratiometric Probe Based on Nitrogen-Doped Carbon Dots and Rhodamine B Isothiocyanate for Detection of Fe³⁺ in Aqueous Solution. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, **16**, pp. 1-7.
- [70] López Arbeloa, F., Ruiz Ojeda, P. & López Arbeloa, I. (1989). Fluorescence self-quenching of the molecular forms of Rhodamine B in aqueous and ethanolic solutions. *Journal of Luminescence*, **44**(1 - 2), pp. 105-112.
- [71] Verhaegh, N. A. M. & van Blaaderen, A. (1994). Dispersions of Rhodamine-labeled silica spheres: synthesis, characterization and fluorescence confocal scanning laser microscopy. *Langmuir*, **10**(5), pp. 1427-1438.
- [72] Watanabe, T., Takizawa, T. & Honda, K. (1977). Photocatalysis through excitation of adsorbates. 1. Highly efficient N-deethylation of rhodamine B adsorbed to cadmium sulfide. *Journal of Physical Chemistry*, **81**(19), pp. 1845–1851.
- [73] Wu, T., Liu, G. & Zhao, J. (1998). Photoassisted degradation of dye pollutants. V. Self-photosensitized oxidative transformation of rhodamine B under visible light irradiation in aqueous TiO₂ dispersions. *Journal of Physical Chemistry*, **102**(30), pp. 5845–5851.
- [74] Huang, X., Young, N.P. & Townley, H.E. (2014). Characterization and comparison of mesoporous silica particles for optimized drug delivery. *Nanomaterials Nanotechnology*, **4**(2), pp. 1-15.
- [75] Wanyika, H., Gatebe, E., Kioni, P., Tang, Z., & Gao, Y. (2011). Synthesis and characterization of ordered mesoporous silica nanoparticles with tunable physical properties by varying molar composition of reagents. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **5**(21), pp. 2402-2410.

BIBLIOGRAFÍA

- [76] Del Campo, A., Sen, T., Lellouchec, J.P. & Bruce, I.J. (2005). Multifunctional magnetite and silica – magnetite nanoparticles: synthesis, surface activation and applications in life sciences. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **293**(1), pp. 33-40.
- [77] Chizhik, V.I. (2014). Magnetic resonance and its applications. Suiza: *Springer International*, **60**, pp. 1776-1786
- [78] Andrew E.R., Bradbury A. & Eades R.G. (1958). Nuclear magnetic resonance spectra from a crystal rotated at high speed. *Nature*, **182**, pp. 1659.
- [79] Lowe I.J. (1959). Free induction decays of rotating solids. *Physical Review Letters*, **2**(7), pp. 285–287.
- [80] Abragam A. (1961). Principles of nuclear magnetism. Oxford: *Oxford University Press*.
- [81] Alia, A., Ganapathy, S. & de Groot, H.J.M. (2009). Magic angle spinning (MAS) NMR: a new tool to study the spatial and electronic structure of photosynthetic complexes. *Photosynthesis Research*, **102**(2-3), pp. 415–425.
- [82] Díaz, A., Ruiz, A. & Reyes, E. (2009). Espectrofometría: espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Departamento de Bioquímica y Biología molecular*, Córdoba.
- [83] Frens, G. (1973). Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science*, **241**, pp. 20-22.
- [84] Giesche, H. & Matijevic, E. (1991). Well-Defined Pigments: I. Monodispersed silica - acid dyes systems. *Dyes and Pigments*, **17**(), pp. 323-340.
- [85] Binks, B.P. & Rodrigues, J.A. (2007). Double inversion of emulsions by using nanoparticles and a di-chain surfactant. *Angewandte Chemie*, **46**, pp. 5389–5392.
- [86] Szekeres, M., Kamalin O., Grobet, P.G., Schoonheydt, R.A.; Wostyn, K., Clays, K., Persoons, A. & Dékány, I. (2003). Two-dimensional ordering of Stöber silica particles at the air/water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **227**(1 - 3), pp. 77-83.

BIBLIOGRAFÍA

- [87] Vrancken, K.C., Van Der Voort, P., Possemiers, K. & Vansant, E.F. (1995). Surface and structural properties of silica gel in the modification with γ -aminopropyltriethoxysilane. *Journal of Colloid and Interface Science*, **174**(1), pp. 86-91.
- [88] Impens, N.R.E.N., Van Der Voort, P. & Vansant, E.F. (1999) Silylation of microporous, meso-and non-por-pous oxides: a review. *Microporous Mesoporous Materials*, **28**(2), pp. 217-232.
- [89] Brinker, C.J. & Scherer, G.W. (1990). Surface Chemistry and Chemical Modification. En Sol-Gel Science (pp. 616 - 672) San Diego: Academic Press.
- [90] Xiang, S., Xing, G., Xue, W., Lu, C. & Lin, J.-M. (2012). Comparison of two different deposition methods of 3-aminopropyltriethoxysilane on glass slides and their application in the ThinPrep cytologic test. *Analyst*, **137**(7), pp. 1669-1673.
- [91] Jung, H. -S., Moon, D. -S. & Lee, J. -K. (2012). Quantitative Analysis and Efficient Surface Modification of Silica Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, **2012**, pp. 1-8.
- [92] Meadows, D.L., Shafer, J.S. & Schultz, J.S. (1991). Determining the extent of labeling for tetramethylrhodamine protein conjugates. *Journal of Immunological Methods*, **143**(2) pp. 263-272.
- [93] Banks, P.R. & Paquette, D.M. (1995). Comparison of three common amine reactive fluorescent probes used for conjugation to biomolecules by capillary zone electrophoresis. *Bioconjugate Chemistry*, **6**(4), pp. 447-458.
- [94] Vinogradova, T. V.; Markov, V. F.; & Maskaeva, L. N. (2010). Temperature dependence of constants of thiourea hydrolytic decomposition and cyanamide. stepwise ionization. *Russian Journal of General Chemistry*, **80**(11), pp. 2341-2346.
- [95] Shaw, W.H.R. & Walker, D.G. (1958). Kinetic studies of thiourea derivatives. IV. The methylated thioureas. Conclusions. *Journal of American Chemical Society*, **80**(20), pp. 5337-5342.

BIBLIOGRAFÍA

- [96] Shitikova, E.A. & Dyachkova, T.P. (2006) The Effects of Calurea and Thiourea on the Corrosion of Carbon Steel in Acid Chloride Media. *Vernadsky University*, **3**, pp. 209-216.
- [97] Hale, G.M. & Querr, M.R. (1973). Optical constants of water in the 200-nm to 200- μ m wavelength region. *Applied Optics*, **12**(3), pp. 555-563.
- [98] Malitson, I.H. (1965) Interspecimen comparison of the refractive index of fused silica. *Journal of the Optical Society of America*, **55**(10), pp. 1205-1208.
- [99] National Center for Biotechnology Information (marzo 2005). *Dibromomethane*. Agosto, 2016, de PubChem Compound Database Sitio web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3024>.
- [100] Wohlfarth, Ch. (2008). Refractive indices of pure liquids and binary liquid mixtures (Supplement to III/38). *Springer Berlin Heidelberg*, pp. 108-115.