



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA

TESIS DOCTORAL

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO
FUNCIONALIZADAS CON ALICINA EXTRAÍDA DE
Allium sativum (AJO)**

Para obtener el título de

Doctor en Ciencias de los alimentos y salud humana

Presenta:

M.C. Aldahir Alberto Hernández Hernández

No cuenta. 104163

Director:

Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Mineral de la Reforma, Hgo., mayo de 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
 INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA
 INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA

San Agustín, Tlaxiaca, Hgo., abril de 2021

ICSa-DCASH-abril 2021
 Asunto: Asignación de Jurado de Examen

M. en A. JULIO CESAR LEINES MEDÉCIGO
COORDINACIÓN DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

Por este medio se informa que el comité tutorial asignado al M. en C. Aldahir Alberto Hernández Hernández con número de cuenta 104163, estudiante del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana dio terminación al trabajo de tesis titulado “Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas con alicina extraída de *Allium sativum* (Ajo)”, y por lo tanto se autoriza la impresión del documento de tesis en extenso propuesto por el estudiante.

Lo anterior, en función de que, el estudiante realizó todas las correcciones, adiciones y/o modificaciones sugeridas por el comité en la revisión previa con fecha 24 de marzo de 2021. Por tal motivo, solicito a usted tenga a bien permitir al doctorando dar continuidad al proceso necesario que conlleve a la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

DR. RUBÉN JIMÉNEZ ALVARADO
 Director de tesis
 DRA. ALMA DELIA HERNÁNDEZ FUENTES
 Codirectora
 DRA. RAQUEL CARIÑO CORTES
 DR. LUIS HUMBERTO MENDOZA HUIZAR

A T E N T A M E N T E
 Pachuca, Hidalgo, 29 de abril del 2021
 “Amor, Orden y Progreso”

M en.C.Esp. Adrián Moya Escalera
 Director del Instituto de Ciencias de la Salud
 Dean

M. en N.C Arianna Omaña Covarrubias
 Jefa del Área Académica de Nutrición
 Chair of Academic Area of Nutrition

Dra. Lydia López Pontigo
 Coordinadora de Posgrado del ICSa
 Director of Graduate Studies of ICSa

Dra. Esther Ramírez Moreno
 Coordinadora del Programa Educativo
 Director of Graduate Studies



Dedicatoria

La realización de este proyecto no dependió de una sola persona debido a que participaron muchas personas ya sea asesorándome, motivándome o acompañándome en todo momento. Quiero dedicar esta tesis:

A mis padres, gracias por todo lo que han realizado por mí, sus palabras y consejos siempre están presentes en mi mente y me motivan para ser mejor cada día. También agradezco a mis hermanos por estar acompañándome en todo momento.

A Lizbeth Nava Martínez, gracias por estar presente desde la maestría y apoyarme en los momentos difíciles. Admiro tu determinación, tu forma de ver las cosas y espero contar contigo en los años venideros. Te amo mi Liz

A mis amigos, sobre todo al Doctor Juan Ramírez Godínez por su amistad durante todos estos años en donde compartimos risas, experiencias y tristezas. Me he dado cuenta de que eres una gran persona y es un honor haberte conocido. Gracias, mi hermano.

Finalmente, quiero agradecer a los profesores que no sólo influyeron en mi formación académica, sino que también contribuyeron a mi formación personal como al Dr Rubén Jimenez Alvarado, al Dr Giaan Arturo Alvarez Romero, a la Dra Elizabeth Contreras López y a la Dra Araceli Castañeda Ovando. Muchos de sus consejos y actitudes me han ayudado a crecer como persona y tener fortaleza.

Agradecimientos

- ❖ Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (Número de registro: 573426) para la realización de los estudios de Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

- ❖ El presente trabajo se realizó en el laboratorio post cosecha del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

- ❖ Al Doctor Rubén Jimenez Alvarado por la asesoría y el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto

- ❖ A la Doctora Alma Delia Hernández Fuentes por las facilidades para realizar los experimentos del trabajo

- ❖ Al Doctor Luis Humberto Mendoza Huizar por el apoyo en el análisis de las muestras obtenidas

- ❖ A la Doctora Raquel Cariño Cortes por la retroalimentación brindada

Índice general	
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	v
Listado de abreviaturas, siglas y símbolos	vi
Resumen	1
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES GENERALES	2
1.1. Introducción	2
1.2. Compuestos bioactivos y nanotecnología	3
1.3. Nanomateriales	4
1.3.1. Liposomas	5
1.3.2. Nanoemulsiones	5
1.3.3. Nanopartículas poliméricas	6
1.3.4. Nanopartículas sólido-lípido	7
1.3.5. Nanopartículas metálicas	7
1.4. Aplicaciones	7
1.5. Objetivos	9
1.5.1. General	9
1.5.2. Específicos	9
Referencias	10
CAPÍTULO 2. EXTRACCIÓN DE LA ALICINA	14
2.1. Introducción	14
2.2. Antecedentes generales	15
2.2.1 Composición química	16
2.2.1.1. Glutamil cisteína y sulfóxidos de cisteína	17
2.2.1.2. Tiosulfatos	18
2.2.2 Biodisponibilidad de compuestos organosulfurados	19
2.2.3 Efectos sobre la salud humana	19
2.2.3.1. Actividad antioxidante	19
2.2.3.2. Actividad cardioprotectora	19
2.2.3.3. Actividad quimiopreventiva	20
2.2.3.4. Actividad antimicrobiana	21
2.3. Metodología experimental	21
2.3.1. Preparación de la muestra	21

2.3.2. Extracción de alicina de <i>Allium sativum</i>	21
2.3.3. Cuantificación de la alicina.....	22
2.4. Resultados y discusión	24
2.4.1. Optimización de la extracción de alicina de <i>Allium sativum</i>	24
2.4.2. Optimización de la extracción	28
2.5. Conclusiones.....	29
Referencias	30
CAPÍTULO 3. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO.....	35
3.1. Introducción.....	35
3.2. Antecedentes	36
3.2.1. Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro	37
3.2.1.1. Coprecipitación.....	38
3.2.1.2. Descomposición térmica.....	38
3.2.1.3. Síntesis solvotérmica e hidrotérmica	39
3.2.1.4. Microemulsión	39
3.2.1.5. Métodos asistidos por ultrasonido	40
3.2.1.6. Síntesis verde.....	41
3.2.2. Funcionalización y estabilización de nanopartículas de óxido de hierro	41
3.2.2.1. Recubrimientos orgánicos	42
3.2.2.2. Recubrimientos inorgánicos	43
3.3. Metodología experimental.....	44
3.3.1. Síntesis y funcionalización de nanopartículas Fe ₃ O ₄ @TEOS asistida con ultrasonido	44
3.4. Resultados y discusión	46
3.4.1. Optimización de la síntesis y funcionalización de nanopartículas Fe ₃ O ₄ @TEOS asistida con ultrasonido	46
3.4.2. Experimentos confirmatorios	49
3.5. Conclusiones.....	49
Referencias	50
CAPÍTULO 4. FUNCIONALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE Fe₃O₄@TEOS@ALICINA.....	54
4.1. Introducción.....	54
4.2. Antecedentes	55

4.2.1. Caracterización de las nanopartículas	56
4.2.1.1. Técnicas microscópicas.....	56
4.2.1.2. Técnicas espectrofotométricas	56
4.2.1.3. Técnicas magnéticas	57
4.2.2. Aplicaciones de las nanopartículas con recubrimientos biológicos .	57
4.2.2.1. Aplicaciones biomédicas	58
4.2.2.2. Aplicaciones en el medio ambiente	59
4.2.2.3. Aplicaciones en la industria alimentaria	60
4.2.3. Toxicidad de IONPs	60
4.3. Metodología experimental	62
4.3.1. Síntesis de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ @TEOS@alicina.....	62
4.3.2. Caracterización de las nanopartículas de óxido de hierro.....	62
4.3.2.1. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) ..	62
4.3.2.2. Difracción de rayos X de polvos	62
4.3.2.3. Potencial Zeta.....	63
4.3.2.4. Termogravimetría	63
4.3.2.5. Microscopía Electrónica de Transmisión	63
4.3.2.6. Magnetometría de muestra vibrante	63
4.3.2.7. Prueba de recubrimiento	63
4.4. Resultados y discusión	64
4.4.1. Caracterización de nanopartículas	64
4.4.1.1. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier	64
4.4.1.2. Difracción de Rayos X de polvos.....	66
4.4.1.3. Potencial Zeta.....	67
4.4.1.4. Termogravimetría	68
4.4.1.5. Microscopía Electrónica de Transmisión	70
4.4.1.5. Magnetometría	72
4.4.1.6. Prueba de recubrimiento	74
Referencias	78

Figura 1.1. Clasificación de los fitoquímicos

Figura 1.2. Tipos de nanopartículas utilizadas como vehículos de compuestos bioactivos

Figura 2.1. Bulbos y segmentos de *Allium sativum*

Figura 2.2. Reacciones y estructuras químicas de los compuestos organosulfurados encontrados en *Allium sativum*

Figura 2.3. Estructura química de las glutamil cisteínas y sulfóxidos de cisteína presentes en *Allium sativum*

Figura 2.4. Superficies de respuesta y gráficos de contorno: temperatura vs pH (A), temperatura vs tiempo (B), temperatura vs relación masa-solvente (C), pH vs tiempo (D), pH vs relación masa-solvente (E), tiempo vs relación masa-solvente (F).

Figura 3.1. Representación del principio de nucleación de LaMer

Figura 3.2. Recubrimientos orgánicos e inorgánicos de las IONPs

Figura 3.3. Superficies de respuesta y gráficos de contorno: tiempo de reacción vs concentración de NH_4OH (A), tiempo de reacción vs tiempo de funcionalización (B), tiempo de funcionalización vs concentración de NH_4OH (C)

Figura 4.1. Aplicaciones de IONPs funcionalizadas con fitoquímicos presentes en plantas

Figura 4.2. Espectros de infrarrojo de nanopartículas Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@$ alicina

Figura 4.3. Difractograma de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@$ alicina

Figura 4.4. Variación del potencial zeta de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@$ alicina en función del pH

Figura 4.5. Termogravimetría de las nanopartículas de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@$ alicina

Figura 4.6. Microscopías de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@$ alicina

Figura 4.7. Magnetogramas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@$ alicina

Figura 4.8. (A) Concentración de la alicina vs mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$. (B) % DPPH remanente vs mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$. (C) Actividad ABTS^+ vs mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$

Índice de tablas

Pág.

Tabla 2.1. Composición proximal del ajo en dientes y en polvo

Tabla 2.2. Niveles de los factores de control elegidos en la optimización de la extracción

Tabla 2.3 Matriz del diseño experimental para la extracción de alicina. Dónde: Factor A=Temperatura, Factor B=pH, Factor C=Tiempo y Factor D=Relación masa/volumen.

Tabla 2.4. Matriz del diseño experimental para la extracción de alicina. Dónde: Factor A=Temperatura, Factor B=pH, Factor C=Tiempo y Factor D=Relación masa/volumen.

Tabla 2.5. Experimentos confirmatorios para la extracción de alicina

Tabla 3.1. Niveles de los factores de control elegidos en la optimización de tamaño

Tabla 3.2. 3.2. Matriz del diseño experimental para la extracción de alicina. Dónde: Factor A=Tiempo de Reacción, Factor B= Concentración de NH_4OH , Factor C=Tiempo de Funcionalización

Tabla 3.3. Matriz del diseño experimental para el tamaño de partícula. Dónde: Factor A=Tiempo de reacción, Factor B=Concentración de NH_4OH , Factor C=Tiempo de funcionalización

Tabla 3.4. Experimentos confirmatorios para la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro

Listado de abreviaturas, siglas y símbolos

Abreviatura, sigla o símbolo	Significado
DRX	Difracción de rayos X
DNTB	Ácido 2-nitrobenzoico
Fe ₃ O ₄	Óxido de hierro (II,III)
FT-IR	Infrarrojo por Transformadas de Fourier
GC	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
IONPs	Nanopartículas de óxido de hierro
Mg	Miligramo
µL	Microlitro
mM	Milimolar
Nm	Nanómetros
NH ₄ OH	Hidróxido de amonio
SEM	Microscopio electrónico de barrido
SQUID	Dispositivo de interferencia cuántica superconductora
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEOS	Tetraetilortosilicato
VSM	Magnetometría de muestra vibrante
W:O	Agua:aceite (por sus siglas en Inglés)
Z	Potencial zeta

Resumen

En el presente trabajo se realiza la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas con extracto de alicina de *Allium sativum*, para lo cual el escrito se divide en tres capítulos. En el primer capítulo se presentan los *Antecedentes generales*, donde se hace una revisión acerca de los compuestos bioactivos de plantas, su relación con diversos nanomateriales y se hace una investigación de las características de *Allium sativum* y sus beneficios en la salud humana; terminando con el planteamiento de los objetivos de la investigación. El segundo capítulo trata de la *Extracción de alicina de Allium sativum* considerando parámetros como el pH, temperatura, tiempo y la cantidad de solvente. Para el tercer capítulo se trabajó en la *Síntesis y funcionalización de las nanopartículas de óxido de hierro*, presentando la síntesis por el método de coprecipitación asistido con ultrasonido, su funcionalización con tetraetilortosilicato considerando diversos factores como la temperatura y tiempo. Además, se realizó incorporación de la alicina en la nanopartícula. Por último, el cuarto capítulo se relaciona con la *Funcionalización y Caracterización de las nanopartículas* mediante diversas técnicas y se corrobora la incorporación de alicina en el material sintetizado.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. Introducción

Los compuestos bioactivos son aquellos compuestos químicos que ejercen un efecto benéfico para alguna función biológica de un individuo produciendo una mejora en la salud y bienestar reduciendo el riesgo de padecer alguna enfermedad, están presentes en pequeñas cantidades y pueden ser de origen natural o sintético (Guaadaqui et al. 2014; Biesalski et al. 2009).

Los fitoquímicos de la dieta son compuestos bioactivos presentes en frutas, verduras, granos enteros y otros alimentos vegetales, los cuales exhiben propiedades anticancerígenas, antimicrobianas, antioxidantes, antidiarreicas, analgésicas, y cardioprotectoras (Liu, 2004). Los fitoquímicos más importantes se pueden dividir en cinco categorías: compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados, compuestos organosulfurados y terpenos (Liu, 2013; Christianson et al. 2017). La Figura 1.1 muestra la clasificación y subgrupos de los fitoquímicos.

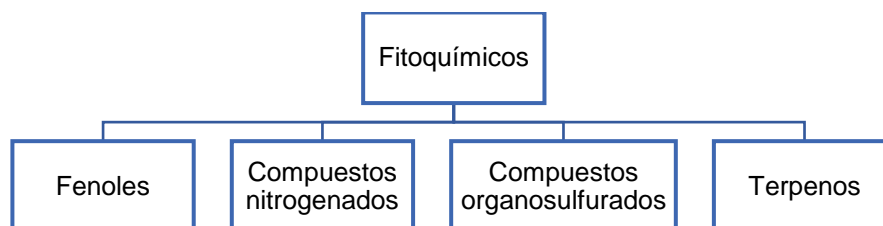


Figura 1.1. Clasificación de los fitoquímicos

Los compuestos fenólicos están presentes en gran variedad de frutas, vegetales, nueces, semillas, flores y cortezas de árbol. Los fenoles se clasifican en diferentes moléculas como flavonoides, estilbenos y lignanos (Cutrim y Cortez, 2018). Por otro lado, los compuestos nitrogenados contienen átomos de nitrógeno y son metabolitos secundarios liberados por las plantas como mecanismo de defensa. Existen tres grupos de compuestos nitrogenados: alcaloides, glucosinolatos y aminoácidos no proteicos (Zenk y Juenger, 2007).

Otros fitoquímicos son los compuestos organosulfurados los cuales están presentes en vegetales del género *Allium* o *Brassica* y son fácilmente identificables por su aroma en caso de plantas como el ajo o cebolla (Ruhee et al. 2020). Los fitoesteroles

son compuestos estructuralmente relacionados con el colesterol y se encuentran en vegetales o nueces con una elevada concentración de aceites (Rocha et al. 2011). Por otra parte, los carotenoides son pigmentos liposolubles responsables de los colores rojo, naranja o amarillo en muchos vegetales y frutas. Estas moléculas son isoprenoides que constan de ocho unidades de isopreno en una cadena larga de polieno, siendo el β -caroteno el miembro más destacado del grupo de carotenoides (Maoka, 2019).

Comparado con las medicinas sintéticas disponibles, muchos de los fitoquímicos antes mencionados tienen un papel importante en la prevención y tratamiento de enfermedades modernas como el cáncer o diabetes ya que son más seguras, eficaces y con menores efectos secundarios (Liu, 2013).

1.2. Compuestos bioactivos y nanotecnología

Debido a los múltiples beneficios de consumir compuestos bioactivos, la demanda de estos se ha incrementado en los últimos años. Los factores clave que han dado lugar a este crecimiento incluyen el aumento de los trastornos metabólicos (enfermedades cardíacas, obesidad, diabetes y artritis) y las enfermedades relacionadas con la edad, por lo que es necesario tener una mayor disponibilidad de información científica sobre la relación entre la dieta y la salud. Sin embargo, es importante considerar los siguientes aspectos: la bioactividad potencial de compuestos beneficiosos, el establecimiento de niveles óptimos de consumo y el desarrollo de matrices adecuadas de suministro de alimentos y formulaciones de productos (Frewer et al. 2003).

Generalmente, el consumo de los compuestos bioactivos se realiza en medio acuoso porque aumenta la palatabilidad, aceptabilidad y bioactividad. Sin embargo, la mayoría de estos compuestos no se dispersan fácilmente en agua y son susceptibles a la oxidación. Además, la incorporación de compuestos bioactivos en alimentos presenta problemas sensoriales y de estabilidad comprometiendo los beneficios de la salud. La nanotecnología tiene el potencial de proporcionar nuevas soluciones en el desarrollo de alimentos funcionales, en particular la inclusión de

compuestos bioactivos sin afectar la percepción sensorial del consumidor y mejorar la absorción de ciertos componentes (Bigliardi et al. 2013; Singh, 2016).

La nanotecnología se define como el diseño, la producción y la aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control del tamaño y la forma del material a escala nanométrica (<100 nm). Actualmente, ha aumentado el estudio en el desarrollo de sistemas de liberación y protección de sustancias biológicamente activas de origen alimentario, utilizando enfoques de nanotecnología. Muchos nutrientes, compuestos bioactivos y fitoquímicos pueden ser cargados en nanopartículas biocompatibles y biodegradables, lo que mejorará su solubilidad acuosa, estabilidad, biodisponibilidad y tiempo de circulación en el cuerpo (Vranic et al. 2015; Singh, 2016; Visweswara et al. 2016).

En comparación con los sistemas de tamaño micrométrico producidos por técnicas tradicionales, los sistemas de liberación de tamaño nanométrico proporcionan una mayor área superficial y tienen el potencial de mejorar la solubilidad, la biodisponibilidad, la liberación controlada y permitir una mayor selectividad de los compuestos bioactivos.

1.3. Nanomateriales

Los nanomateriales con diámetros de partícula que son inferiores a 100 nm pueden clasificarse como nanopartículas (Laurent *et al.* 2010). Este tipo de sistemas proporcionan mayor estabilidad de los compuestos bioactivos, mejoran la absorción y la biodisponibilidad (McClements et al. 2009; Onwulata, 2012). Existen diversos tipos de nanopartículas que han sido reportadas como los liposomas, las nanoemulsiones, las nanopartículas poliméricas, las nanopartículas sólido-lípido y las nanopartículas metálicas (Figura 1.2) (Vranic et al. 2015; Singh, 2016; Visweswara et al. 2016).

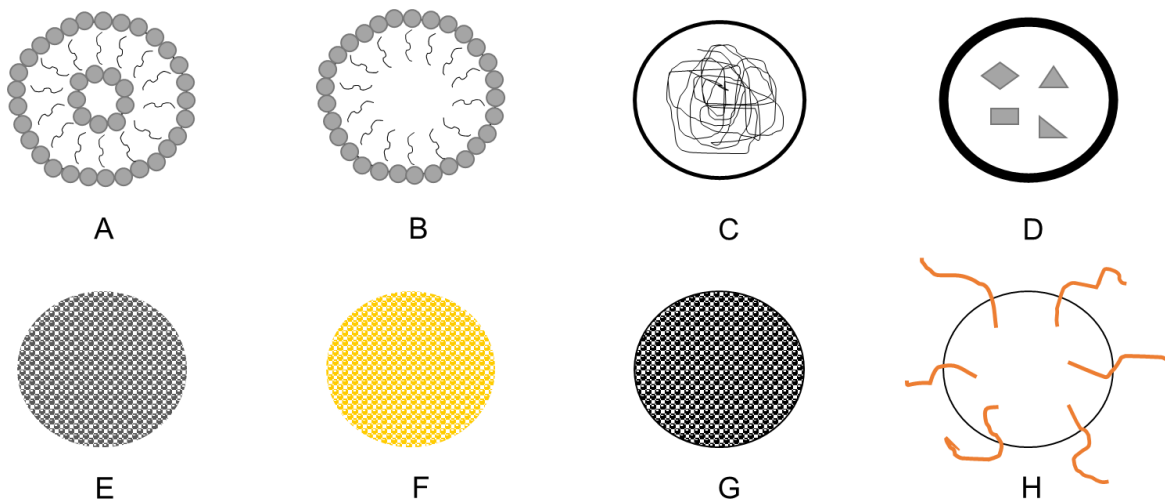


Figura 1.2. Tipos de nanopartículas utilizadas como vehículos de compuestos bioactivos. A=liposomas, B= nanoemulsiones C= nanopartículas poliméricas, D= nanopartículas sólido-lípido, E= nanopartículas de Ag, F= nanopartículas de Au, G=nanopartículas de óxido de hierro y H=quantum dots [Elaboración propia]

1.3.1. Liposomas

Los liposomas son estructuras esféricas con diámetros entre los 20 nm hasta micrómetros, los cuales están formados por una o más capas de moléculas anfifílicas como los fosfolípidos. Las sustancias hidrófilas se solubilizan en el núcleo acuoso interno y se pueden incorporar fármacos lipófilos en las capas lipídicas (Puglia et al. 2012). La liberación del material encapsulado puede llevarse a cabo por cambios de pH y temperatura (Thompson et al. 2009).

Los liposomas se han utilizado para encapsular vitamina C (Zhou et al. 2014), antioxidantes como los carotenoides (Tan et al. 2014), proteínas como la lactoferrina (Liu et al. 2013), minerales como el hierro (Xia et al. 2005) y ácidos grasos de cadena media (Liu et al. 2011). Sin embargo, el uso de liposomas tiene como desventajas el alto costo de los fosfolípidos y la producción continua a gran escala. Además, aún no hay mucha información de este tipo de sistemas relacionada con la biodisponibilidad y la eficacia (Singh, 2016).

1.3.2. Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones consisten en la dispersión de un líquido inmisible en otro en forma de gotas muy pequeñas (entre 20 y 200 nm). Las nanoemulsiones pueden

ser del tipo agua en aceite (W/O) o del tipo aceite en agua (O/W) (Tadros et al. 2004). Este tipo de sistemas presentan una mayor estabilidad cinética frente a la floculación debido al tamaño pequeño y la baja viscosidad (Gutiérrez et al. 2008).

Las nanoemulsiones se han utilizado en la liberación de fármacos de naturaleza lipófila pero la aplicación en el sector alimentario es limitada debido al alto costo de producción y la búsqueda de tensoactivos de calidad alimentaria adecuados (Parhi et al. 2012; Singh, 2016).

1.3.3. Nanopartículas poliméricas

Para este tipo de nanopartículas se utilizan las propiedades de las proteínas para formar geles. La estructura de gel sirve como matriz para encapsular moléculas activas. Durante la formación del gel, se pueden producir hidrogeles, micropartículas y nanopartículas. La principal ventaja de las nanopartículas poliméricas es la variedad de modificaciones químicas que se pueden realizar. Sin embargo, para la formación de este soporte se requiere de un tratamiento térmico por lo que puede haber problemas de estabilidad de los compuestos bioactivos que sean termolábiles.

Además, se liberan solventes orgánicos residuales los cuales pueden ser tóxicos y la hidrólisis del polímero transcurre durante el almacenamiento por lo que es necesario utilizar liofilización para conservar estas nanopartículas (Chen et al. 2006; Thukral et al. 2014).

Por otro lado, se han utilizado biopolímeros formados a partir de proteínas y polisacáridos para encapsular, proteger y suministrar compuestos bioactivos. Para ello, se modifica el punto isoeléctrico de las proteínas cargándolas positivamente lo que permite que puedan interactuar con polisacáridos con grupos carboxilo, fosfato o sulfato. Las características de este tipo de sistema dependen de los tipos y concentraciones de biopolímeros utilizados, así como del pH de la solución y de la fuerza iónica (Jiménez-Alvarado et al. 2009).

1.3.4. Nanopartículas sólido-lípido

Las nanopartículas sólido-lípido se describen como un sistema lipófilo sólido y se forman a partir de lípidos que se solidifican a temperatura ambiente creando una matriz cristalina o amorfa en la que se incorporan los compuestos bioactivos (Puglia et al. 2012). Las nanopartículas sólido-lípido se han utilizado en la administración de fármacos, pero su uso en alimentos es muy limitado. Una desventaja de este tipo de soporte es la posible descomposición de compuestos termolábiles durante su producción (Singh, 2016).

1.3.5. Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas tienen diferentes formas y tamaños (entre 10 y 100 nm), las cuales han sido ampliamente utilizadas para la liberación de fármacos. Los metales más usados para este tipo de soportes son el oro, la plata, óxido de hierro o zinc, dióxido de titanio. Otro tipo de partículas metálicas utilizadas son las nanopartículas redox-activas y los puntos cuánticos (Mody et al. 2010; Salouti y Ahangari, 2014; Vranic et al. 2015).

Las nanopartículas metálicas tienen una alta superficie de contacto y debido a su tamaño nanométrico se han utilizado en aplicaciones biomédicas como el tratamiento de cáncer (Mody et al. 2009).

1.4. Aplicaciones

Este tipo de materiales han sido utilizados con éxito en la industria farmacéutica. (Vranic et al. 2015; Singh, 2016; Visweswara et al. 2016). Además, la incorporación de compuestos bioactivos en nanomateriales ha sido utilizada en aplicaciones biomédicas como la liberación de fitoquímicos, hipertermia magnética, agente de contraste. También se ha usado en la remediación del medio ambiente para tratamiento de aguas residuales y en la fabricación de filtros de contaminantes. También los nanomateriales se han utilizado en la tecnología alimentaria en la liberación de agroquímicos y en el desarrollo de antimicrobianos y nanosensores (Ali et al. 2016; Gallocchio et al. 2015). Además, estos nanomateriales han sido

utilizados como aditivos, vehículos de nutrientes y agentes que mejoran la resistencia mecánica y durabilidad del empaque. Sin embargo, las nanopartículas deben ser compatibles con la matriz alimentaria y no afectar la apariencia, sabor, color, textura y vida útil del producto (Singh et al. 2017).

Por otro lado, las nanopartículas han sido utilizadas como sistemas de administración de fármacos donde las nanopartículas se unen con medicamentos o biomoléculas en la estructura interior o exterior de la misma. Actualmente, las nanopartículas se utilizan en la liberación de fármacos, proteínas, genes, vacunas, polipéptidos, ácidos nucleicos o fitoquímicos provenientes de plantas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Zahin et al. 2020; Yew et al. 2018).

1.5. Objetivos

1.5.1. General

Obtener nanopartículas de óxido de hierro mediante coprecipitación y funcionalizarlas con alicina extraída de *Allium sativum* para caracterizarlas mediante diversas técnicas

1.5.2. Específicos

- Extraer alicina a partir de *Allium sativum* mediante maceración con solventes para ser utilizados como recubrimiento de las nanopartículas de óxido de hierro.
- Sintetizar nanopartículas de óxido de hierro mediante coprecipitación para ser funcionalizadas con sílice y alicina.
- Caracterizar las nanopartículas de óxido de hierro mediante difracción dinámica de luz láser, microscopía electrónica de transmisión, difracción de rayos X y espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier para comprobar su funcionalización.

Referencias

Ali A, Zafar H, Zia M, Haq I, Phull AR, Ali JS, Hussain A (2016) Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications*, 9:49–67.

Biesalski H, Dragsted L, Elmadfal M, Grossklaus R, Muller M, Schrenk D, Walter P, Weber P (2009) Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 1–4

Bigliardi B, Galati F (2013) Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. *Trends Food Sci Technol* 31:118-129.

Chen L, Remondetto G, Subirade M (2006) Food protein- based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 272-283

Christianson DW (2017) Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. *Chemical Reviews*, 117: 11570-11648

Cutrim CS, Cortez MAS (2018) A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), 564–578.

Frewer L, Scholderer J, Lambert N (2003) Consumer acceptance of functional foods: issues for the future. *British Food Journal*. 105: 714-731.

Gallocchio F, Belluco C, Ricci A (2015) Nanotechnology and food: brief overview of the current scenario. *Procedia Food Science*, 5:85–88.

Guaadaqui A, Benaicha S, Elmajdoub N, Bellaoui M, Hamal A (2014) What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*; 3(3): 174-179

Gutiérrez JM, González C, Maestro A, Solè I, Pey CM, Nolla J (2008) Nano-emulsions: new applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13: 245- 251.

Jiménez-Alvarado R, Beristain CI, Medina-Torres L, Román-Guerrero A, Vernon-Carter EJ (2009) Ferrous bisglycinate content and release in $W_1/O/W_2$ multiple emulsions stabilized by protein–polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids*, 23: 2425-2433

Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, Muller RN (2010) Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews*, 110: 2574–2574

Liu RH (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134:3479–85.

Liu RH (2013) Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. *Journal of Food Science*, 78: 18-25

Liu W, Liu WL, Liu CM, Liu JH, Yang SB, Zheng HJ, Lei HW, Ruan R, Li T, Tu ZC, Song XY (2011) Medium-chain fatty acid nanoliposomes for easy energy supply. *Nutrition*, 27: 700- 706

Liu W, Ye A, Liu W, Liu C, Singh H (2013) Stability during in vitro digestion of lactoferrin-loaded liposomes prepared from milk fat globule membrane-derived phospholipids. *Journal of Dairy Science*, 96: 2061-2070.

Maoka T (2019) Carotenoids as natural functional pigments, *Journal of Natural Medicines*, 1-15

McClements DJ, Decker EA, Park Y, Weiss J (2009) Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49: 577-606

Mody VV, Siwale R, Singh A, Mody HR (2010) Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2(4), 282–289.

Onwulata CI (2012) Encapsulation of new active ingredients. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3: 183-202.

Parhi R, Suresh P (2012) Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles-a review. *Current Drug Discovery Technologies*, 9:2-16

Puglia C, Bonina F (2012) Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals. *Expert Opinion Drug Delivery*, 9:429-441

Rocha M, Banuls C, Bellod L, Jover A, Victor VM, Hernández-Mijares A (2011) A review on the role of phytosterols: new insights into cardiovascular risk. *Current Pharmaceutical Design*, 17(36): 4061–4075

Ruhee RT, Roberts LA; Ma S, Suzuki K (2020) Organosulfur Compounds: A Review of Their Anti-inflammatory Effects in Human Health. *Frontiers in Nutrition*, 1-8

Salouti M, Ahangari A (2014) Application of Nanotechnology in Drug Delivery. Chapter 5: Nanoparticle based Drug Delivery Systems for Treatment of Infectious Diseases. ISBN. 978-953.

Singh H (2016) Nanotechnology Applications in Functional Foods; Opportunities and Challenges. *Preventive Nutrition and Food Science*. 21:1-8

Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C (2004) Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109: 303-318.

Tan C, Xue J, Abbas S, Feng B, Zhang X, Xia S (2014) Liposome as a delivery system for carotenoids: comparative antioxidant activity of carotenoids as measured by ferric reducing antioxidant power, DPPH assay and lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 6726-6735.

Thompson AK, Couchoud A, Singh H (2009) Comparison of hydrophobic and hydrophilic encapsulation using liposomes prepared from milk fat globule-derived phospholipids and soya phospholipids. *Dairy Science and Technology*, 89: 99-113.

Thukral DK, Dumoga S, Mishra AK (2014) Solid lipid nanoparticles: promising therapeutic nanocarriers for drug delivery. *Current Drug Delivery*, 11:771-791

Visweswara P, Nallappan D, Madhavi K, Rahman S, Wei L, Gan S (2016). Phytochemicals and Biogenic Metallic Nanoparticles as Anticancer Agents. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1- 15

Vranić E, Rahić O, Hadžiabdić J, Elezović A, Bošković D (2015) Opportunities and challenges for utilization of nanoparticles as bioactive drug carriers for the targeted treatment of cancer. *Folia Medica Facultatis Medicinae Universitatis Sarajevisis*; 50(1): 34-39

Xia S., Xu S. (2005). Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Research International*, 38: 289- 296

Yew YP, Shameli K, Miyake M, Khairudin NBB, Mohamad SEB, Naiki T, Lee KX (2018) Green biosynthesis of superparamagnetic magnetite Fe₃O₄ nanoparticles and biomedical applications in targeted anticancer drug delivery system: a review. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1): 2287-2308

Zahin N, Anwar R, Tewari D, Kabir T, Sajid A, Mathew B, Uddin S, Aleya L, Abdel-Daim MM (2020) Nanoparticles and its biomedical applications in health and diseases: special focus on drug delivery *Environmental Science and Pollution Research*, 27:19151–19168

Zenk MH, Juenger M (2007) Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 68: 2757-2772.

Zhou W, Liu W, Zou L, Liu W, Liu C, Liang R, Chen J (2014) Storage stability and skin permeation of vitamin C liposomes improved by pectin coating. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117: 330-337.

CAPÍTULO 2. EXTRACCIÓN DE LA ALICINA

2.1. Introducción

El ajo (*Allium sativum*) es un miembro de la familia de las *Aliáceas* y es una de las plantas más utilizadas en la antigüedad. Se han fabricado diversos productos derivados del ajo como tabletas, cápsulas, jarabes, tinturas, aceites, repelentes e insecticidas. También el ajo se ha usado ampliamente como especia y agente medicinal debido a la presencia de tiosulfatos (Singh y Singh, 2008). Cuando los dientes de ajo son cortados o molidos, la enzima alinasa se libera y reacciona con aliina formando alicina, la cual representa el 70% (p/p) del total de tiosulfatos (Mathialagan et al. 2017). La alicina es el compuesto bioactivo más importante en ajo y ha probado su efectividad como agente cardioprotector, antitumoral, antimicrobiano, antioxidante, e hipoglucémico (Amarakoon y Jayasekara, 2017). Por otro lado, la alicina es soluble en solventes no polares mientras que en solventes polares como el agua se mantiene estable. Uno de los métodos más utilizados para la extracción de alicina consiste en la maceración con soluciones hidroalcohólicas (Mathialagan et al. 2017; Wang et al. 2014). Fujisawa y colaboradores (2008) reportaron una alta estabilidad de la alicina en soluciones de agua-etanol (70-30%) debido a la hidrofobicidad de este compuesto. Usualmente, los métodos para la cuantificación de alicina son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases (GC). Sin embargo, la baja resolución y la necesidad de estándares limitan la aplicación de HPLC y GC. Además, el análisis de GC requiere altas temperaturas afectando la estabilidad de la alicina (Zhou et al. 2015). Han y colaboradores (1995) desarrollaron un método espectrofotométrico simple y rápido que consiste en una reacción colorimétrica entre la alicina y el ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DNTB). Por lo tanto, en este capítulo se realizó un diseño experimental Box-Behnken con la finalidad de evaluar el efecto de cuatro factores independientes sobre la concentración de alicina extraída. Para la cuantificación de la alicina se calculó con un método espectrofotométrico simple y una vez realizado el análisis estadístico se obtuvieron los factores que más influyen en la extracción de alicina.

2.2. Antecedentes generales

Originalmente de Asia Central, el ajo (*Allium sativum*) es una planta perteneciente a la familia de las liliáceas que se ha cultivado a través del mundo. La medicina del antiguo Egipto menciona el ajo como un remedio eficaz para una variedad de malestares como afecciones bronquiales y pulmonares, incluidos los resfriados e influenza (Murray, 2005).

A. sativum se divide en dos subespecies: *A. sativum* var. *sativum*, conocido como ajo blando, y *A. sativum* var. *ophioscorodon*, conocido como ajo duro. Ambas variedades se componen de un bulbo subterráneo compuesto por varios segmentos denominados dientes, los cuales están envueltos por pieles membranosas secas y unidas por una placa basal (Block, 2010).



Figura 2.1. Bulbos y segmentos de *Allium sativum*

Las subespecies se diferencian en que el bulbo del ajo duro del cuello se compone de seis a once dientes, mientras que el ajo blando contiene hasta veinticuatro dientes por bulbo. *A. sativum* es la variedad más común (Figura 2.1), muchos estudios sobre el ajo no especifican qué subespecies se utilizan, pero se supone que la acción química y biológica es similar. *A. sativum* es estéril, por lo que se cultiva asexualmente utilizando dientes de ajo sin un polinizador. Crece mejor en climas templados, aunque la variedad *sativum* se adapta mejor a los ambientes más fríos y es una especie perenne, al igual que la mayoría de los miembros del género.

El ajo se compone de compuestos organosulfurados muy fuertes que son metabolitos secundarios, los cuales son responsables del olor y sabor pungente.

Además, actúan como defensa contra los depredadores (Block, 2010). Los compuestos organosulfurados son un grupo de fitoquímicos que contienen átomos de azufre unidos con átomos de carbono. También se encuentran en vegetales de la familia *Cruciferae* como las coles. Se ha demostrado que los compuestos organosulfurados de estas hortalizas presentan efecto anticancerígeno, antiaterogénico, antitrombótico, antiinflamatorio, antimicrobiano y poseen una elevada actividad antioxidante (Frankel et al. 2016).

2.2.1 Composición química

El ajo se compone de aproximadamente 65% de agua, 28% de carbohidratos (furanos), 2.3% de compuestos organosulfurados, 2% de proteínas (alinasas), 1.2% de aminoácidos libres (arginina) y 1.5% de fibra (Santhosha et al. 2013). La Tabla 2.1 muestra la composición proximal del ajo en los dientes y en polvo reportada por Pruthi (1998).

Tabla 2.1. Composición proximal de ajo en dientes y en polvo (Pruthi 1998)

Componente	Dientes de ajo	Ajo en polvo
Humedad (%)	62.8	5.2
Carbohidratos (%)	29.0	71.4
Proteína (%)	6.3	17.5
Grasa (%)	0.01	0.6
Fibra (%)	0.8	1.9
Calcio (%)	0.03	0.1
Fosforo (%)	0.31	0.42
Hierro (%)	0.001	0.004
Vitamina C (mg/100 g)	13.00	12.00

A. sativum se caracteriza por su alto contenido de compuestos organosulfurados los cuales le dan el distintivo olor y pungencia. Cuando un diente de ajo está intacto, la glutamil-cisteína es el principal componente azufrado (Powolynny y Singh, 2008). Éstos se hidrolizan para formar aliina y cuando el ajo es molido por masticar, cortar, etc., la aliina reacciona rápidamente (aprox. 30 s) con la enzima aliinasa para formar alicina en un 97%.

La alicina es un tiosulfonato de dialilo que representa el 70-80% de los tiosulfonatos presentes en *A. sativum* (Harunobu et al. 2001). La alicina es altamente inestable por lo que se oxida rápidamente para producir compuestos de azufre como sulfuros

de dialilo, disulfuros de dialilo, trisulfuros de dialilo, vinilditinas y ajoenos (Banerjee y Maulik, 2002). Las reacciones químicas de estos compuestos se muestran en la Figura 2.2.

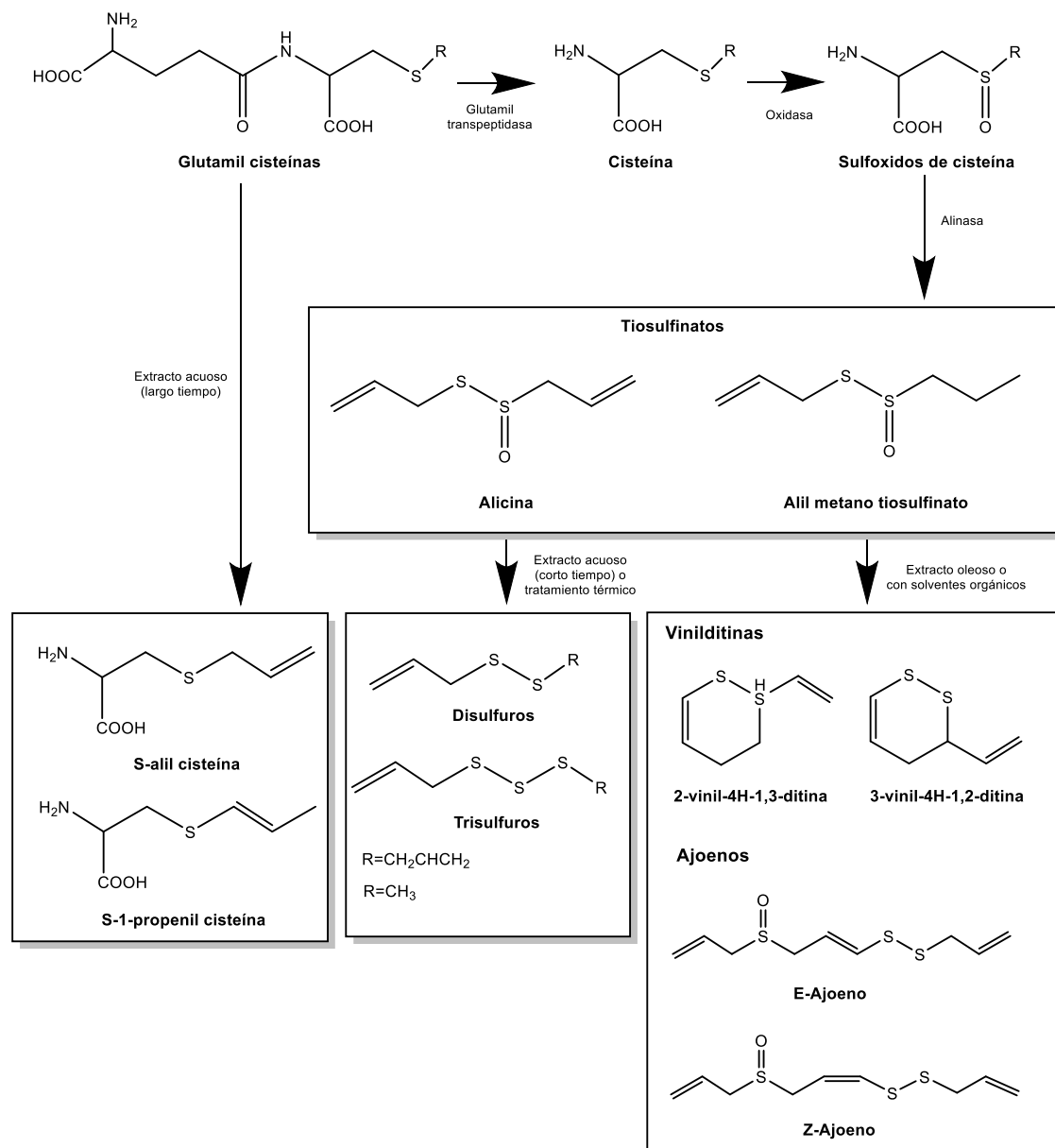


Figura 2.2. Reacciones y estructuras químicas de los compuestos organosulfurados encontrados en *Allium sativum* [Elaboración propia]

2.2.1.1. Glutamil cisteína y sulfóxidos de cisteína

Durante la germinación y desarrollo del ajo, las glutamil- cisteínas (glutamil-S-trans-1-propenil cisteína, glutamil-S-alil cisteína y glutamil-S-metil cisteína) son hidrolizadas para formar sulfóxidos de cisteína (aliina, metiina e isoaliina) (Figura

2.3). Este proceso también ocurre en el almacenamiento y rápidamente a bajas temperaturas. El contenido de sulfóxidos de cisteína es de 8-19 mg/g y de los glutamil-cisteínas de 5-16 mg/g, ambos tipos de compuestos corresponden al 82% del total de compuestos organosulfurados en ajo fresco (Lawson, 1993). El bulbo del ajo contiene la mayor cantidad sulfóxidos de cisteína con un 85%, seguido de las hojas con un 12% y las raíces con un 2%. Como se mencionó anteriormente cuando el ajo se corta o muele, la enzima alinasa convierte los sulfóxidos de cisteína en tiosulfatos. La formación de tiosulfatos ocurre rápidamente y su estabilidad depende del solvente, temperatura, concentración y pureza (Lawson, 1998).

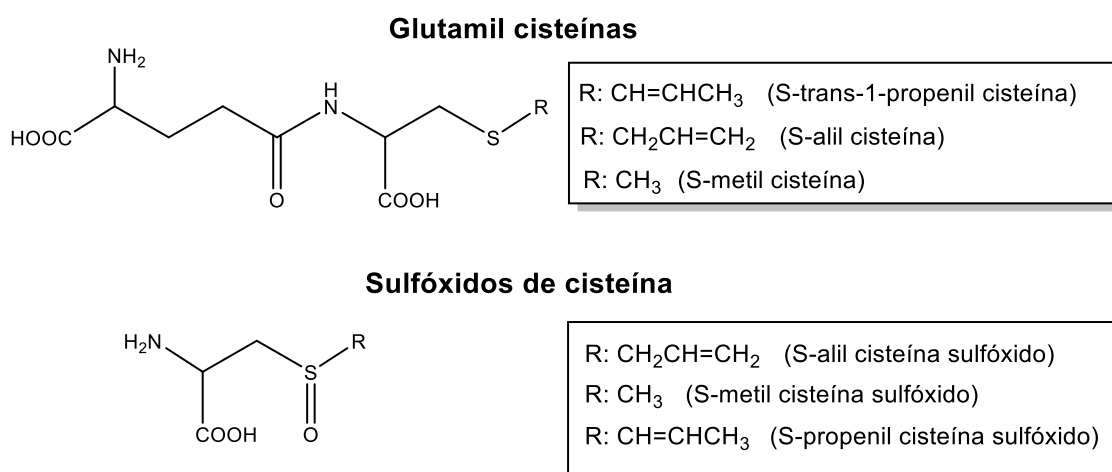


Figura 2.3. Estructura química de las glutamil cisteínas y sulfóxidos de cisteína presentes en *Allium sativum* [Elaboración propia]

2.2.1.2. Tiosulfatos

La alicina formada por aliinasa es el compuesto más abundante de los tiosulfatos (aprox. 70%), otros tiosulfatos se forman en concentraciones pequeñas. La alicina es soluble en solventes orgánicos con alta polaridad y poco soluble en agua. Además, su estabilidad en agua disminuye a las 16 h (Lawson, 1993).

Por otro lado, la maceración de alicina en solventes de baja polaridad produce principalmente vinilditinas y ajoenos en menor proporción, la maceración en alcohol forma ajoenos, trisulfuros de dialilo y viniditinas. El calor forma tiosulfatos volátiles como los sulfuros de dialilo, disulfuros de dialilo y trisulfuros de dialilo. (Lawson, 1993; Shantosha et al. 2013).

2.2.2 Biodisponibilidad de compuestos organosulfurados

Guo y colaboradores (1990) reportaron la biodisponibilidad de la aliina en ratones observando la presencia de este compuesto en estómago (7.2%), intestino (22.4%) e hígado (2.5%), por lo que la aliina no produce otros subproductos como los tiosulfatos. En un estudio farmacocinético, la aliina se conservó en el hígado de rata, lo que indica que la aliina no se transforma en alicina en el cuerpo (Lachmann et al. 1994). Sin embargo, es necesario realizar más estudios para entender el metabolismo de los fitoquímicos presentes del ajo en el organismo.

2.2.3 Efectos sobre la salud humana

Allium sativum y los compuestos organosulfurados han demostrado tener una actividad funcional como antiaterogénico, antitrombótico, antiinflamatorio antimicrobiano y poseen una elevada actividad antioxidante (Frankel et al. 2016).

2.2.3.1. Actividad antioxidante

Los radicales libres han sido relacionados con varias condiciones patológicas como el cáncer, isquemia, inflamación, diabetes y aterosclerosis (Wilson et al. 2007; Vina et al. 2006). El ajo viejo posee una actividad antioxidante mucho mayor que el ajo fresco en soluciones acuosas debido a que se extraen compuestos como la S-alil cisteína y S-alil mercapto cisteína los cuales poseen una alta actividad antioxidante (Amagase et al. 2001). Lau y colaboradores (2006) reportaron que los extractos de ajo viejo mejoran la actividad enzimática de las células inhibiendo las especies reactivas de oxígeno. Los compuestos organosulfurados también previenen la formación de agentes proinflamatorios al interactuar con los radicales libres (Wilson y Demmig-Adams, 2007).

2.2.3.2. Actividad cardioprotectora

Las enfermedades cardiovasculares involucran un conjunto de trastornos del corazón y vasos sanguíneos debido a la alta presencia de lípidos (colesterol y triglicéridos) en el suero sanguíneo. Además, las especies reactivas de oxígeno

interaccionan con las lipoproteínas de baja densidad (LDL) lo que se considera el principal factor en el desarrollo de aterosclerosis (Dhawan y Jain, 2004).

Los compuestos volátiles del ajo se encuentran en la fracción oleosa y son los responsables de la actividad antiaterogénica (Jain y Konar, 2004). Por otro lado, la alicina tiene un efecto en la aterosclerosis debido a que actúa como antioxidante e inhibe el incremento de LDL y la activación por macrófagos (Gonen et al. 2005). Otro posible efecto al consumir ajo es la inhibición de la actividad hepática y enzimas colesterogénicas como la enzima málica, glucosa-6-fosfatasa deshidrogenasa y la 3-hidroxi-3-metilglutarilCoA (HMG CoA) reductasa, las cuales incrementan la síntesis de colesterol y la supresión de LDL (Mathew y Biju, 2008).

Los trisulfuros de alilo son el principal constituyente de extractos oleosos y poseen actividad antitrombótica en animales debido a la inactivación de trombina. Sin embargo, el exceso de compuestos azufrados disminuye el conteo de plaquetas en plasma, el mecanismo de acción aún no está definido (Chan et al. 2007). Murherjee y colaboradores (2009) demostraron que el ajo fresco molido tiene un efecto cardioprotector en ratas reduciendo la apoptosis celular.

2.2.3.3. Actividad quimiopreventiva

Los compuestos sulfurados del ajo tienen la capacidad de acumular selenio, el cual es esencial para la producción de glutatión peroxidasa que es una enzima antioxidante. Los efectos protectores del ajo se pueden deber a su capacidad para bloquear la activación y la formación de sustancias que causan cáncer, mejorar la reparación del ADN, reducir la proliferación celular o inducir la muerte de células cancerosas y proteger las células inmunes contra las células cancerosas (Santhosha et al. 2013).

Los compuestos volátiles del ajo han demostrado tener actividad antitumoral debido a que presentan citotoxicidad en células tumorales (Borkowska, 2013). El ajoeno es un compuesto soluble en aceite e induce apoptosis en células leucémicas debido a que estimula la producción de peróxido y la activación de enzimas detoxificantes

(Tsubara et al. 2011). El ajoeno y la alicina han demostrado su actividad antiproliferativa en células tumorales (Li et al. 2002; Lin et al. 2002).

2.2.3.4. *Actividad antimicrobiana*

Se ha demostrado que el ajo es eficaz contra diversos microorganismos como *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* (Adler y Beuchat, 2002), *Staphylococcus aureus* (Cavallito, 1994), *Clostridium botulinum* (De Witt et al., 1979), *Micobacterium* (Delaha y Garagusi, 1985) y *Helicobacter pylori* (O'gara et al. 2000). La actividad antibacteriana del ajo es ampliamente atribuida a la alicina, la cual tiene actividad modificadora de sulfhidrilo (Wills, 1956) y es capaz de inhibir enzimas sulfhidrilo aumentando la susceptibilidad de bacterias (Jonkers et al. 1999).

Los sulfuros de alilo tienen actividad antifúngica la cual se cree que inhibe la fosforilación oxidativa la cual tiene un efecto en la actividad respiratoria disminuyendo la formación de ATP (Li et al. 2016).

2.3. Metodología experimental

2.3.1. Preparación de la muestra

Para la extracción se utilizó ajo fresco proveniente de Zacatecas, México (22°46'06"N, 102°34'53"O, 2480 MSNM). El ajo fresco fue limpiado para remover tierra y algunas raíces; los bulbos se almacenaron en un ambiente seco y a temperatura ambiente. Cuando se utilizaron los ajos se retiraron las hojas que envuelven a los bulbos (dientes) y los dientes se trituraron con un exprimidor de ajo.

2.3.2. Extracción de alicina de *Allium sativum*

Se realizó una modificación a la metodología descrita por Olech y Zaborska (2012) con la finalidad de obtener extractos con un alto contenido de alicina mediante un diseño experimental Box-Behnken. Se consideraron los siguientes factores de control: la temperatura (Factor A), el pH (Factor B), debido a que ambos factores afectan la estabilidad de la alicina (Mishra et al. 2009), el tiempo (Factor C), al ser

una variable termodinámica importante y la relación masa/ solvente (Factor D) debido a que tienen un efecto sobre el rendimiento de extracción (Tiwari et al. 2014).

Tabla 2.2. Niveles de los factores de control elegidos en la optimización de extracción

Factor de control	Descripción	Niveles seleccionados		
		-1	0	1
Factor A	Temperatura (° C)	30	35	40
Factor B	pH	4	6	8
Factor C	Tiempo (min)	20	40	60
Factor D	Cantidad de solvente (mL)	10	20	30

Para la extracción se utilizó como solvente etanol: agua (30:70) ya que los extractos de alicina presentan una mayor estabilidad en esas condiciones (Fujisawa et al. 2008). En la Tabla 2.2 se presentan los niveles de control elegidos. Considerando los factores de control y sus niveles seleccionados, se realizaron 27 experimentos (Tabla 2.3). Los experimentos se realizaron por duplicado. Para controlar los niveles seleccionados de pH de acuerdo con el diseño experimental se utilizaron soluciones de NaOH 1 M y HCl 1 M.

Una vez definidas las condiciones de cada experimento, se pesó 1 g de bulbos frescos de *Allium sativum* previamente picado y se mezcló con una solución de agua: etanol (70:30).

2.3.3. Cuantificación de la alicina

Para la cuantificación de alicina se modificó la metodología reportada por Han y colaboradores (1995). Se mezclaron 0.5 mL de extracto de ajo y 1 mL de L-cisteína 2 mM por 30 min a 30°C. Posteriormente se añadieron 3 mL de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (DTNB) ajustado con una solución buffer de fosfatos 50 mM (pH=7) y EDTA 1 mM, se mezcló por 2 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 412 nm. Mediante la Ecuación 1.1 se obtuvo la cantidad de alicina del extracto en mM.

$$C_{\text{alicina}} (\text{mM}) = \frac{(A_{\text{alicina}} - A_{\text{muestra}}) \times \beta}{2 \times 14150} \quad (1.1)$$

Donde $C_{alicina}$ es la concentración del extracto en mM, $A_{alicina}$ es la absorbancia de la alicina, $A_{muestra}$ es la absorbancia de los extractos obtenidos y β es el factor de dilución.

Tabla 2.3. Matriz del diseño experimental para la extracción de alicina. Dónde: Factor A=Temperatura, Factor B=pH, Factor C=Tiempo y Factor D=Relación masa/volumen.

Experimentos	Factores			
	A	B	C	D
1	30	6	40	30
2	30	6	40	10
3	35	6	40	20
4	40	6	20	20
5	40	6	60	20
6	40	8	40	20
7	35	6	40	20
8	35	8	60	20
9	35	6	60	30
10	35	6	20	30
11	35	8	40	30
12	35	4	20	20
13	40	6	40	10
14	30	4	40	20
15	30	6	20	20
16	35	6	20	10
17	35	6	60	10
18	35	6	40	20
19	40	4	40	20
20	30	6	60	20
21	35	8	40	10
22	35	8	20	20
23	35	4	40	10
24	40	6	40	30
25	30	8	40	20
26	35	4	60	20
27	35	4	40	30

2.4. Resultados y discusión

2.4.1. Optimización de la extracción de alicina de *Allium sativum*

En la Tabla 2.4 se muestra la matriz de experimentos con sus respectivas concentraciones (mM), que corresponden al contenido de alicina del extracto.

Tabla 2.4. Matriz del diseño experimental para la extracción de alicina. Dónde: Factor A=Temperatura, Factor B=pH, Factor C=Tiempo y Factor D=Relación masa/volumen.

Experimentos	Factores				Concentración alicina, mM
	A	B	C	D	
1	30	6	40	30	0.206±0.015
2	30	6	40	10	0.392±0.040
3	35	6	40	20	0.315±0.015
4	40	6	20	20	0.193±0.010
5	40	6	60	20	0.324±0.033
6	40	8	40	20	0.320±0.015
7	35	6	40	20	0.304±0.003
8	35	8	60	20	0.365±0.011
9	35	6	60	30	0.147±0.021
10	35	6	20	30	0.079±0.007
11	35	8	40	30	0.110±0.023
12	35	4	20	20	0.169±0.032
13	40	6	40	10	0.388±0.039
14	30	4	40	20	0.171±0.013
15	30	6	20	20	0.204±0.001
16	35	6	20	10	0.392±0.041
17	35	6	60	10	0.392±0.039
18	35	6	40	20	0.311±0.049
19	40	4	40	20	0.262±0.021
20	30	6	60	20	0.387±0.050
21	35	8	40	10	0.391±0.038
22	35	8	20	20	0.296±0.039
23	35	4	40	10	0.379±0.036
24	40	6	40	30	0.177±0.001
25	30	8	40	20	0.273±0.018
26	35	4	60	20	0.292±0.047
27	35	4	40	30	0.159±0.016

Una vez obtenidos todos los resultados de cada uno de los experimentos, se llevó a cabo el análisis estadístico resultando la ecuación polinomial (Ecuación 2.1) que representa el efecto de cada uno de los factores (codificados) sobre la respuesta (concentración de alicina), donde los factores son: A=Temperatura, B=pH, Tiempo y D=Relación masa/volumen.

$$R = 0.126 + 0.0493A + 0.160B + 0.0112C + 0.0028D - 0.000491A^2 - 0.00654B^2 - 0.000048C^2 - 0.000231D^2 - 0.00111AB - 0.000131AC - 0.000129AD - 0.000338BC - 0.00077BD + 0.000085CB$$

(2.1)

De acuerdo con la Ecuación 2.1 el coeficiente con mayor efecto positivo fue el pH. Sin embargo, el coeficiente con mayor efecto negativo fue la interacción del pH y la temperatura. Una vez realizado el análisis de datos se obtuvieron las superficies de respuesta y los gráficos de contorno.

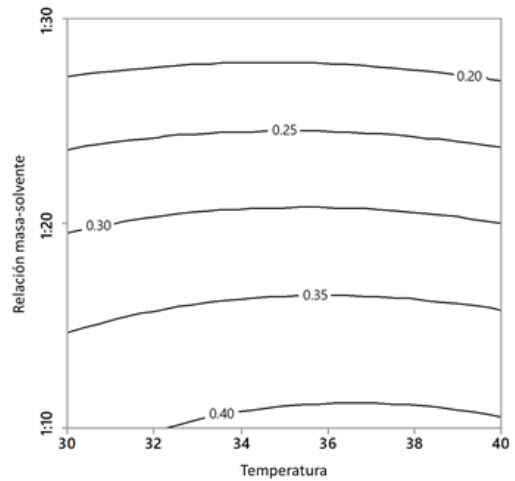
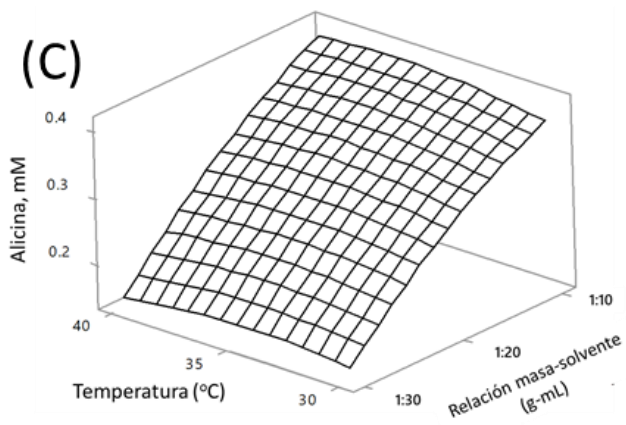
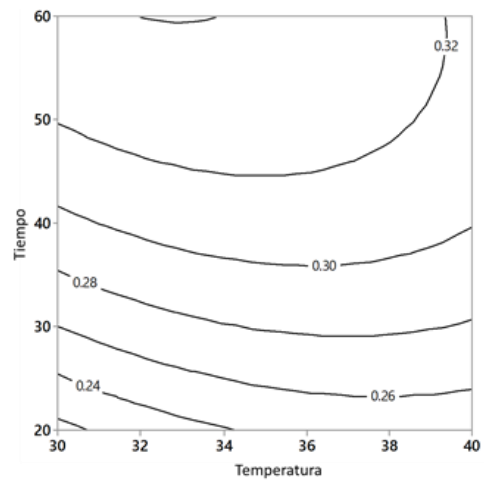
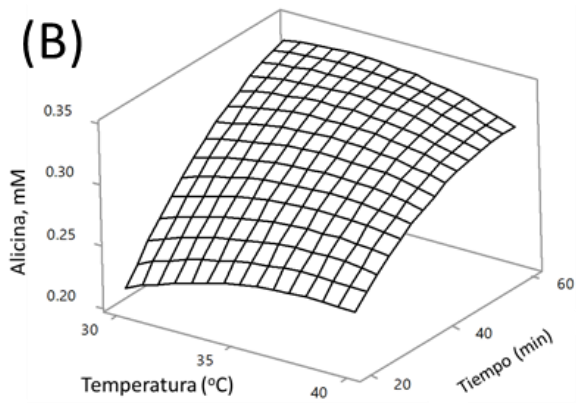
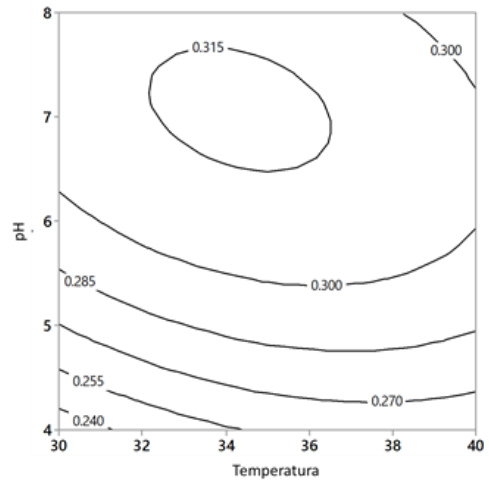
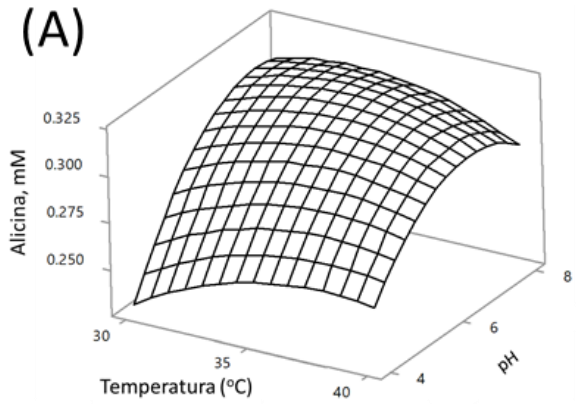
En la Figura 2.4A se muestra el efecto de la temperatura (Factor A) y el pH (Factor B) sobre la respuesta. Se observa que la concentración de alicina aumenta cuando el valor de pH es aprox. 6 independientemente de la temperatura. Por otro lado, la Figura 2.4B muestra la superficie de respuesta y el gráfico de contorno para el efecto de la temperatura (Factor A) y el tiempo (Factor C). Se observa una mayor cantidad de alicina extraída cuando el tiempo de extracción es mayor a los 55 min independientemente de la temperatura.

En la superficie de respuesta y gráfico de contorno (Figura 2.4C) se observa que cuando la relación de masa-solvente (1g-10 mL) es menor la concentración de alicina (mM) aumenta independientemente de la temperatura (°C) que se aplique. Para el efecto del pH (Factor B) y el tiempo (Factor C) en la extracción de alicina (Figura 2.4D) se observa que la concentración aumenta cuando el pH es de 7 y los tiempos de extracción son bajos (20 min).

En la Figura 2.4E se observa una mayor concentración de alicina cuando el pH (Factor C) se mantiene en un intervalo de 6-7 y la relación de masa-solvente (Factor D) se mantiene 1 g-30 mL. La Figura 2.4F muestra el efecto del tiempo (Factor C) y la relación masa-solvente (Factor D) en la extracción de alicina.

La alicina se forma por reacciones enzimáticas las cuales dependen de la temperatura. Sin embargo, la temperatura afecta la estabilidad de la alicina (Lawson y Hughes, 1991). Se ha reportado que la alicina es inestable a temperaturas mayores de 40°C, pero la degradación es muy lenta a esta temperatura (Mansor et

al. 2016). Los resultados muestran una mejor estabilidad de la alicina en temperaturas entre los 34-36°C.



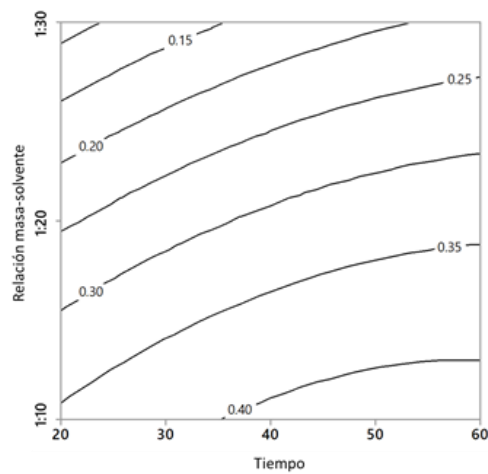
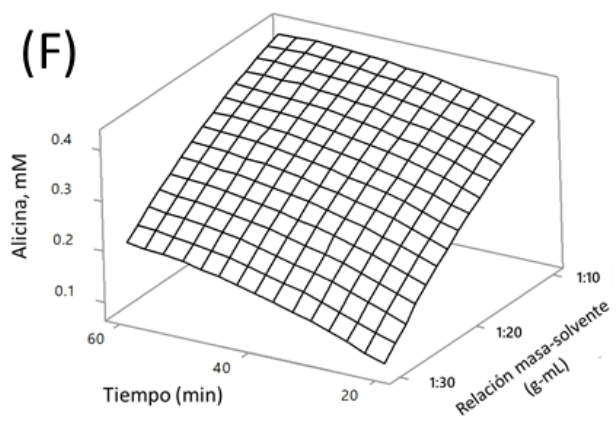
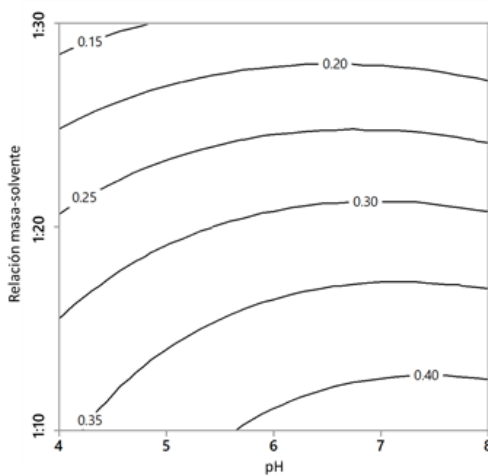
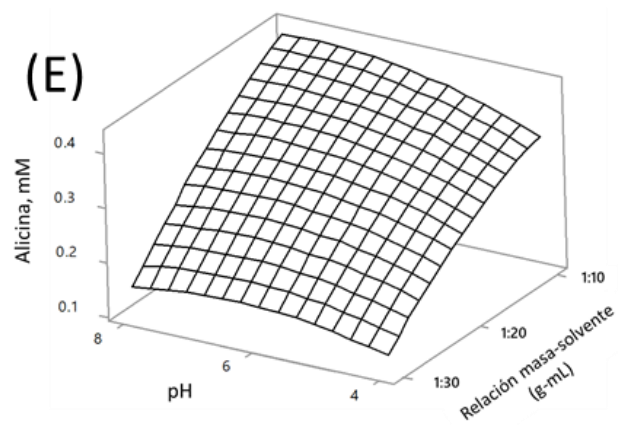
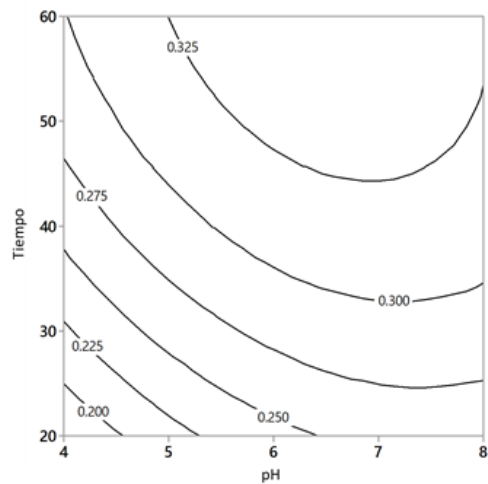
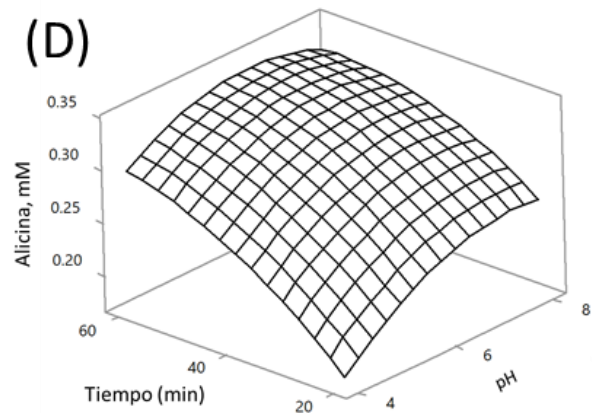


Figura 2.4. Superficies de respuesta y gráficos de contorno: temperatura vs pH (A), temperatura vs tiempo (B), temperatura vs relación masa-solvente (C), pH vs tiempo (D), pH vs relación masa-solvente (E), tiempo vs relación masa-solvente (F).

Por otra parte, Wang y colaboradores (2014) reportaron la estabilidad de la alicina en soluciones acuosas en un intervalo de pH de 5 y 6. Cuando el pH es ácido (≤ 4) o básico (≥ 10) la alicina se descompone rápidamente (Mishra et al. 2000).

Para la extracción de alicina se han utilizado diferentes proporciones de masa-solvente. Tiwari y colaboradores (2011) reportaron que uno de los factores que afecta en la extracción de compuestos bioactivos en plantas es la proporción de muestra-solvente y mencionan una proporción ideal de muestra-solvente 1:10. Una alta relación de masa-solvente podría facilitar un mayor gradiente de concentración, provocando un aumento de la velocidad de difusión lo que permite una mayor extracción de sólidos por solvente (Al-Farsi y Chang, 2008). Sin embargo, la concentración de compuestos bioactivos no aumenta una vez que se ha alcanzado el equilibrio (Herodez et al., 2003). Por lo que es necesario considerar este factor para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de alimentos

Los resultados muestran una mayor extracción cuando el tiempo es mayor (60 min) y la relación de masa-solvente es baja (1 g-10 mL). Tiwari y colaboradores (2011) reportaron que el tiempo y la relación de masa-solvente son factores importantes en la extracción de cualquier compuesto bioactivo.

2.4.2. Optimización de la extracción

En la Tabla 2.5 se muestran las condiciones óptimas a las cuales se debe extraer la alicina de ajo fresco en agua: etanol (70:30), experimentalmente se tiene una concentración 0.4148 mM con un %RSD de 0.049. De acuerdo con el análisis estadístico, el intervalo predictivo es de 0.2952 a 0.5672 mM ($p=0.05$) por lo que los resultados de los experimentos confirmatorios se encuentran dentro de esos valores.

Tabla 2.5. Experimentos confirmatorios para la extracción de alicina.

Experimentos Confirmatorios	Factores de control				Concentración (mM)	
	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (min)	Cantidad de solvente (mL)	Teórico	Experimental n=3
3	34	7.5	55	10 mL	0.4317	0.4148±0.0002
					IP 0.2952 - 0.5672	

2.5. Conclusiones

Se extrajo alicina de *Allium sativum* evaluando parámetros como la temperatura, pH, tiempo y la relación masa-solvente y se obtuvieron las mayores concentraciones de extracción.

Por otro lado, se establecieron las condiciones óptimas para obtener extractos de alicina, los cuales fueron utilizados como agentes de recubrimiento en las nanopartículas de óxido de hierro.

Los factores que más influyeron en la extracción de alicina fueron la temperatura y la interacción de la temperatura-pH. Además, la cuantificación se realizó con un método espectrofotométrico confiable, simple y rápido.

Referencias

- Adler BB, Beuchat LR (2002) Death of Salmonella, Escherichia coli 0157:H7, and Listeria monocytogenes in garlic butter as affected by storage temperature. *Journal of Food Protection*, 65:1976–1980
- Al-Farsi M, Chang YL (2008) Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry*, 108(3):977-985
- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of Nutrition*, 131: 955s–962s.
- Amarakoon S, Jayasekara D (2017). A review on garlic (*Allium sativum* L.) as a functional food. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6, 1777-1780.
- Banerjee SK, Maulik SK (2002). Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutrition Journal*, 1:4-18
- Block E. (2010) *Garlic and Other Alliums: The Lore and the Science*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 7-12
- Borkowska A, Knap N, Antosiewicz J (2013) Diallyl Trisulfide Is More Cytotoxic to Prostate Cancer Cells PC-3 than to Noncancerous Epithelial Cell Line PNT1A: A Possible Role of p66Shc signaling Axis. *Nutrition and Cancer*, 65: 711-717
- Cavallito CJ, Bailey JH (1994) Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *Journal of American Chemical Society*, 66:1950–1951.
- Chan KC, Yin MC, Chao WJ (2007). Effect of diallyl trisulfide-rich garlic oil on blood coagulation and plasma activity of anticoagulation factors in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45:502-507
- De Witt JC, Notermans S, Gorin N, Kampelmacher EH. (1979) Effect of garlic oil or onion oil on toxin production by *Clostridium botulinum* in meat slurry. *Journal of Food Protection*, 42:222–224

Delaha EC, Garagusi VF (1985) Inhibition of mycobacteria by garlic extracts (*Allium sativum*) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27:485–486.

Dhawan V, Jain S (2004). Effect of garlic supplementation on oxidized low density lipoproteins and lipid peroxidation in patients of essential hypertension. *Molecular Cell Biochemistry*, 266: 109–115

Frankel F, Priven M, Richard E, Schweinshault C, Tongo O, Webster A, Barth E, Slejzer K, Edelstein S (2016) Health functionality of organosulfides: A review. *International Journal of Food Properties*, 19: 537-548

Fujisawa H, Suma K, Origuchi K, Hitomi K, Seki T, Ariga T (2008). Biological and Chemical Stability of Garlic-Derived Allicin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 4229–4235.

Gonen A, Harats D, Rabinkov A, Miron T, Mirelman D, Wilchek M (2005). The antiatherogenic effect of allicin: possible mode of action. *Pathobiology*, 72:325-334

Guo Z, Müller D, Pentz R, Kress G, Siegers CP (1990) Bioavailability of sulphur-containing ingredients of garlic in the rat. *Planta*. 56:692.

Han J, Lawson L, Han G, Han P (1995). A spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfinates *Analytical Biochemistry* 225(1):157-60.

Harunobu A, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *Journal of Nutrition*, 131:955-962

Herodez S, Hadolin S, Skerget M, Knez Z (2003). Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry*. 80. 275-282.

Jain RC, Konar DB (1978). Effect of garlic oil in experimental cholesterol atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 29:125-129.

Jonkers D, Sluimer J, Stobberingh E (1999) Effect of garlic on vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 43:3045

Lachmann G, Lorenz D, Radeck W, Steiper M (1994) The pharmacokinetics of the S35 labeled labeled garlic constituents alliin, allicin and vinylidithiine. *Arzneimittel-Forschung*, 44:734–43.

Lau BH (2006). Suppression of LDL oxidation by garlic compounds is a possible mechanism of cardiovascular health benefit. *Journal of Nutrition*, 136: 765s–768s.

Lawson DL (1993) Bioactive Organosulfur Compounds of Garlic and Garlic Products. ACS Symposium Series, 534: 306-330.

Lawson LD (1998) Garlic: A Review of Its Medicinal Effects and Indicated Active Compounds. ACS Symposium Series, 176-203

Lawson LD, Hughes BG (1992). Characterization of the Formation of Allicin and Other Thiosulfinates from Garlic. *Planta Medica*, 58(4): 345-350.

Li M, Ciu JR, Ye Y, Min JM, Zhang LH, Wang K, Gares M, Cros J, Wright M, Leung-Tack J (2002). Antitumor activity of Z-ajoene, a natural compound purified from garlic: antimitotic and microtubule interaction properties. *Carcinogenesis*, 23: 573-579.

Li WR, Shi QS, Dau HQ, Liang Q, Xie XB, Huang XM, Zhao GZ, Zhang LX (2016) Antifungal activity, kinetics and molecular mechanism of action of garlic oil against *Candida albicans*. *Scientific Reports*, 6:1-8

Lin JG, Chen GW, Su CC, Hung CF (2002). Garlic components diallyl sulfide and diallyl disulfide on arylamine N-acetyltransferase activity and 2-aminofluorene-DNA adducts in human promyelocytic leukemia cells. *American Journal of Chinese Medicine*, 30: 315-325

Mansor N, Herng HJ, Samsudin SJ, Sufian S, Uemura Y (2016). Quantification and Characterization of Allicin in Garlic Extract. *Journal of Medical and Bioengineering*, 1:24-27.

Mathew B, Biju R (2008). Neuroprotective effects of garlic: a review. *Libyan Journal of Medicine*, 3:23-33.

Mathialagan R, Mansor N, Shamsuddin MR, Uemura Y, Majeed Z (2017). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) of Allicin from Garlic (*Allium sativum* L.). *Chemical Engineering Transactions*, 56: 1747-1752.

Mishra R, Upadhyay SK, Maheswari PN (2001). Stability of Allicin in Garlic- A Kinetic Study. *Indian Journal of Chemical Technology*, 8: 195-199.

Mukherjee S, Lekli I, Goswami S, Dipak KD (2009) Freshly Crushed Garlic is a Superior Cardioprotective Agent than Processed Garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 7137-7144

Murray M (2005). *The Encyclopedia of Healing Foods*. Atria Books, 201

O'Gara EA, Hill DJ, Maslin DJ (2000) Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:2269–2273.

Olech Z, Zaborska W (2012). A Spectrophotometric Assay for Total Garlic Thiosulfinates Content. Kinetic Aspects of Reaction with Chromogenic Thiols. *Polish Journal of Food Nutrition Sciences*, 62(1):23–29.

Powolny AA, Singh SV (2008). Multitargeted prevention and therapy of cancer by diallyl trisulfide and related *Allium* vegetable-derived organosulfur compounds. *Cancer Letters*; 229: 305-314

Pruthi JS (1987). *Spices and condiments*. National Book Trust of India, New Delhi

Santhosha SG, Jamuna P, Prabhavathi SN (2013). Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: A review. *Food Bioscience* 3: 59-74

Singh VK, Singh DK (2008). Pharmacological Effects of Garlic (*Allium sativum* L.). *Annual Review of Biomedical Sciences*, 10, 6-26.

Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1: 98-106.

Tsubura A, Lai YC, Kuwata M, Uehara N, Yoshizawa K (2011). Anticancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 11: 249-253.

Vina J, Borrás C, Gomez-Cabrera MC, Orr WC (2006). Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signaling and gene expression. Role of reactive oxygen species and (phyto) oestrogens in the modulation of adoptive response to stress. *Free Radical Research*, 40: 111–119.

Wang H, Li X, Liu X, Shen D, Qiu Y, Zhang X, Song J (2014). Influence of pH, concentration and light on stability of allicin in garlic (*Allium sativum* L.) aqueous extract as measured by UPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(9), 1838–1844.

Wills E (1956) Enzyme inhibition by allicin, the active principle of garlic. *Biochem J*. 63:514–520.

Wilson EA, Demmig-Adams B (2007). Antioxidant, antiinflammatory, and antimicrobial properties of garlic and onions. *Nutrition and Food Sciences*, 37, 178–183.

Zhou C, Hu Xu, Chao X, Lui H, Zhang S, Yan X, Yang F, Li Q (2015). Quantitation of Allicin in Garlic-based Products: Comparisons among Spectrophotometry, GC and HPLC. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 9(4): 269-277.

CAPÍTULO 3. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO.

3.1. Introducción

La nanotecnología es una disciplina con un gran potencial en el desarrollo de materiales para diversos campos de la ciencia como la medicina, electrónica, física y química. De acuerdo con la Comisión de la Unión Europea, se considera un nanomaterial a un producto de origen natural, incidental o sintetizado, donde el 50% o más de las partículas están en un intervalo de 1 a 100 nm (Gallocchio et al. 2015; He y Hwang 2016; Kolahalam et al. 2016). El tamaño y la forma son parámetros importantes en la fabricación, proceso y aplicación debido a que se puede incrementar la reactividad o contacto de las nanopartículas (Gallocchio et al. 2015). Los materiales de construcción de las nanopartículas pueden clasificarse en cuatro grupos: materiales de base de carbono (contienen carbono), inorgánicos (incluyen metales y óxidos metálicos), orgánicos (contienen materia orgánica) y compuestos (combinación de distintos materiales) (Jeevanandam et al. 2018). Las nanopartículas de óxido de hierro (IONPs) son materiales compuestos de partículas ferromagnéticas mostrando un magnetismo inherente (Ali et al. 2016). A comparación de otros nanomateriales, las IONPs presentan ventajas como bajo costo de producción, seguridad medioambiental, gran estabilidad y compatibilidad. Por otro lado, las IONPs se utilizan ampliamente en medicina para la separación de productos biológicos y células debido a sus fuertes propiedades magnéticas, así como para la administración de fármacos en sitios específicos y como agentes de contraste para el diagnóstico de cáncer. También las IONPs se han utilizado en la agricultura (fertilizantes o pesticidas); y se han aplicado para la remediación ambiental (filtros o sensores). Otras aplicaciones son en los campos de la energía (baterías), automotriz (aditivos) y textil (nanofibras o recubrimiento) (Ali et al. 2016). En este Capítulo se aborda la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro y su funcionalización con tetraetilortosilicato (TEOS) evaluando factores como el tiempo y la concentración de hidróxido de amonio sobre el tamaño de la nanopartícula. El análisis de resultados permitió obtener el tamaño de partícula más pequeño y poder utilizar estos soportes con los extractos de alicina descritos en el Capítulo 1.

3.2. Antecedentes

Los nanomateriales se sintetizan de dos formas. La primera son los métodos arriba-abajo (“top-down”) los cuales consisten en el rompimiento de materiales grandes con la finalidad de generar nanopartículas. Estos métodos de síntesis generan nanopartículas con diversos tamaños y morfologías siendo utilizadas en la fabricación de cerámicas (Biswas et al. 2012). Los otros son los métodos abajo-arriba (“bottom-up”) y consisten en la unión de átomos o moléculas para formar nanopartículas. Estos métodos de síntesis permiten obtener nanopartículas con una composición química más homogénea con un tamaño y morfología uniforme (Biswas et al. 2012).

LaMer y Dinegar (1950) propusieron una teoría que explica los mecanismos de nucleación de partículas de sulfuro y está dividida en tres etapas (Figura 3.1)

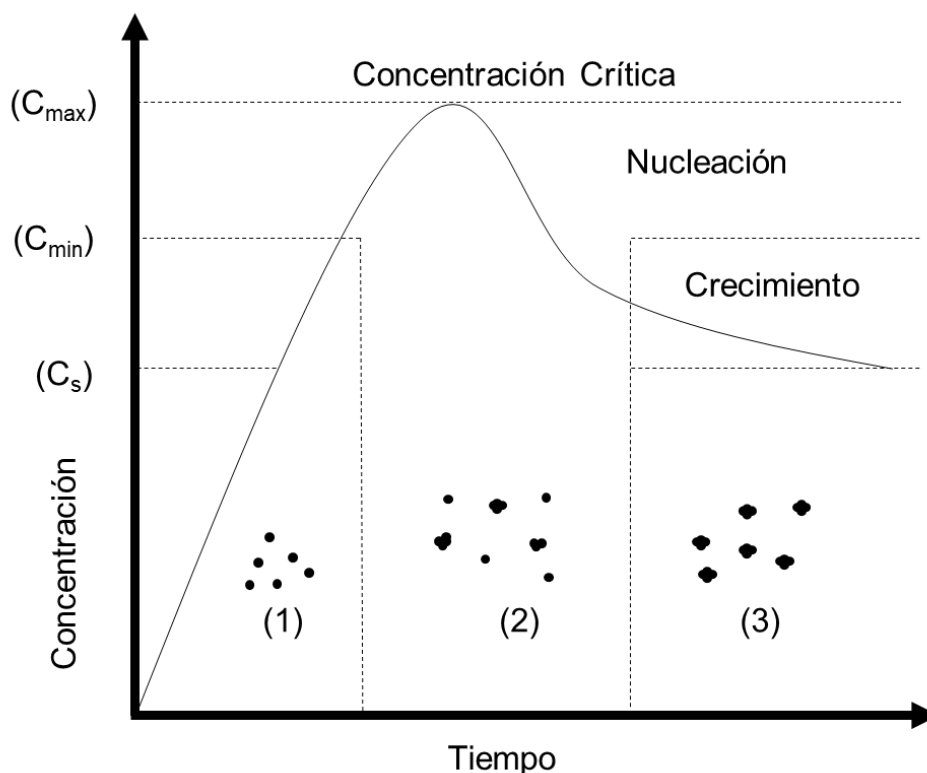


Figura 3.1. Representación del principio de nucleación de LaMer [Elaboración propia]

En la primera etapa, las sales permanecen solubles y cuando su concentración aumenta (en el caso de las nanopartículas metálicas es debido a reacciones redox)

se alcanza una concentración mínima de nucleación (C_{\min}). Conforme la concentración aumenta se consigue un nivel crítico de supersaturación (C_{\max}) y las moléculas forman núcleos (Polte, 2015).

Los núcleos son productos de la colisión entre iones y moléculas de la solución en un proceso denominado autonucleación (segunda etapa). Durante este proceso, la concentración de sales disminuye rápidamente de C_{\max} a C_{\min} y debido a la formación de aglomerados la tasa de nucleación cae inmediatamente a cero. En la tercera etapa, los aglomerados aumentan gradualmente hasta que alcanzan un tamaño crítico formando una estructura bien definida llamada semilla. Finalmente, esta semilla continúa creciendo para formar una nanopartícula hasta que la concentración de sales en la solución disminuye a una concentración de solubilidad de nanopartículas (C_s) (Polte, 2015; Geonmonod et al. 2017).

Las partículas más comunes en diversos campos son las nanopartículas de óxidos de hierro (IONPs), aunque pueden contener otros elementos. Los óxidos de hierro más comunes son la magnetita (Fe_3O_4), la maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$), la hematita ($\alpha-Fe_2O_3$) y la geolita. Dependiendo de las condiciones experimentales, pueden formarse una o más de las fases de óxido de hierro. La magnetita y la maghemita son partículas con propiedades superparamagnéticas, provocando que la susceptibilidad magnética sea mayor facilitando la acumulación de fármacos en un sitio objetivo (Neuberger et al. 2005). Por ello, las nanopartículas magnéticas pueden ofrecer una solución para transportar medicamentos a las áreas deseadas en el cuerpo (Bucak et al. 2012).

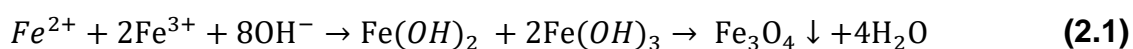
3.2.1. Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro

Existen diversos métodos de síntesis como la coprecipitación, descomposición térmica, síntesis hidrotérmica y solvotérmica, síntesis sol-gel, microemulsión, irradiación por ultrasonido y síntesis biológica para producir IONPs magnéticas. Estos métodos se pueden dividir en rutas acuosas y no acuosas. Los métodos acuosos poseen ventajas como bajo costo y sostenibilidad, sin embargo, es difícil controlar el tamaño de partícula. Los métodos no acuosos obtienen IONPs que sólo se disuelven en disolventes no polares. Dependiendo del método de síntesis se

pueden obtener nanoestructuras magnéticas con diferentes morfologías y tamaños (Wu et al. 2015).

3.2.1.1. Coprecipitación

Es uno de los métodos más simples para la síntesis de IONPs magnéticas. Fue desarrollado por Massart en la década de 1980 y consiste en mezclar iones Fe^{2+} y Fe^{3+} en una relación 1:2 en soluciones muy alcalinas a temperatura ambiente o incrementándola. Usualmente la reacción se realiza con un gas protector (nitrógeno) (Ecuación 2.1).



La nucleación de Fe_3O_4 es más fácil cuando el pH de la solución es menor que 11, mientras que el crecimiento del núcleo de Fe_3O_4 es más fácil cuando el pH de la solución es mayor que 11 (Wu et al. 2015). En la síntesis por coprecipitación se utilizan principalmente hidróxidos de amonio, potasio y sodio. La síntesis por coprecipitación se lleva a cabo entre 70 y 80°C (Mascolo et al. 2013).

Este método de síntesis ha sido ampliamente utilizado por sus múltiples ventajas como la producción de escala de gramo y simplicidad. Además, es un método acuoso lo cual es amigable con el medio ambiente. No obstante, la distribución del tamaño de partícula no se logra controlar y la forma de las IONPs es restringida (Faraji et al. 2010).

3.2.1.2. Descomposición térmica

El método consiste en la descomposición química de compuestos organometálicos en solventes orgánicos a altas temperaturas evitando reacciones de hidrólisis. Existen tres factores significativos para la síntesis de nanopartículas: la temperatura de descomposición, la duración de la reacción y la concentración de precursores (Lu et al. 2007; Wu et al. 2015). Los precursores para esta síntesis son compuestos organometálicos, tales como acetilacetonatos, cupferronatos o carbonilos metálicos (Wu et al. 2015).

Los ácidos grasos como el láurico, mirístico, cáprico, esteárico, oleico y la hexadecilamina son utilizados como agentes estabilizadores los cuales pueden ralentizar el proceso de nucleación y afectar la adsorción de aditivos en los núcleos y en los nanocristales en crecimiento, favoreciendo tamaños de partícula por debajo de 30 nm (Wu et al. 2015). La principal desventaja de este tipo de síntesis es que las partículas generadas son solubles en solventes no polares, lo cual limita su uso para aplicaciones biológicas (Wu et al. 2008).

3.2.1.3. Síntesis solvotérmica e hidrotérmica

La síntesis hidrotérmica o solvotérmica se puede realizar a partir de soluciones acuosas o no acuosas a altas temperaturas (130-250°C) en un recipiente sellado bajo alta presión de vapor (0.3-4 MPa) (Wu et al. 2008). Con los métodos hidrotérmicos se obtienen nanocristales de óxido de hierro de buena calidad, manteniendo al mismo tiempo un buen control sobre su composición. Los métodos solvotérmicos son extrapolaciones a sistemas no acuosos (Walton, 2002).

Deng y colaboradores (2005), reportaron la síntesis de ferritas microesféricas por reducción solvotérmica. El método consiste en mezclar FeCl_3 , etilenglicol, acetato de sodio y polietilenglicol hasta obtener una solución clara, la cual se somete a un tratamiento térmico en una autoclave de acero inoxidable a 200°C, durante 8-72 h. En este método, el etilenglicol actúa como agente reductor mientras que el acetato de sodio previene la aglomeración.

Este método de síntesis presenta una cinética muy lenta, por lo que se ha planteado una modificación, la cual consiste en calentar mediante microondas, lo cual aumenta la formación de cristales, sin embargo, tiene se obtienen poco rendimiento (Sreeja y Joy, 2007)

3.2.1.4. Microemulsión

Las microemulsiones agua en aceite (W/O) son sistemas isotrópicos y termodinámicamente estables de una sola fase, las cuales consisten en tres componentes: agua, aceite y un tensoactivo. Los tensoactivos reducen la tensión

superficial entre el agua y el aceite, lo que permite que se mezclen (Wongwailikhit et al. 2011).

Para la síntesis de IONPs los precursores se encuentran en la fase acuosa (nanogotas), se someten a una coalescencia rápida que mezcla, precipitan y aglomeran los componentes y se forman micelas. El tamaño puede ser controlado cambiando la relación molar de agua a tensoactivo (W:O), valores elevados de W:O generan tamaños de partícula grandes (Gupta y Gupta, 2005).

El método por microemulsión permite producir nanopartículas monodispersas con diversas morfologías. Sin embargo, este método requiere de una alta cantidad de solvente y los rendimientos de reacción son bajos (Faraji et al. 2010). Además, la agregación de las IONPs magnéticas producidas usualmente requiere de varios procesos de lavado y tratamientos de estabilización adicionales para ser utilizados en aplicaciones biomédicas (Wu et al. 2015).

3.2.1.5. Métodos asistidos por ultrasonido

El ultrasonido de alta intensidad se utiliza para la producción de IONPs por la sonicación de soluciones acuosas de hierro sin altas temperaturas, altas presiones o largos tiempos de reacción (Xu et al. 2013). Bajo la irradiación ultrasónica, las ondas acústicas expansivas y compresivas crean burbujas (cavidades) oscilatorias. Estas burbujas acumulan energía ultrasónica mientras crecen hasta cierto tamaño (generalmente mm). Posteriormente la burbuja se puede sobrecargar y colapsar, liberando su energía almacenada en un tiempo muy corto. La implosión es localizada y transitoria con una temperatura de 5000°K y una presión de 1000 bar produciendo una gran variedad de nanocompuestos (Suslick, 1990; Wu et al. 2015).

El método sonoquímico tiene múltiples ventajas como la uniformidad de mezcla y tamaños nanométricos de cristales. Sin embargo, este método no permite la fabricación de IONPs con formas controlables y dispersas (Wu et al. 2015).

3.2.1.6. Síntesis verde

Esta síntesis utiliza los métodos “bottom-up” para formar nanopartículas las cuales son productos amigables con el ambiente. Para ello, las sales precursoras se mezclan con un sustrato “verde” el cual contiene compuestos biológicos. Estos compuestos actúan como agentes reductores y limitantes estabilizando a las nanopartículas durante el proceso de síntesis. La concentración de la sal precursora, tiempo, temperatura, pH y la concentración del sustrato “verde” son parámetros que pueden ser modificados durante la síntesis para obtener nanopartículas con diferentes propiedades y aplicaciones (Yew et al. 2018).

3.2.2. Funcionalización y estabilización de nanopartículas de óxido de hierro

Un problema inevitable asociado con las IONPs magnéticas es la inestabilidad intrínseca durante períodos más largos, que se manifiesta de dos formas:

- (1) pérdida de dispersabilidad, donde nanopartículas pequeñas tienden a agregarse y formar partículas grandes reduciendo el área superficial; y
- (2) pérdida de magnetismo, donde las IONPs se oxidan fácilmente en el aire debido a su reactividad, especialmente las partículas de Fe_3O_4 y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

Por ello, se han desarrollado sistemas de protección para estabilizar químicamente las IONPs durante o después su utilización (Wu et al. 2015). Existen dos tipos de recubrimientos en IONPs: orgánicos e inorgánicos (Figura 3.2)

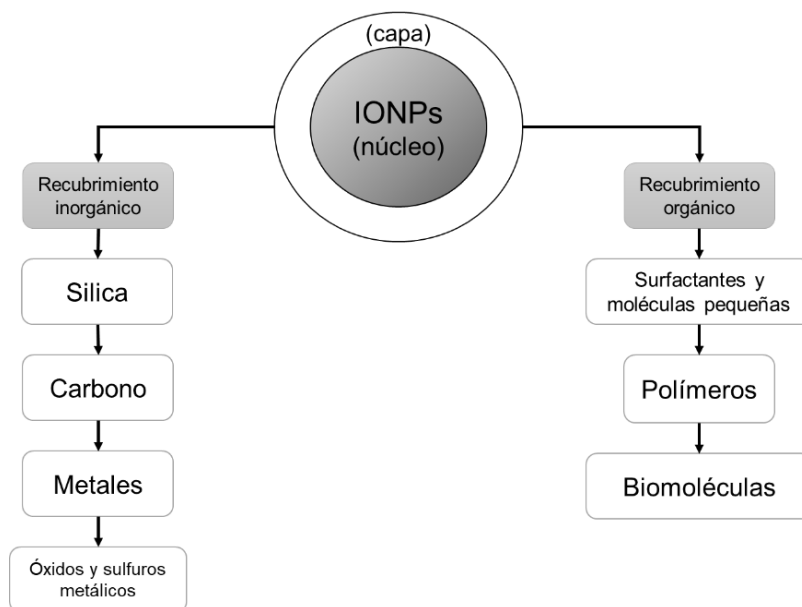


Figura 3.2. Recubrimientos orgánicos e inorgánicos de las IONPs [Elaboración propia]

3.2.2.1. Recubrimientos orgánicos

Los recubrimientos orgánicos más utilizados en las IONPs son: moléculas pequeñas, tensoactivos (sales de amonio, polioles, lisina, ácidos grasos), biopolímeros (dextrano, almidón, quitosano, alginato) y otras biomoléculas (enzimas, anticuerpos, proteínas, vitaminas, albúminas, péptidos) (Wu et al. 2008).

La adición de moléculas pequeñas como los silanos modifica y añade grupos terminales que permiten conectar iones metálicos, polímeros, biomoléculas u otras entidades biológicas (Shen et al. 2012). Para las soluciones oleosas se utilizan compuestos orgánicos como el ácido oleico y la oleyamina, los cuales poseen una cadena C18 con un doble enlace cis en la parte media, formando una torcedura que permite una mejor estabilización. Además, el ácido oleico puede formar una monocapa protectora en las IONPs, la cual es muy homogénea (Park et al. 2004; Wu et al. 2008).

Por otro lado, la incorporación de polímeros no sólo proporciona grupos multifuncionales y mayor estabilidad coloidal, sino que también desempeña un papel importante en relación con su destino biológico (es decir, la farmacocinética y la biodistribución) (Yang et al. 2010). Sin embargo, en algunos casos la presencia

de capas de polímero o copolímero puede influir negativamente en las propiedades magnéticas de las IONPs (Wu et al. 2015).

Las IONPs magnéticas también se pueden funcionalizar con biomoléculas (como enzimas, anticuerpos, proteínas, biotina, seroalbúmina bovina / humana, avidina y polipéptidos) convirtiéndose en una alternativa muy efectiva para la separación biológica, detección de patógenos, sensor de contaminantes y otras bio-aplicaciones debido a su compatibilidad. (Wu et al. 2015; Cao et al. 2012).

3.2.2.2. Recubrimientos inorgánicos

Algunos recubrimientos inorgánicos son: sílice, carbono, metales preciosos (plata u oro) y óxidos (ZnO, CaO, NiO y CoO) (Wu et al. 2008).

Las IONPs recubiertas con sílice (IONP@sílice) son un material compuesto clásico e importante tanto para el estudio fundamental como para las bio-aplicaciones. Los recubrimientos con sílice tienen múltiples ventajas como aumentar la dispersión en solución debido a una atracción dipolar magnética entre IONPs magnéticas, además de aumentar la estabilidad y proteger a las IONPs de medios ácidos. Finalmente, debido a la existencia de múltiples grupos silanol sobre la capa de sílice, se pueden incorporar fácilmente varios grupos funcionales. Esto es muy importante para aplicaciones biomédicas debido a que las IONPs@sílice pueden administrar fármacos de manera dirigida (Wu et al. 2015; Faraji et al. 2010; Lu et al. 2007)

Las IONPs protegidas con carbono (IONP@C) poseen una alta conductividad eléctrica y una buena estabilidad química y térmica. El recubrimiento de carbono proporciona una barrera contra la oxidación evitando la corrosión en el núcleo magnético. El recubrimiento hidrófilo proporciona una mejor dispersabilidad y estabilidad que los mostrados por IONPs sin recubrir. Uno de los recubrimientos más utilizados a base de carbono es el grafeno (Bae et al. 2012).

Por otro lado, se han desarrollado soportes que combinan nanopartículas metálicas con IONPs magnéticos debido a las propiedades fisicoquímicas combinadas y propiedades potenciales en catalizadores, biotecnología y biomedicina. Estas estructuras pueden ser modificadas con diferentes cargas o grupos funcionales en

la superficie de IONPs mejorando su estabilidad y compatibilidad (Wu et al. 2015; Faraji et al. 2010; Lu et al. 2007).

Otro tipo de recubrimiento inorgánico son los óxidos o sulfuros metálicos debido a que mejoran las propiedades semiconductoras y fotocatalíticas (Wu et al. 2015; Faraji et al. 2010; Lu et al. 2007).

3.3. Metodología experimental

3.3.1. Síntesis y funcionalización de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS asistida con ultrasonido

La síntesis y funcionalización de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS se realizó en dos pasos: 1) se utilizó la metodología descrita por Yang y colaboradores (2005) con modificaciones. El método consistió en mezclar 4.2 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 50 mL de agua destilada en un matraz bola con termopozo. La solución se colocó en un baño ultrasónico de la marca VEVOR Mod. 32V118A de 40 kHz a 50°C. Las partículas obtenidas se separaron con la ayuda de un imán de neodimio, se lavaron con etanol al 70% y se secaron en la estufa a 70°C.

Posteriormente 2) se funcionalizaron utilizando la metodología descrita por Stöber (1968), la cual fue modificada. Se pesaron 100 mg de IONPs y se mezclaron con 10 mL de etanol, 2 mL de agua destilada, 800 μL de NH_4OH y 200 μL de tetraetilortosilicato. Después, se colocaron en un baño ultrasónico a 40 KHz. Finalmente, las partículas obtenidas se lavaron con etanol al 70% y se secaron en la estufa a 70°C.

Con la finalidad de obtener el menor tamaño de partícula se realizó un diseño de experimentos Box-Behnken. Los factores de control que se consideraron fueron el tiempo de reacción (Factor A), debido a que el tratamiento con ultrasonido aumenta la capacidad de dispersión de las IONPs (Sulistyaningsih et al. 2017), la concentración de NH_4OH (Factor B) ya que tiene un efecto en el tamaño de partícula (Tajabadi y Khosroshahi, 2012) y el tiempo de funcionalización (Factor C), porque

el crecimiento de la capa de sílice está relacionado con las IONPs formadas (Yang et al. 2005). En la Tabla 3.1. se muestra los niveles de los factores de control elegidos.

Tabla 3.1. Niveles de los factores de control elegidos en la optimización de tamaño

Factor de control	Descripción	Niveles seleccionados		
		-1	0	1
Factor A	Tiempo de reacción (min)	20	40	60
Factor B	Concentración de NH ₄ OH (%)	20	25	30
Factor C	Tiempo de funcionalización (min)	15	35	55

Considerando los factores de control y sus niveles seleccionados, se realizaron 15 experimentos (Tabla 3.2). Los experimentos se realizaron por duplicado. Para medir el tamaño de partícula se pesaron 10 mg de IONPs y se colocaron en 5 mL de agua destilada.

Tabla 3.2. Matriz del diseño experimental para la extracción de alicina. Dónde: Factor A=Tiempo de Reacción, Factor B= Concentración de NH₄OH, Factor C=Tiempo de Funcionalización

Experimento	Factores		
	A	B	C
1	60	25	15
2	60	25	55
3	40	20	55
4	20	25	15
5	20	20	35
6	20	30	35
7	40	20	15
8	40	25	35
9	40	25	35
10	40	30	55
11	20	25	55
12	60	20	35
13	40	30	15
14	40	25	35
15	60	30	35

Posteriormente, las soluciones se colocaron en ultrasonido por 30 min y se dejaron reposando por 12 h para evitar aglomeración. Finalmente, se realizó la lectura en un analizador de tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica (Zetasizer nano-zs, Malvern Instruments) a 25°C. Las nanopartículas

funcionalizadas con menor tamaño de partícula fueron recubiertas por el extracto de ajo previamente optimizado.

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Optimización de la síntesis y funcionalización de nanopartículas Fe₃O₄@TEOS asistida con ultrasonido

En la Tabla 3.3 se muestra la matriz de experimentos con sus respectivos tamaños de partícula (nm).

Tabla 3.3. Matriz del diseño experimental para el tamaño de partícula. Dónde: Factor A=Tiempo de reacción, Factor B=Concentración de NH₄OH, Factor C=Tiempo de funcionalización

Experimentos	Factores			Respuesta
	A	B	C	
1	60	25	15	254±10.61
2	60	25	55	277±3.54
3	40	20	55	264±0.71
4	20	25	15	272±2.83
5	20	20	35	238±9.19
6	20	30	35	265±2.12
7	40	20	15	192±1.41
8	40	25	35	280±11.31
9	40	25	35	287±16.26
10	40	30	55	342±38.89
11	20	25	55	305±46.67
12	60	20	35	235±7.07
13	40	30	15	221±18.38
14	40	25	35	273±21.21
15	60	30	35	202±9.09

Una vez realizados los experimentos del diseño experimental se llevó a cabo el análisis estadístico de los resultados, obteniendo la ecuación polinomial (Ecuación 4.2), que representa el efecto de cada uno de los factores (codificados) sobre la respuesta (tamaño de partícula), donde los factores son: A (Tiempo de reacción), B (Concentración de NH₄OH) y C (Tiempo de funcionalización).

$$R = 723 + 5.57A + 71.5B - 2.71C - 0.0284A^2 - 1.344B^2 + 0.0207C^2 - 0.151AB - 0.0062AC + 0.122BC \quad \text{Ec. 3.1}$$

De acuerdo con la Ecuación 3.1 el coeficiente que tuvo el principal efecto positivo en la respuesta fue la concentración de NH_4OH . Por otro lado, se observa que la interacción tiempo de reacción-concentración de NH_4OH tuvo el mayor efecto negativo en la respuesta. Una vez realizado el análisis de datos se obtuvieron las superficies de respuesta y los gráficos de contorno.

En la superficie de respuesta y gráfico de contorno (Figura 8A) se observa que los tiempos de reacción (Factor A) bajos forman nanopartículas de menor tamaño independientemente de la concentración de NH_4OH . Por otro lado, la Figura 8B muestra menores tamaños de partícula cuando los tiempos de reacción (Factor A) y funcionalización (Factor C) son bajos mientras que al aumentar el tiempo de funcionalización el tamaño de la nanopartícula aumenta.

La superficie de respuesta y gráfico de contorno (Figura 8C) describen el efecto de la concentración de hidróxido de amonio (Factor B) y el tiempo de funcionalización (Factor C) sobre la respuesta. Se observa un menor tamaño de partícula cuando la concentración es baja independientemente del tiempo de funcionalización. Por otro lado, cuando la concentración es elevada y el tiempo de funcionalización es bajo el tamaño de nanopartícula disminuye.

Los métodos asistidos por ultrasonido aceleran la formación de nanopartículas de óxido de hierro debido a la energía liberada por la radiación ultrasónica, lo cual facilita la generación de núcleos (Romero et al. 2013). Además, Yang y colaboradores (2005) sintetizaron IONPs mediante el método de coprecipitación asistido por ultrasonido y observaron un incremento en la cantidad de iones Fe^{3+} y Fe^{2+} que son oxidados. Por otro lado, Dolores y colaboradores (2015) reportaron la generación de iones de Fe^{3+} de manera escalonada con respecto al tiempo de sonicación.

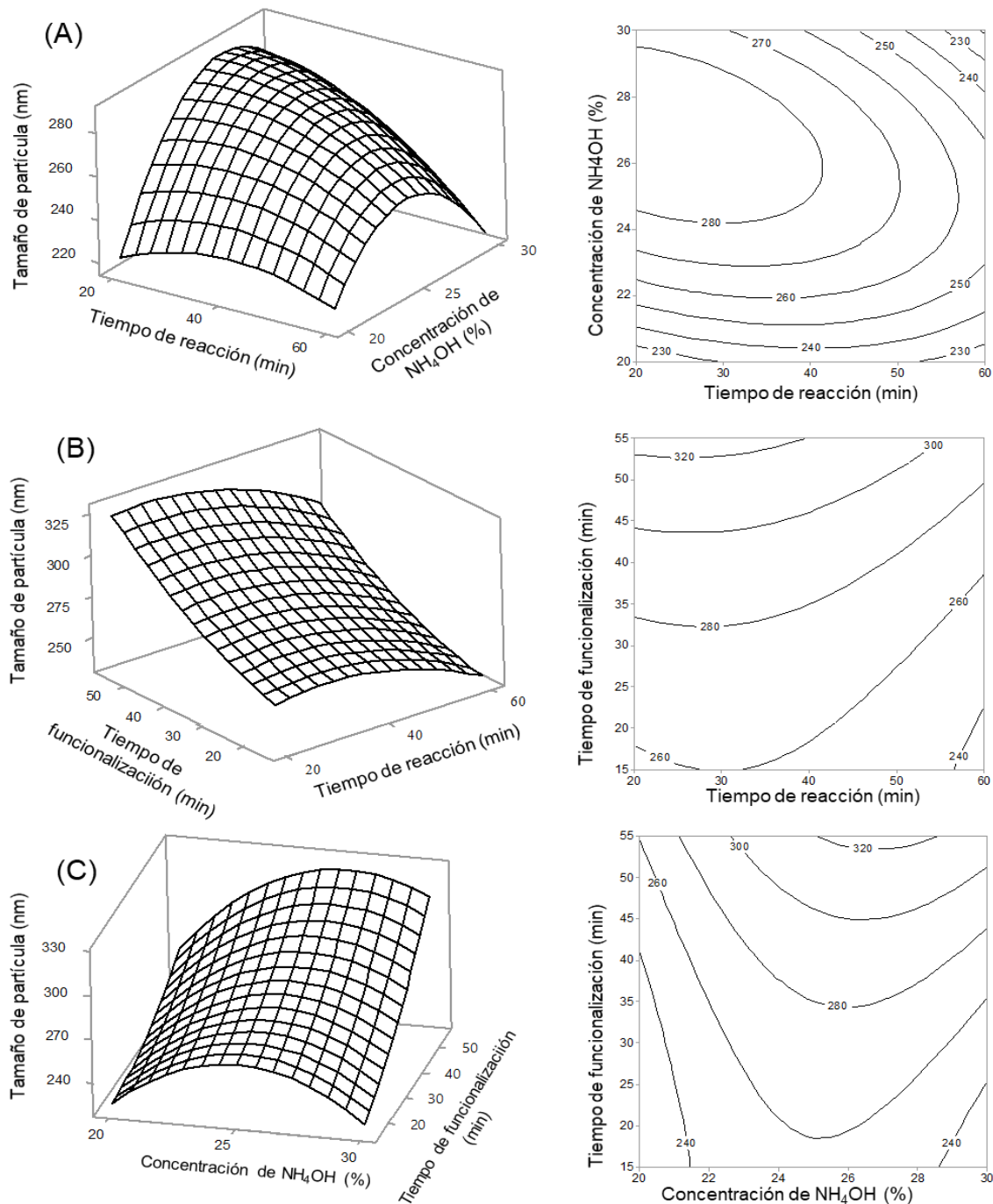


Figura 3.3. Superficies de respuesta y gráficos de contorno: tiempo de reacción vs concentración de NH₄OH (A), tiempo de reacción vs tiempo de funcionalización (B), tiempo de funcionalización vs concentración de NH₄OH (C).

En la síntesis por coprecipitación, la adición de soluciones alcalinas facilita la generación de IONPs (Azcona et al. 2016). Safari y colaboradores (2015) evaluaron el efecto de NaOH y NH₄OH en la síntesis de coprecipitación y reportaron que la

adición NH_4OH libera gradualmente grupos $-\text{OH}$ controlando el tamaño de partícula. El tiempo de funcionalización no es un parámetro ampliamente estudiado, sin embargo, Morel y colaboradores (2008) funcionalizaron IONPs con TEOS con diferentes tiempos (1 y 3 h) obteniendo nanopartículas con diámetros de 49 y 53 nm respectivamente.

3.4.2. Experimentos confirmatorios

En la Tabla 3.4 se muestran las condiciones óptimas de nanopartículas de óxido de hierro, experimentalmente se tiene una estimación de tamaño de partícula de 296.7 nm con un %RSD de 0.01. De acuerdo con el análisis estadístico, el intervalo predictivo es de 72.3 a 299.9 nm ($p=0.05$) por lo que los resultados de los experimentos confirmatorios caen dentro de esos valores.

Tabla 3.4. Experimentos confirmatorios para la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro.

Experimentos Confirmatorios	Factores de control			Estimación de tamaño (nm)	
	Tiempo de reacción (min)	Concentración NH_4OH (%)	Tiempo de funcionalización (min)	Teórico	Experimental n=3
3	60	30	15	192	296.7±3.70
				IP 72.3, 299.9	

3.5. Conclusiones

Se sintetizaron nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS evaluando parámetros como el tiempo de reacción, concentración de NH_4OH , y el tiempo de funcionalización con la finalidad de obtener nanopartículas con menores tamaños.

Por otro lado, se establecieron las condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas con menor tamaño, las cuales fueron utilizadas como soportes del extracto de alicina. Los factores que más influyeron en el tamaño de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS fueron la concentración de NH_4OH y la interacción del tiempo de reacción-concentración de NH_4OH .

Referencias

Ali A, Zafar H, Zia M, Haq I, Phull AR, Ali JS, Hussain A (2016) Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications*, 9:49–67.

Azcona P, Zysler R, Lassale V (2016) Simple and novel strategies to achieve shape and size control of magnetite nanoparticles intended for biomedical applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering*, 504: 320–330

Bae H, Ahmad T, Rhee I, Chang Y, Jin SU, Hong S (2012) Carbon-coated iron oxide nanoparticles as contrast agents in magnetic resonance imaging. *Nanoscale Research Letters*, 7 44

Biswas A, Bayer IS, Biris AS, Wang T, Dervishi E, Faupel F (2012) Advances in top–down and bottom–up surface nanofabrication: techniques, applications & future prospects. *Advances in Colloid and Interface Science*, 170:2–27

Bucak S, Yavuzturk B. Demir Ali (2012) *Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Surface Modifications and Application in Drug Delivery*. 10.5772/52115.

Cao M, Li Z, Wang J, Ge W, Yue T, Li R, Colvin VL, Yu WW (2012). Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 27 47

Deng H, Li X, Peng Q, Wang X, Chen J, Li Y (2005) Monodisperse magnetic single-crystal ferrite microsphere. *Angewandte Chemie International Edition*, 44:2782-2785

Faraji M, Yamini Y, Rezaee M (2010) *Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications*. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 7:1-37.

Gallocchio F, Belluco C, Ricci A (2015) Nanotechnology and food: brief overview of the current scenario. *Procedia Food Science*, 5:85–88.

Geonmonod RS, Da Silva AGM, Camargo PHC (2017) Controlled synthesis of noble metal nanomaterials: motivation, principles, and opportunities in nanocatalysis. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 90:719–744.

Gupta AK, Gupta M (2005) Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26:3995-4021.

He X, Hwang H (2016) Nanotechnology in food science: functionality, applicability, and safety assessment. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24:671–681.

Jeevanandam J, Barhoum A, Chan YS, Dufresne A, Danquah MK (2018) Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9:1050–1074.

Kolahalam LA, Kasi Viswanath IV, Diwakar BS, Govindh B, Reddy V, Murthy YLN (2019) Review on nanomaterials: synthesis and applications. *Materials Today: Proceedings*

LaMer VK, Dinegar RH (1950) Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. *Journal of the American Chemical Society*, 72:4847–4854.

Lu A, Salabas EL, Schuth F (2007) Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46:1222-1244

Mascolo MC, Pei Y, Ring TA (2013) Room temperature co-precipitation synthesis of magnetite nanoparticles in a large pH window with different bases. *Materials*, 6:5549-5567

Massart R (1981) Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetics*, 17:1247-1248

Morel AL, Nikitenko SI, Glonnet K, Wattiaux A, Lai-Kee-Him J, Labrugere C, Chevalier B, Deleris G, Petibois C, Brisson A, Simonoff M (2008) Sonochemical Approach to the Synthesis of Fe₃O₄@SiO₂ Core-Shell Nanoparticles with Tunable Properties. *ACS Nano*. 2: 847-856

Neuberger T, Schopf B, Hofmann H, Hofmann M, von Rechenberg B (2005) Superpara-magnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293: 483–496.

Park J, An K, Hwang Y, Park JG, Noh HJ, Kim JY, Park JH, Hwang NM Hyeon T (2004) Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nature Materials*, 3 891

Polte J (2015) Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles— a new perspective. *CrystEngComm*, 17:6809–6830.

Safari J, Zarnegar Z, Hekmatara H (2015) Green Synthesis of Fe₃O₄ Nanoparticles and Survey their Magnetic Properties. *Synthesis and Reactivity in Inorganic Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*, 46: 1047–1052

Shen M, Cai H, Wang X, Cao X, Li K, Wang S, Guo R, Zheng L, Zhang G, Shi X (2012) Facile one-pot preparation, surface functionalization, and toxicity assay of APTS-coated iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology*, 23 105601

Sreeja V, Joy PA (2007) Microwave-hydrothermal synthesis of γ -Fe₂O₃ nanoparticles and their magnetic properties. *Materials Research Bulletin*, 42:1570-1576.

Stöber W, Fink A, Bohn E (1968) Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1: 62–69

Suslick KS (1990) *Sonochemistry Science*, 247: 1439

Sulistyaningsih T, Santosa SJ, Siswanta D, Rusdiarso B (2017) Synthesis and characterization of magnetites obtained from mechanically and sonochemically assisted co-precipitation and reverse co-precipitation. *Methods*, 5: 3-6

Tajabadi M, Khosroshahi ME (2012) Effect of Alkaline Media Concentration and Modification of Temperature on Magnetite Synthesis Method Using FeSO₄/NH₄OH. *International Journal Chemical Engineering Applications*, 3: 206-210

Walton RI (2002) Subcritical solvothermal synthesis of condensed inorganic materials. *Chemical Society Reviews*, 31 230

Wongwailikhit K Horwongsakul S (2011) The preparation of iron (III) oxide nanoparticles using w/o microemulsion. *Materials Letters*, 65: 2820

Wu W, He Q, Jiang C (2008) Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Research Letters*, 3:397-415.

Wu W, Wu Z, Yu T, Jiang C, Kim W (2015) Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 16: 1-43

Xu H, Zeiger BW Suslick KS (2013) Sonochemical synthesis of nanomaterials *Chemical Society Reviews*, 42 2555

Yang C, Wang G, Lu Z, Sun J, Zhuang J, Yang W (2005) Effect of ultrasonic treatment on dispersibility of Fe₃O₄ nanoparticles and synthesis of multi-core Fe₃O₄/SiO₂ core/shell nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 15: 4252–4257

Yang XQ, Grailer JJ, Rowland IJ, Javadi A, Hurley SA, Steeber DA, Gong SQ (2010) Multifunctional SPIO/ DOX-loaded wormlike polymer vesicles for cancer therapy and MR imaging. *Biomaterials*, 31 9065

Yew YP, Shameli K, Miyake M, Khairudin NBB, Mohamad SEB, Naiki T, Lee KX (2018) Green biosynthesis of superparamagnetic magnetite Fe₃O₄ nanoparticles and biomedical applications in targeted anticancer drug delivery system: a review. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1): 2287-2308

CAPÍTULO 4. FUNCIONALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE Fe₃O₄@TEOS@ALICINA

4.1. Introducción

Las IONPs pueden ser obtenidas mediante diversas técnicas como la coprecipitación, hidro/solvo térmico, sol gel, microemulsión, entre otras (Shen et al. 2018; Ghorbani et al. 2018). El método de coprecipitación es uno de los más empleados para la síntesis de IONPs. Estas nanopartículas presentan múltiples propiedades como un tamaño pequeño, susceptibilidad magnética, biocompatibilidad, baja toxicidad, estabilidad, fácil modificación de superficie y pueden ser controladas mediante un campo magnético externo (Lu et al. 2017). Sin embargo, las IONPs son inestables por el medio ambiente y es necesario funcionalizar la superficie con recubrimientos orgánicos (polímeros, moléculas pequeñas, biomoléculas) o inorgánicos (silica, óxidos metálicos, carbono) (Zhu et al. 2018). En los últimos años, se han diseñado materiales de recubrimiento biocompatibles y biodegradables como los fitoquímicos presentes en las plantas los cuales se pueden unir a la superficie de las IONPs (Yew et al. 2018). Por ejemplo, Nosrati y colaboradores (2017) usaron el método de coprecipitación para la síntesis de IONPs las cuales fueron funcionalizadas con albúmina y curcumina. Por otro lado, Ghosh y colaboradores (2015) funcionalizaron IONPs con ácido cítrico y diosgenina presente en *Dioscorea bulbifera*. Otro ejemplo, fueron Ramirez-Nuñez y colaboradores (2017) los cuales sintetizaron IONPs mediante síntesis verde utilizando polifenoles extraídos de canela y vainilla. Estas nanopartículas mostraron su efectividad contra células BV-2. Usualmente, las IONPs funcionalizadas con fitoquímicos han sido utilizadas en aplicaciones biomédicas, remediación ambiental y tecnología alimentaria (Ali et al. 2016; Gallocchio et al. 2015). En este Capítulo se profundiza en la funcionalización de las nanopartículas obtenidas previamente con extracto de alicina. Además, se realizó la caracterización de estos materiales resaltando sus características (tamaño, morfología, carga superficial, fases) y posibles aplicaciones.

4.2. Antecedentes

En el Capítulo 2 se analizó a detalle los diferentes métodos de síntesis de nanopartículas. Por otro lado, en aplicaciones como las de uso biomédico la aplicación de IONPs depende de tres factores: la morfología, el tamaño y las propiedades de superficie.

Durante la síntesis, la morfología de las IONPs puede ser afectada por factores severos, tales como la presencia de tensoactivos (ejemplo: oleamina), concentración de reactivos, temperatura o tiempo (Zhang et al. 2006; Xie et al. 2018). La morfología puede afectar la biodistribución y el tiempo de circulación en el flujo sanguíneo. Algunos estudios han resaltado la influencia de la forma de las nanopartículas en la liberación controlada de fármacos (Jindal 2017; Phouc et al. 2018). Sin embargo, para las IONPs el factor de la morfología no ha sido estudiado ampliamente. Por ejemplo, Zhou y colaboradores (2012) sintetizaron IONPs con diferentes morfologías como octaedros, varas, cubos y hexágonos. En este estudio las nanopartículas hexagonales mostraron baja viabilidad (aprox. 70%) en células A59 pero el efecto de las distintas morfologías en la viabilidad celular no ha sido probada todavía.

El tamaño de las nanopartículas es un factor que influye en la liberación controlada de fármacos, se han reportado que partículas con diámetros menores a 10 nm son removidos del cuerpo por aclaramiento renal. Mientras que partículas con diámetros mayores que 200 nm son concentradas en el bazo o absorbidas por las células fagocíticas del cuerpo (Chouly et al. 1996). Las nanopartículas con tamaños entre 10 y 200 nm son ideales para aplicaciones biológicas debido a que aumentan su biodistribución y facilitan su eliminación (Xie et al. 2018; Gupta y Wells, 2004).

Por otra parte, una alta área superficial en las nanopartículas está relacionada con estabilidad coloidal. Además, los elevados valores de potencial zeta (negativos o positivos) indican una buena dispersión y baja aglomeración durante el almacenamiento. Las nanopartículas utilizadas en modelos *in vivo* deben evitar la adsorción inespecífica de proteínas y otras macromoléculas biológicas (Hu et al. 2018). Por otro lado, la carga de la superficie de las nanopartículas determina su

distribución en el organismo. Las cargas neutras interactúan mínimamente con las proteínas plasmáticas y contribuyen a extender el tiempo de circulación en sangre (Reddy et al. 2012). Las IONPs aniónicas interactúan eficientemente con las células mediante endocitosis, pero si la membrana celular tiene una ligera carga negativa las IONPs con una superficie positiva son absorbidas mediante atracciones electrostáticas (Yew et al. 2018; Billotey et al. 2003).

4.2.1. Caracterización de las nanopartículas

Una vez que se ha realizado la síntesis de IONPs, la caracterización de las propiedades fisicoquímicas puede desarrollarse con diferentes técnicas, las cuales se enfocan en investigar parámetros como el tamaño, forma, distribución de tamaño y propiedades magnéticas (Ansari et al. 2019).

4.2.1.1. Técnicas microscópicas

Existen equipos con alta resolución de imagen como el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) y el Microscopio Electrónico de Transmitancia (TEM) y se utilizan ampliamente para determinar la morfología de la superficie y la estructura interna de las nanopartículas. SEM produce imágenes utilizando electrones reflejados (o desprendidos) mientras que TEM detecta la transmisión de electrones los cuales nos dan información sobre la estructura interna de las IONPs (por ejemplo, la estructura cristalina) (Hurley et al. 2015).

4.2.1.2. Técnicas espectrofotométricas

Algunas técnicas espectrofotométricas son utilizadas para la caracterización de IONPs como la difracción de rayos X la cual nos da información sobre la estructura cristalina de las partículas. La espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) detecta grupos funcionales debido a la presencia de moléculas que absorben la luz en la región de 2.5 μm a 15 μm (Gopal et al. 2015).

Otras técnicas como la resonancia magnética nuclear (NMR) son usadas para estudiar la estructura de los compuestos proporcionando información sobre los enlaces específicos y la estereoquímica de moléculas de interés (Babic et al. 2018).

Además, la estabilidad térmica de las IONPs puede ser determinada usando análisis termogravimétrico (Das et al. 2017).

La dispersión de luz dinámica (DLS) es una técnica que se emplea para determinar el diámetro hidrodinámico de las IONPs (entre 30 y 190 nm) mediante la ecuación de Stokes-Einstein (Lim et al. 2013). También la caracterización electrostática de la superficie de las nanopartículas se puede analizar con el potencial Z (Roca et al. 2018). La espectroscopía de masas requiere una cantidad muy pequeña de muestra y determina el peso molecular y las propiedades de la superficie con gran exactitud y precisión.

Por otro lado, la espectroscopía de fluorescencia se emplea normalmente para estudiar los efectos de la concentración, la difusión molecular y la cinética química. La espectroscopia Raman permite determinar la conformación estructural de IONPs sin la necesidad de ninguna preparación sofisticada de muestras (Ali et al. 2016).

4.2.1.3. Técnicas magnéticas

Las propiedades magnéticas de las IONPs pueden ser analizadas midiendo la magnetización de las muestras aplicando campos magnéticos (desde -10000 a 10000 Oe a una temperatura dada). El magnetómetro de muestra vibrante (VSM) y el dispositivo de interferencia cuántica superconductora (SQUID) son las técnicas más comunes para medir parámetros como saturación magnética, campos coercitivos y magnetización remanente (Tarantash et al. 2018).

4.2.2. Aplicaciones de las nanopartículas con recubrimientos biológicos

Las IONPs han sobresalido en los campos de la medicina debido a su alta biocompatibilidad, magnetismo y transferencia de electrones (Arias et al. 2018). Sin embargo, también se han utilizado en el campo del medio ambiente y los alimentos (Figura 4.1).

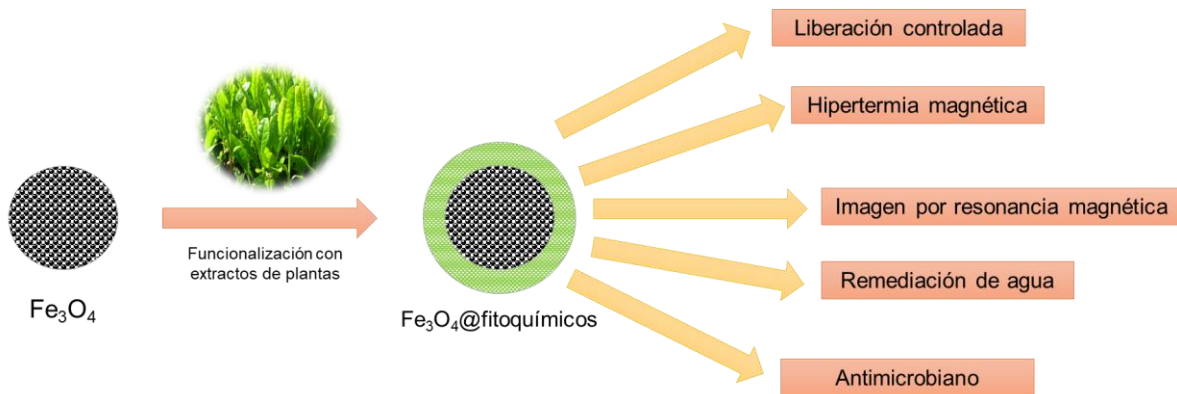


Figura 4.1. Aplicaciones de IONPs funcionalizadas con fitoquímicos

4.2.2.1. Aplicaciones biomédicas

Como se ha mencionado anteriormente, las principales aplicaciones de las IONPs están en el campo de la medicina y se utilizan como vehículos de liberación controlada, en la resonancia magnética de imagen (MRI), hipertermia, reparación de tejidos, entre otros (Siddiqi et al. 2016).

La MRI tiene una fuerte influencia en el diagnóstico temprano de cáncer y las IONPs son utilizadas comúnmente como agente de contraste (Zhou y Wei, 2017). Por ejemplo, Malekzadeh y colaboradores funcionalizaron IONPs con quercetina para ser utilizadas en la detección y tratamiento de células HeLa y MDA-MB-231. Además, estas nanopartículas mostraron alta biocompatibilidad (>80%) con células control usando concentraciones de 25-100 µg/mL. Por otro lado, Ghorbani y colaboradores (2018) funcionalizaron IONPs con oro, curcumina (agente natural anticáncer) y glutatión (molécula reconocida por las células) las cuales fueron utilizadas como agente de contraste y mostraron baja toxicidad (40%) con astrocitos normales. En contraste, estas nanopartículas mostraron una reducción en la proliferación de células U87MG del 63% después de 48 h usando concentraciones de 100 µg/mL.

Las IONPs pueden ser funcionalizadas con fármacos, administradas mediante una inyección en el flujo sanguíneo y liberadas en un área específica mediante un campo magnético externo (Lungu et al. 2019). Debido al pequeño tamaño, la gran área superficial y las propiedades magnéticas de las IONPs se pueden mover hacia los tejidos dañados mediante la acción de un campo magnético externo (Wu y Huang,

2017). La incorporación de fitoquímicos en las IONPs puede mejorar la tolerancia en células normales y disminuir la toxicidad comparado con los fármacos usados en la quimioterapia (Wei et al. 2019). Por ejemplo, Barahui y colaboradores (2016) funcionalizaron IONPs con quitosano y ácido fítico (compuesto natural presente en semillas y cereales) las cuales inhibieron la proliferación de células cancerígenas en colon sin causar daño a los fibroblastos. Por otro lado, se ha reportado la funcionalización de IONPs con resveratrol (un antioxidante natural presente en nueces, uvas y vino) y evitaron la proliferación de células cancerígenas después de 24 h utilizando concentraciones de 50 μM (Salem et al. 2019).

Por otra parte, la hipertermia consiste en la generación de calor mediante un campo magnético externo donde las IONPs pueden generar efectos térmicos ayudando a la destrucción de biopelículas y células cancerígenas (Carrey et al. 2011). Por ejemplo, Ramirez-Nuñez funcionalizaron IONPs usando extractos de canela y vainilla, estas nanopartículas fueron usadas para hipertermia en modelos in vitro causando una reducción del 88% de células BV-2 después de 30 min. También se ha reportado la funcionalización de IONPs con galato de epigallocatequina (compuesto natural presente en té verde) mostrando su eficiencia como agente de contraste, vehículo de liberación y en la hipertermia sobre tumores de prostata de ratón (Yin et al. 2017).

4.2.2.2. Aplicaciones en el medio ambiente

Las IONPs sintetizadas a partir del extracto de hojas de té verde han demostrado su efectividad para la eliminación de colorantes orgánicos como el azul de metileno y el naranja de metilo en medio acuoso. Además, son muy eficaces en la eliminación de colorantes catiónicos y aniónicos en un amplio intervalo de concentraciones de 10 a 200 mg/L (Shahwan et al. 2011).

Por otro lado, El-Said y colaboradores (2017), funcionalizaron IONPs con TEOS y extracto de hojas de té verde las cuales fueron utilizadas para el tratamiento de agua, estas nanopartículas mostraron una eliminación del 99% de lindano usando 90 mg/L.

Otro ejemplo fue reportado por Ramesh y colaboradores (2018) donde funcionalizaron IONPs con extracto de *Zanthoxylum armatum* DC el cual sirvió como agente reductor y de remoción. Estas nanopartículas se utilizaron en la eliminación de azul de metileno mostrando una capacidad de adsorción de 10.4112 mg/g.

4.2.2.3. Aplicaciones en la industria alimentaria

Las IONPs han demostrado su importancia en áreas como la medicina o la remediación del medio ambiente. Sin embargo, en la industria alimentaria no existen muchos estudios por lo que podría convertirse en un área de investigación con grandes expectativas. Alavi y colaboradores (2019) utilizaron los extractos de *Artemisia haussknechtii* para la síntesis de IONPs, las nanopartículas mostraron efecto antioxidante y antimicrobiano contra cepas de *E. coli* ATCC 25922, *S. marcescens*. ATCC13880 y *S. aureus* ATCC 43300.

Recientemente, Bhuiyan y colaboradores (2020) reportaron la síntesis verde de IONPs con extracto de hojas de *Carica papaya*, estas nanopartículas expusieron actividad antimicrobiana contra cepas de *Klebsiella spp.*, *E. Coli*, *Pseudomonas spp.* y *S. aureus*.

4.2.3. Toxicidad de IONPs

Los iones de hierro tienen diferentes roles en el proceso fisiológico como síntesis de ADN, transporte de oxígeno, respiración celular y funciones metabólicas a nivel del sistema nervioso central. Por el contrario, la toxicidad de IONPs implica la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que afectan a las macromoléculas y organelos de las células (Yarjanli et al. 2017).

Durante este proceso los iones de Fe^{2+} reaccionan con H_2O_2 generando ROS (reacción de Fenton). Posteriormente, la alta concentración de ROS provoca una cascada de eventos como la liberación de más iones de hierro y efectos perjudiciales sobre la membrana lisosomal, peroxidación lipídica, daño de proteínas, rotura de cadenas de ADN y degradación de bases, mutaciones o translocaciones a nivel nuclear. Además, la concentración de iones de hierro facilita la apoptosis a través de las mitocondrias. También, la acumulación de hierro contribuye a las

enfermedades neurodegenerativas, debido a la agregación de proteínas como A β y α -sinucleína (Yarjanli et al. 2017; Niu et al. 2019).

Sin embargo, la toxicidad de IONPs depende del tamaño, concentración, carga superficial, y los grupos funcionales en el recubrimiento (Arias et al. 2018; Ansari et al. 2017). Por ejemplo, Yin y colaboradores (2017) realizaron un ensayo de toxicidad en ratones portadores los cuales fueron sacrificados y sus principales órganos, como el corazón, hígado, bazo, pulmones y riñones. Los resultados demostraron que los órganos principales, en todos los grupos de experimentos, no mostraron toxicidad significativa en comparación con el grupo de control.

Por otro lado, Ghorbani y colaboradores (2018) llevaron a cabo un ensayo de hemólisis donde las IONPs funcionalizadas con curcumina desarrollaron una actividad hemolítica más baja en comparación con las IONPs sin curcumina, lo cual podría explicarse por la carga negativa de la superficie de la nanopartícula. Además, realizaron un ensayo de complemento y activación plaquetaria con la finalidad de evaluar reacciones de hipersensibilidad y la generación de trombosis. Las IONPs funcionalizadas con curcumina fueron menos propensas a causar la activación del complemento e impiden la activación plaquetaria.

Otro estudio reportado por Dai y colaboradores (2017) mostraron una actividad hemolítica extremadamente baja (<5%) en IONPs recubiertas con lignina y resveratrol, lo que podría estar asociado por la presencia de lignina. Además, utilizaron un indicador de respuesta de hipersensibilidad que no demuestra cambio significativo en comparación con el grupo de control. Por lo tanto, estas nanopartículas han demostrado poseer buena biocompatibilidad. A pesar de las numerosas aplicaciones de las IONPs funcionalizadas con compuestos naturales de plantas, no se dispone de suficiente información sobre su toxicidad y degradación en el organismo.

4.3. Metodología experimental

4.3.1. Síntesis de nanopartículas de Fe₃O₄@TEOS@alicina

Para la síntesis de las nanopartículas Fe₃O₄@TEOS@alicina se pesaron 500 mg de nanopartículas Fe₃O₄@TEOS (las cuales se obtuvieron considerando las condiciones óptimas) y se mezclaron con 1 mL del extracto optimizado de *Allium sativum* durante 30 min a temperatura ambiente. Las partículas obtenidas se separaron con un imán de neodimio y se lavaron con agua destilada y se secaron en la estufa a 35°C por 24 h.

4.3.2. Caracterización de las nanopartículas de óxido de hierro

4.3.2.1. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros FT-IR se obtuvieron en un espectrofotómetro FT-IR Spectrum GX de Perkin Elmer y a partir de una pastilla de KBr, mezclando la muestra (nanopartículas de Fe₃O₄, Fe₃O₄@TEOS y Fe₃O₄@TEOS@alicina) con KBr en relación 1:100 en la región entre 4000-400 cm⁻¹.

4.3.2.2. Difracción de rayos X de polvos

Para las nanopartículas Fe₃O₄, Fe₃O₄@TEOS y Fe₃O₄@TEOS@alicina se determinó la composición y la estructura cristalina del material por difracción de rayos X (DXR) de polvos, con la finalidad de observar diferencias entre los métodos. Para ello, la muestra previamente seca se colocó y se distribuyó de manera uniforme en un portamuestras. Posteriormente, se realizó el análisis de la muestra en un difractómetro Equinox 2000 durante 5 min utilizando radiación de cobalto (K_α=1.789010 Å) a 30 kV y 20 mA.

Para visualizar el patrón de difracción obtenido para cada una de las muestras y comparar con los difractogramas estándar de la base de datos de cristalografía (COD) se utilizó el programa Match ! 3 (Crystal Impact, Alemania).

4.3.2.3. Potencial Zeta

La medición de potencial Z se realizó en un equipo Malvern Zetasizer nano-sz. Las medidas se realizaron a diferentes valores de pH en el intervalo de 2-11. El control de pH se realizó mediante un autotitulador Malvern modelo MPT-3 con soluciones de HCl y NaOH 0.1 M.

4.3.2.4. Termogravimetría

El análisis termogravimétrico se realizó en el equipo TGA modelo Q-2950 marca TA instruments, USA utilizando atmósfera de nitrógeno a 50 mL/min para un intervalo de temperatura de 25 hasta 800°C y una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Se analizaron las nanopartículas Fe₃O₄, Fe₃O₄@TEOS y Fe₃O₄@TEOS@alicina

4.3.2.5. Microscopía Electrónica de Transmisión

El tamaño y morfología de las nanopartículas Fe₃O₄, Fe₃O₄@TEOS y Fe₃O₄@TEOS@alicina se observaron en un equipo TEM JEOL JEM2010 de 200 kV con alta resolución. El análisis de las micrografías se realizó mediante el programa ImageJ Software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

4.3.2.6. Magnetometría de muestra vibrante

La magnetización y coercitividad de la muestra se determinó con el magnetómetro High sensitive Quantum Design MPMS 3 SQUID a diferentes temperaturas. Se analizaron las nanopartículas Fe₃O₄, Fe₃O₄@TEOS y Fe₃O₄@TEOS@alicina. Se realizaron mediciones de magnetización por calentamiento con enfriamiento de campo cero (ZFC) y enfriamiento de campo (FC) dependientes de la temperatura en el rango de temperatura de 2 a 300 K y las mediciones de magnetización dependientes del campo se realizaron a temperaturas de 2 K y 300 K.

4.3.2.7. Prueba de recubrimiento

Con la finalidad de corroborar la presencia de compuestos antioxidantes en las nanopartículas de Fe₃O₄@TEOS, se mezclaron diferentes cantidades de

Fe₃O₄@TEOS (50, 100, 150, 200, 250 mg) con el extracto optimizado de ajo por 30 min. En cada una de las mezclas se separaron las nanopartículas con un imán de neodimio y se recolectó el sobrenadante. Posteriormente, se evaluó la capacidad antioxidante vía DPPH* y ABTS* de los sobrenadantes obtenidos.

Para ello se mezclaron 0.2 mL del sobrenadante con 2.8 mL del reactivo DPPH* por 1 h. Más tarde, a la solución se le midió la absorbancia a 512 nm. La actividad antioxidante vía ABTS* se realizó de la siguiente manera: se mezclaron 0.1 mL del sobrenadante con 3.9 mL de reactivo ABTS por 6 min. después, se midió la absorbancia a 734 nm. Además, se determinó la concentración de la alicina mediante la metodología anteriormente mencionada. Previo a la lectura de absorbancia, cada una de las mezclas se filtró con un microporo (0.2 µm). Los análisis se realizaron por triplicado.

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Caracterización de nanopartículas

4.4.1.1. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

Una vez obtenidos los soportes magnéticos funcionalizados optimizados, se realizó el análisis por espectroscopia en el infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), el espectro obtenido se muestra en la Figura 4.2.

En la Figura 4.2A se observa la banda característica de Fe-O a 613 cm⁻¹ (Mishra et al. 2014) mientras que no se observan las bandas 525 y 450 cm⁻¹ (525 y 450 cm⁻¹) las cuales indican presencia de hematita (Davar et al. 2016). Por otro lado, la vibración Si-O se encuentra presente en la Figura 4.2B a 1104 cm⁻¹ (Mashhadizadeh et al. 2013). Rath y Sen (2019) sintetizaron nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas con alicina mostrando la presencia de bandas a 603, 1031, 1403, 1645 y 3368 cm⁻¹ las cuales corresponden a la presencia de enlaces -CH de alquinos, -SO₂ de sulfonas, -OH de carboxilatos, -C=O de péptidos y grupos hidroxilos.

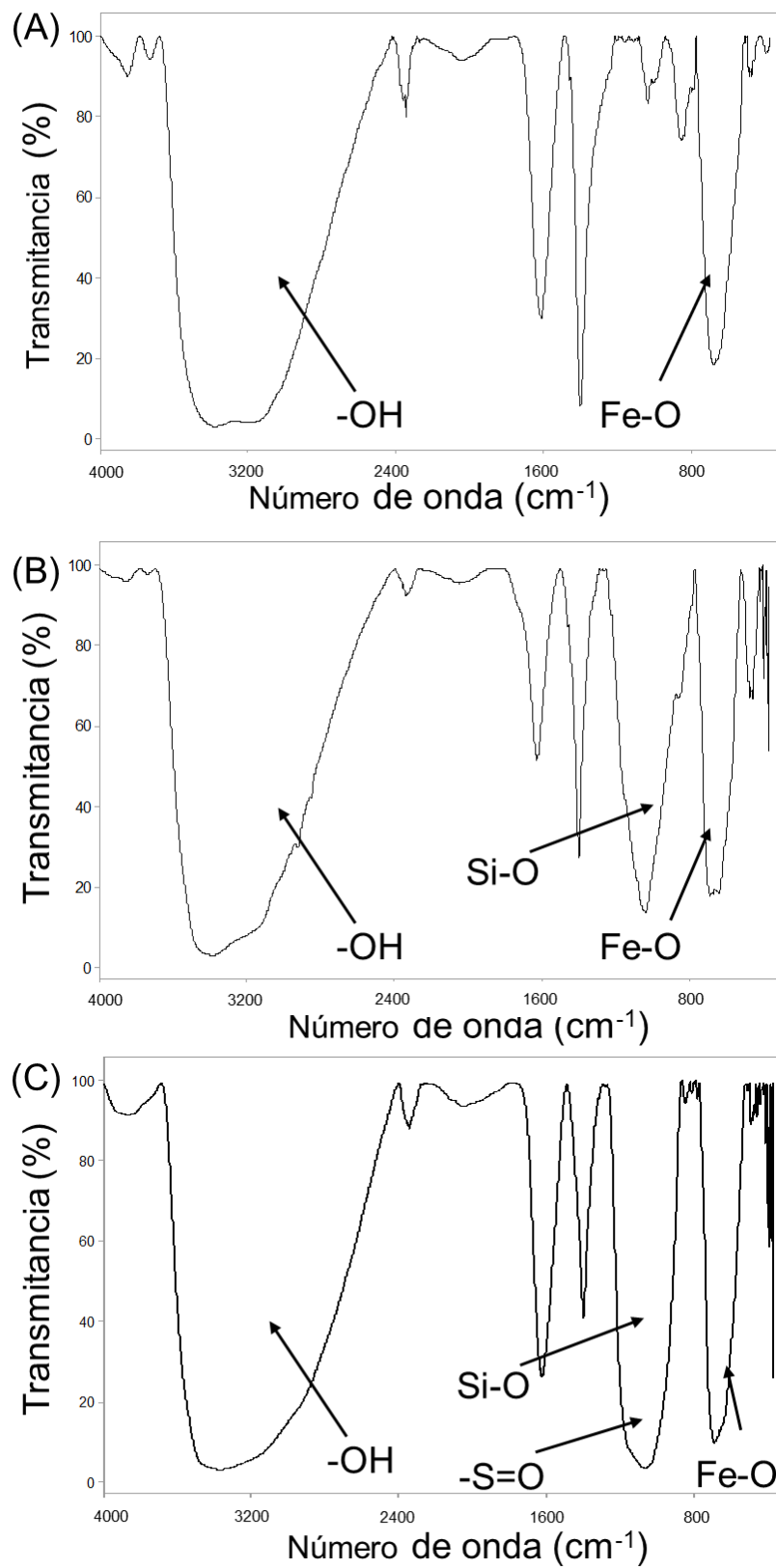


Figura 4.2. Espectros de infrarrojo de nanopartículas Fe₃O₄, Fe₃O₄@TEOS y Fe₃O₄@TEOS@allicina

En el espectro mostrado en la Figura 4.2C se observa que las bandas entre 1000-1100 cm^{-1} son similares pero el pico de la muestra de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@$ alicina es ligeramente mayor comparado con la muestra $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$. Por otra parte, las tres muestras presentan picos en 1630 y 1450 cm^{-1} los cuales están asociados con la presencia de agua absorbida y NH_4OH residual (Huang et al. 2014, Khoshenevisa et al. 2012). Los resultados mostrados sugieren la presencia de alicina del extracto de ajo en la superficie de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@$ alicina.

4.4.1.2. Difracción de Rayos X de polvos

La Figura 4.3 muestra los difractogramas obtenidos de las diferentes nanopartículas. Para la magnetita se observan los picos característicos en (220), (311), (400) y (422), los cuales corresponden con el espectro de difracción estándar de Fe_3O_4 (JCPDSPDF#19-0629) (Yang et al. 2018; Wang et al. 2017). Las señales de XRD presentan estructura cristalina y las fases corresponden a una estimación semicuantitativa de magnetita. Por lo tanto, se puede considerar que las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@$ alicina presentan fase de magnetita debido a que todo el polvo obtenido es atraído por un imán.

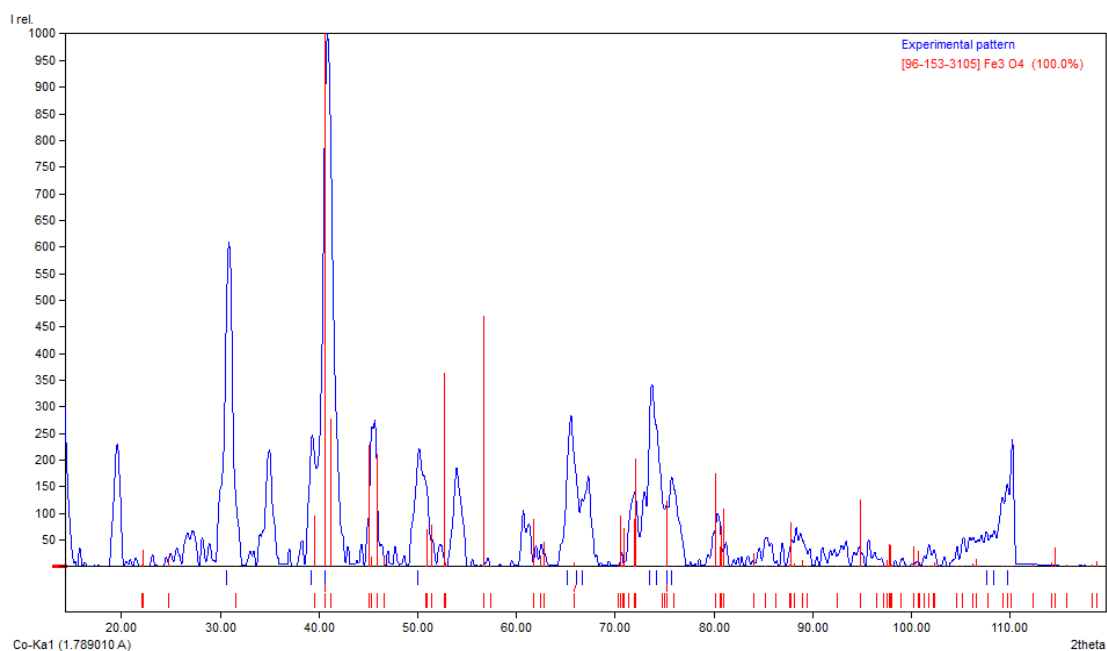


Figura 4.3. Difractogramas de las nanopartículas obtenidas comparado con el patrón de difracción estándar de magnetita (rojo)

4.4.1.3. Potencial Zeta

Las medidas del potencial Z (ζ) sirven para estimar la estabilidad de la suspensión coloidal y dependen del comportamiento que presentaron en suspensión con respecto al pH (Cosgrove, 2010).

Por otro lado, una gran superficie de contacto está relacionada con la estabilidad coloidal mientras que altos valores de ζ (positivos o negativos) indican buena dispersión y poca aglomeración durante el almacenamiento. Generalmente, las nanopartículas utilizadas en aplicaciones biomédicas deben evitar la adsorción con proteínas u otras macromoléculas biológicas. Además, las IONPs sin recubrimiento tienden a aglomerarse por su gran área superficial y fuertes interacciones magnéticas (Hu et al., 2018).

La Figura 4.4 muestra los cambios en la estabilidad de nanopartícula de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@$ alicina. Los resultados indican valores negativos de ζ cuando el pH es mayor a 6 mientras que se observan valores de ζ cercanos a 0 cuando el pH es menor a 5. Esto podría estar relacionado con la estabilidad de alicina en la superficie de la nanopartícula debido a que valores de pH ácidos (≤ 4) o básicos (≥ 10) descomponen rápidamente a la alicina (Mishra et al., 2000).

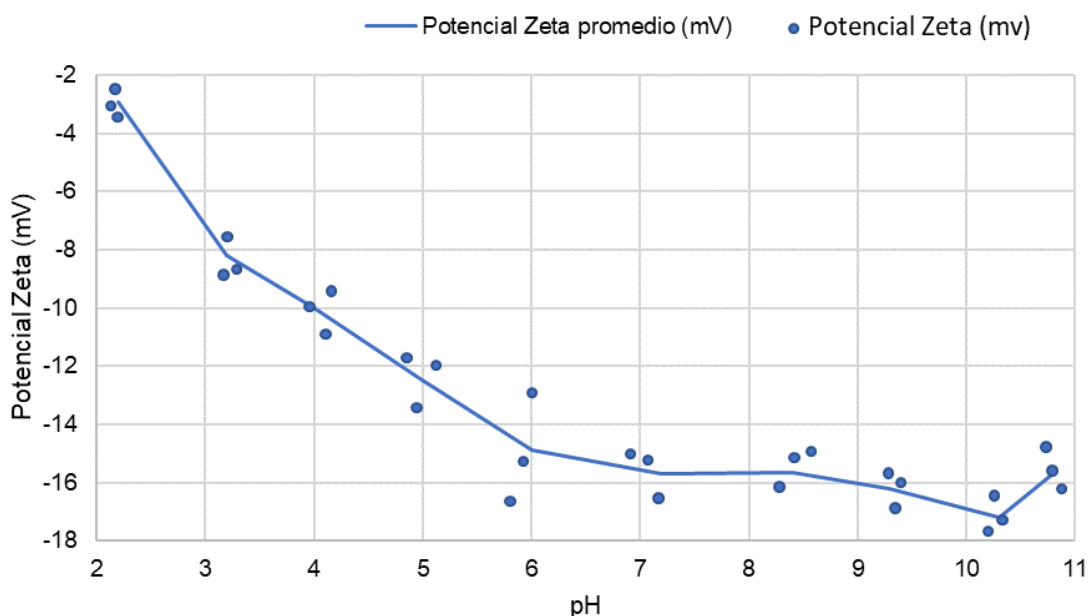


Figura 4.4. Variación de potencial zeta de las nanopartículas de óxido de hierro en suspensión en función del pH.

La carga superficial de las nanopartículas determina su distribución y asimilación en el cuerpo. Las cargas neutras interactúan mínimamente con las proteínas plasmáticas y favorecen la circulación de las IONPs en el flujo sanguíneo (Reddy et al., 2012). Por otra parte, la recepción celular se facilita cuando la membrana de las células tiene una ligera carga negativa la cual interactúa con la superficie positiva de las IONPs mediante atracciones electrostáticas (Yew et al.2018).

Además, las IONPs con carga negativa interactúan fácilmente con las células y son internalizadas por endocitosis (Billotey et al., 2003). Por lo tanto, la carga y la estabilidad de IONPs en las aplicaciones biomédicas se puede mejorar a través del revestimiento de la superficie. Los resultados sugieren que las nanopartículas de Fe₃O₄@TEOS@alicina pueden ser utilizadas en aplicaciones biomédicas.

4.4.1.4. Termogravimetría

En la Figura 4.5A se muestra el análisis termogravimétrico de las nanopartículas de Fe₃O₄. La primera derivada muestra un único pico, el cual está asociado con una pérdida de peso (aproximadamente 12%), la cual se identifica a temperaturas menores de 250°C. Este fenómeno se debe a la presencia de moléculas pequeñas como agua o etanol, las cuales pueden quedar en la superficie de la nanopartícula (Li et al. 2002).

Por otro lado, en la Figura 4.5B se muestra el análisis termogravimétrico de la muestra de Fe₃O₄@TEOS. La primera derivada presenta dos picos diferentes: el primero tiene un máximo en 180°C mientras que el segundo se encuentra alrededor de los 300°C. Además, se observa una pérdida de peso hasta los 350°C mostrando una pérdida de masa de aproximadamente 11%. El recubrimiento de TEOS presenta alta porosidad dificultando la volatilidad de las moléculas pequeñas como agua o etanol debido a que quedan atrapadas en la superficie de la nanopartícula (Villa et al. 2016).

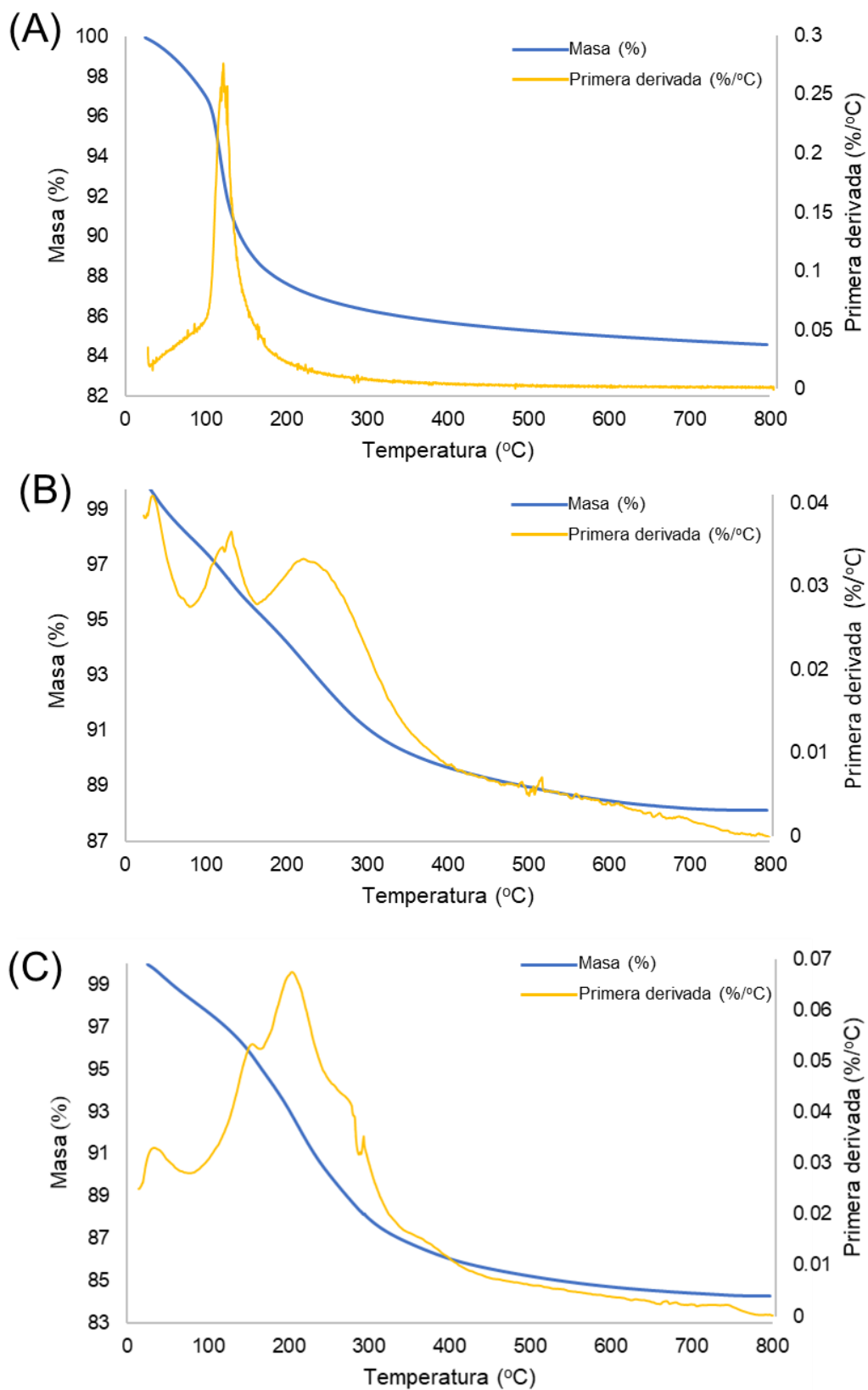


Figura 4.5. Termogravimetría de nanopartículas de Fe₃O₄, Fe₃O₄@TEOS y Fe₃O₄@TEOS@allicina

En la Figura 4.5C se muestra el análisis termogravimétrico de la muestra de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@$ alicina. La pérdida de peso se identifica a bajas temperaturas hasta los 350°C con una pérdida de masa (aproximadamente 14%). La primera derivada presenta tres picos: el primero está localizado cerca de los 180°C , el cual ya fue explicado previamente. El segundo pico se muestra inmediatamente después del primero exhibiendo una pérdida de peso hasta los 270°C . Finalmente, el tercer pico está en el intervalo de $270\text{-}400^\circ\text{C}$. La pérdida de masa es mayor comparada con los termogramas presentados anteriormente, lo cual puede ser asociado a la descomposición de la molécula de alicina. Sin embargo, no hay muchos estudios donde se analice la estabilidad térmica de la alicina.

Hassanzadeh et al. (2018) reportaron el análisis termogravimétrico de extracto de ajo y concluyeron que en el intervalo de $190\text{-}340^\circ\text{C}$ se produce una pérdida de masa, la cual está asociada con la degradación de moléculas residuales de compuestos volátiles presentes en el ajo como los compuestos organosulfurados.

Además, Rath y Sen (2019) sintetizaron nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas con extracto de ajo reportando una reducción de peso del 25% cuando la temperatura pasó de 110 a 600°C debido a la pérdida de agua y moléculas del extracto de ajo. Los resultados de este trabajo muestran una reducción de peso del 14 % lo cual puede ser asociado con la presencia de TEOS. La incorporación de SiO_2 en las nanopartículas de Fe_3O_4 puede proteger compuestos bioactivos y mejorar su liberación controlada (Zhou et al. 2018).

4.4.1.5. Microscopia Electrónica de Transmisión

La Figura 4.6A muestra el tamaño y la forma de las nanopartículas de Fe_3O_4 , se observan muchas zonas alineadas lo que está asociado a una estructura cristalina y la distancia entre capas (valor d) fue de aproximadamente 4.789 \AA . Por otro lado, la Figura 4.6B muestra el tamaño y la forma de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$, se observan pocas zonas alineadas, al realizar un acercamiento se observa un patrón, el cual está asociado a una estructura cristalina y el valor d fue de aproximadamente 2.018 \AA .

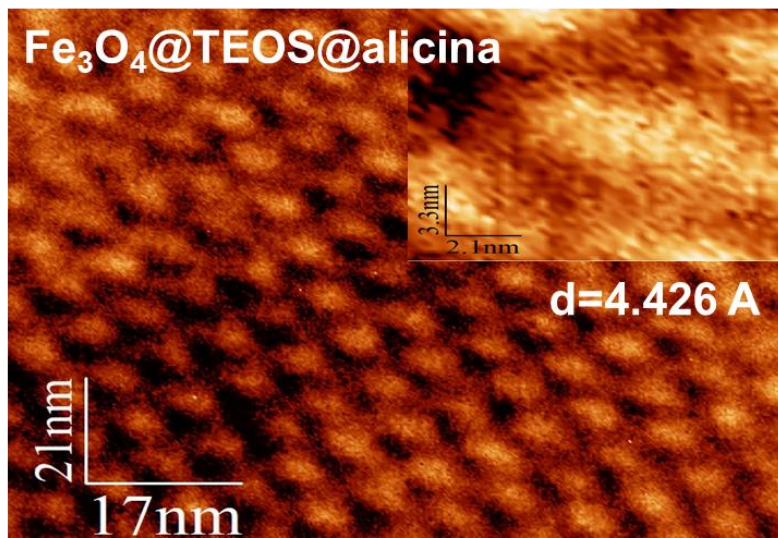
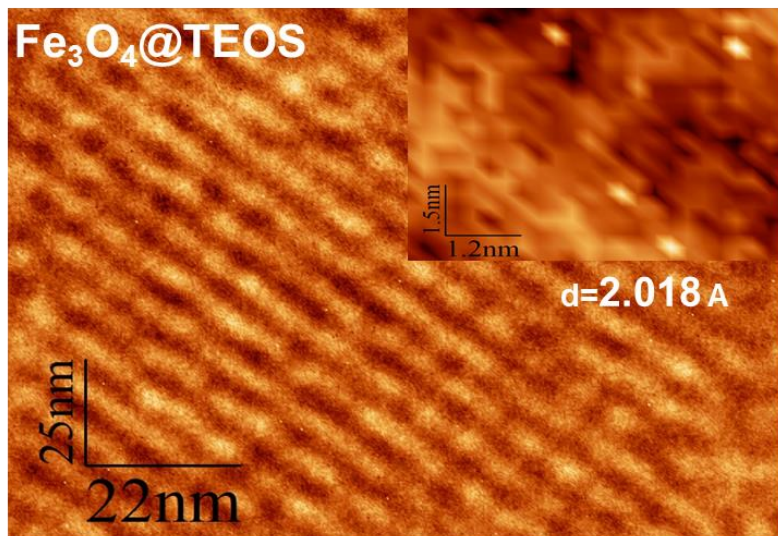
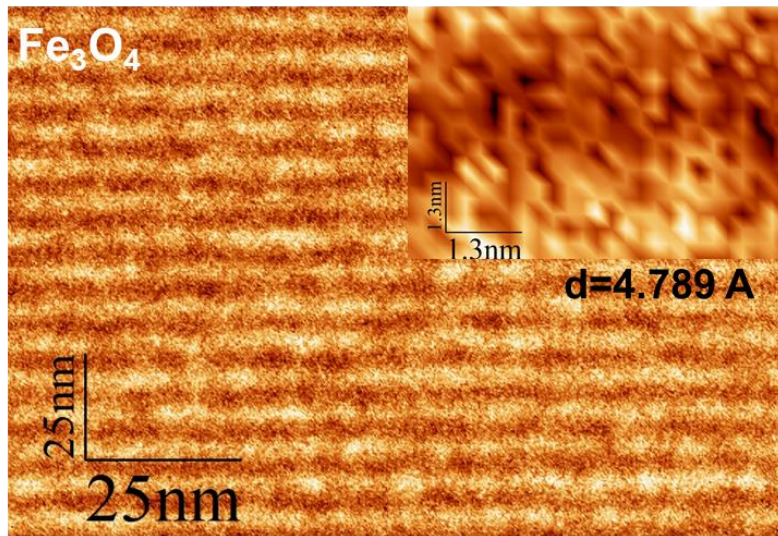


Figura 4.6. Microscopías de nanopartículas de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS@alicina$

Finalmente, la Figura 4.6C muestra el tamaño y la forma de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@$ alicina, se observan muchas zonas alineadas, las cuales se asocian a estructuras cristalinas y el valor d fue de aproximadamente 4.426 Å. De acuerdo con el análisis de microscopía, las tres muestras presentan estructuras hexagonales y tamaños de aproximadamente 16 nm. También, los valores d corresponden a los planos 111, 311 y 200, los cuales son valores cercanos a los calculados por el análisis DRX.

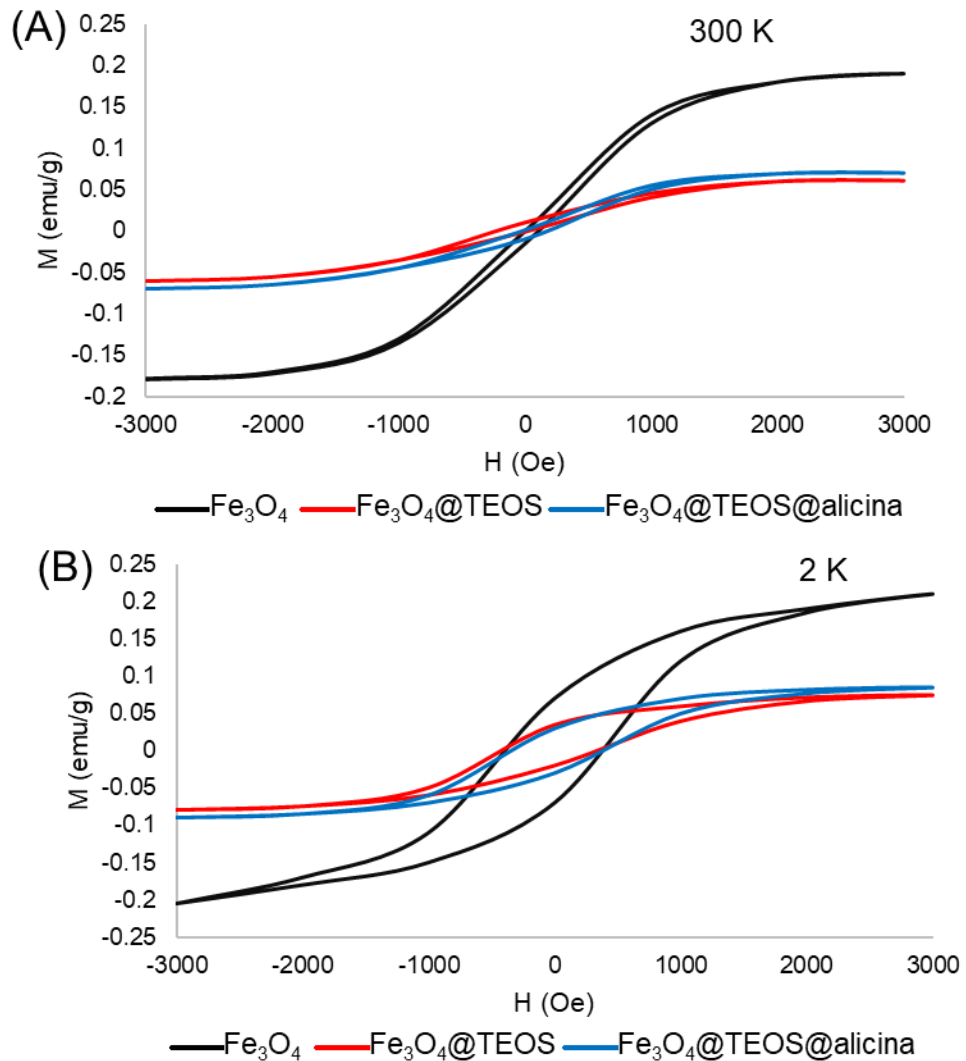
El tamaño de las IONPs es uno de los parámetros más importantes en las aplicaciones biomédicas debido a que influye en la farmacocinética y biodistribución de las nanopartículas en el flujo sanguíneo. Por ejemplo, Iannone y colaboradores (1991) administraron mediante inyección intravenosa IONPs funcionalizados con dextrano de tamaño de 40 y 200 nm. Los resultados mostraron un rápido aclaramiento renal en las partículas de 200 nm mientras que las partículas de 40 nm mostraron un lento aclaramiento facilitando su biodistribución y direccionamiento en un sitio específico en el organismo. En este trabajo se obtuvieron tamaños de 16 nm por lo que las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@$ alicina podrían utilizarse en aplicaciones biomédicas.

4.4.1.5. Magnetometría

En la Figura 4.7A y 4.7B se muestra la curva de magnetización (M) vs el campo magnético (H) a 2 y 300 K. Cuando la temperatura es de 2 K se observa que la saturación de magnetización (M_s) de la muestra de Fe_3O_4 es de 0.2 emu/g. Por otro lado, las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@$ alicina presentan una M_s más baja (0.07 emu/g). Los recubrimientos no son magnéticos por lo que disminuyen la polarización de las IONPs por lo que se comprueba la modificación de la nanopartícula de Fe_3O_4 .

Cuando la temperatura es de 300 K, la muestra Fe_3O_4 presenta una M_s baja (0.17 emu/g) lo cual se debe al aumento de la temperatura (Figura 4.7B). Por otro lado, las muestras de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}@$ alicina muestran una M_s de 0.5 emu/g debido a que no son materiales magnéticos debido a la polarización. Rath y

Sen (2019) reportaron que la incorporación de moléculas del extracto de ajo disminuye la magnetización debido a la naturaleza no magnética de los compuestos del ajo lo cual disminuye las interacciones de intercambio en el núcleo magnético.



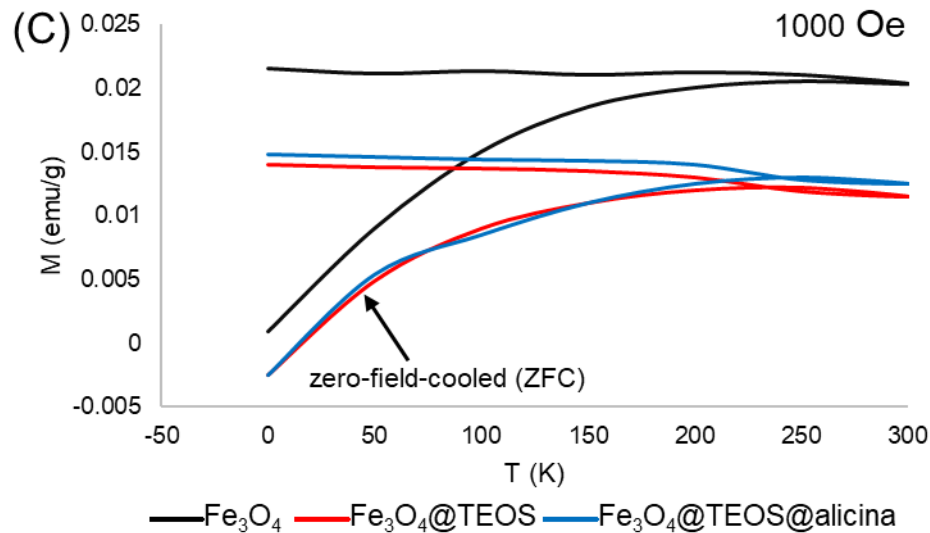


Figura 4.7. Magnetogramas de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS@allicina$

La Figura 4.7C muestra la dependencia de la magnetización con la temperatura para todas las muestras. Cuando la magnetización por calentamiento ZFC aumenta se observa que alcanza un punto máximo llamado temperatura de bloqueo (TB). En este punto, el momento magnético de las nanopartículas no se relaja durante el tiempo de medición (Zhang et al. 2009). Las nanopartículas de Fe_3O_4 mostraron una curva FC prolongada en comparación con las muestras funcionalizadas, demostrando su recubrimiento con TEOS y alicina. Los resultados sugieren la presencia de alicina en la superficie de las IONPs.

4.4.1.6. Prueba de recubrimiento

En la Figura 4.8A se observa como disminuye la concentración de alicina conforme aumenta la cantidad (mg) de $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS$. Cuando no se añaden nanopartículas, el sobrenadante tiene una concentración 0.34 ± 0.09 mM pero al añadir 250 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS$ la concentración del sobrenadante es de 0.20 ± 0.05 mM. La disminución de la concentración puede estar asociada con la incorporación de alicina sobre la superficie de las nanopartículas.

Por otro lado, la actividad antioxidante vía DPPH* muestra un aumento del remanente del reactivo conforme se incrementa la cantidad (mg) de $\text{Fe}_3\text{O}_4@TEOS$. El sobrenadante libre de nanopartículas muestra un porcentaje de DPPH*

remanente de 52% mientras que al aumentar la cantidad de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ a 250 mg el porcentaje de DPPH* remanente aumenta hasta el 71%. Este comportamiento indica que los compuestos con actividad antioxidante se incorporan a las nanopartículas (Figura 4.8B).

Con respecto al análisis ABTS*, se observa un comportamiento similar, la actividad antioxidante aumenta cuando se añade más cantidad de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$. El sobrenadante libre de nanopartículas muestra una actividad antioxidante de 32. Sin embargo, cuando la cantidad de partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$ aumenta a 250 mg, la actividad antioxidante disminuye a 17 mostrando que los compuestos con capacidad antioxidante se incorporan a las nanopartículas (Figura 4.8C).

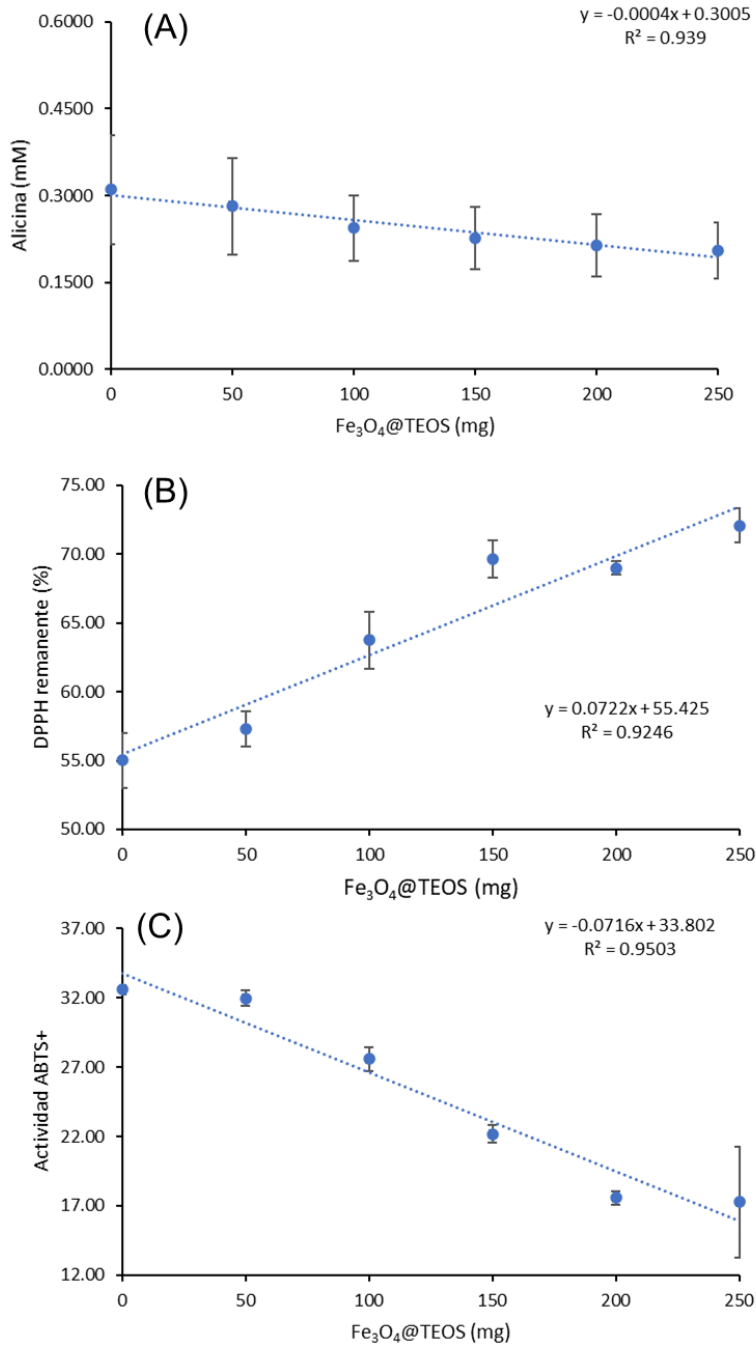


Figura 4.8. (A) Concentración de la alicina vs mg de Fe₃O₄@TEOS. (B) % DPPH remanente vs mg de Fe₃O₄@TEOS. (C) Actividad ABTS⁺ vs mg de Fe₃O₄@TEOS

Como se mencionó anteriormente, la incorporación de fitoquímicos en IONPs puede mejorar su solubilidad y estabilidad química. Además, la funcionalización de las nanopartículas con este tipo de compuestos presenta una alta citotoxicidad en las células cancerosas, en comparación con las células normales.

4.5. Conclusiones generales

Se obtuvieron las condiciones óptimas para la extracción de alicina de *Allium sativum* y conseguir la mayor concentración. Por otro lado, se establecieron las condiciones óptimas para la síntesis y funcionalización de Fe₃O₄@TEOS para obtener el menor tamaño de partícula. Además, los extractos se utilizaron para la incorporación de alicina sobre la superficie de las nanopartículas.

Finalmente, se realizó la caracterización de las Fe₃O₄@TEOS@alicina demostrando que el proceso de funcionalización se llevó a cabo de manera satisfactoria. Por ello, este tipo de soportes podría ser una buena alternativa para aplicaciones biológicas o en tecnología alimentaria.

Perspectivas

Con base en los resultados obtenidos durante el desarrollo de este proyecto, se presentan a continuación las perspectivas:

1. Desarrollar un estudio *in vitro* con la finalidad de evaluar el efecto terapéutico de las nanopartículas de Fe₃O₄@TEOS@alicina
2. Realizar un estudio farmacocinético y/o distribución de las nanopartículas de Fe₃O₄@TEOS@alicina.
3. Explorar nuevas aplicaciones de las nanopartículas de Fe₃O₄@TEOS@alicina como antimicrobiano o nano fertilizante para plantas.

Referencias

Alavi M, Karimi N (2019). Ultrasound assisted-phytofabricated Fe₃O₄ NPs with antioxidant properties and antibacterial effects on growth, biofilm formation, and spreading ability of multidrug resistant bacteria. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1): 2405–2423.

Ali A, Zafar H, Zia M, Haq I, Phull AR, Ali JS, Hussain A (2016) Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications*, 9:49–67.

Ansari MO, Ahmad F, Parveen N, Ahmad S, Jameel S, Shadab CGHA (2017) Iron oxide nanoparticles-synthesis, surface modification, applications and toxicity: a review. *Material Focus*, 6:1–11.

Ansari S, Ficiarà E, Ruffinatti F, Stura I, Argenziano M, Abollino, O, Cavalli R, Guiot C, D'Agata F (2019). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Functionalization for Biomedical Applications in the Central Nervous System. *Materials*, 12(3), 465

Arias LS, Pessan JP, Vieira APM, Lima TMT, Delbem ACB, Monteiro DR (2018) Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity. *Antibiotics (Basel)*, 7(2):46.

Babić-Stojić B, Jokanović V, Milivojević D, Požek M, Jagličić Z, Makovec D, Orsini NJ, Marković M, Arsikin K, Paunović V (2018) Ultrasmall iron oxide nanoparticles: Magnetic and NMR relaxometric properties. *Current Applied Physics*, 18: 141–149.

Barahuie F, Dorniani D, Saifullah B, Gothai S, Hussein MZ, Pandurangan AK, Arulselvan P, Norhaizan ME (2016) Sustained release of anticancer agent phytic acid from its chitosan-coated magnetic nanoparticles for drug-delivery system. *International Journal of Nanomedicine*, 12:2361–2372

Bhuiyan SH, Miah MY, Paul SC, Aka TD, Saha O, Rahaman M, Sharif JI, Habida O (2020) Green synthesis of iron oxide nanoparticle using *Carica papaya* leaf extract:

application for photocatalytic degradation of remazol yellow RR dye and antibacterial activity. *Heliyon*, 6: 1-10

Billotey C, Wilhelm C, Devaud M, Bacri JC, Bittoun J, Gazeau F (2003) Cell internalization of anionic maghemite nanoparticles: Quantitative effect on magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance in Medical Science*, 49:646–654.

Carrey J, Mehdaoui B, Respaud M (2011) Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: application to magnetic hyperthermia optimization. *Journal of Applied Physics*, 109:083921

Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune JJ, Jallet P (1996) Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *Journal of Microencapsulation*, 13:245–255.

Cosgrove T (2010) *Colloid science principles, methods and applications*. New York: Wiley.

Dai L, Liu R, Hu LQ, Zou ZF, Si CL (2017) Lignin nanoparticle as a novel green carrier for the efficient delivery of resveratrol. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(9):8241–8249

Das B, Kusz J, Reddy VR, Zubko M, Bhattacharjee (2017) A. Solventless synthesis, morphology, structure and magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *Solid State Sciences*, 74, 62–69.

Davar F, Hadaazadeh H, Alaedini TS (2016) Single-phase hematite nanoparticles: Nonalkoxide sol–gel based preparation, modification and characterization. *Ceramics International*, 42: 19336–19342

El-Said WA, Fouad DM, Ali MH, El-Gahami MA (2017) Green synthesis of magnetic mesoporous silica nanocomposite and its adsorptive performance against organochlorine pesticides. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15(8): 1731–1744.

Gallocchio F, Belluco C, Ricci A (2015) Nanotechnology and food: brief overview of the current scenario. *Procedia Food Science*, 5:85–88

Ghorbani M, Bigdeli B, Jalili-Baleh L, Baharifar H, Akrami M, Dehghani S, Goliaei B., Amani A, Lotfabadi A, Rashedi H, Haririan I, Alam NR, Hamedani MP, Khoobi M (2018) Curcumin-lipoic acid conjugate as a promising anticancer agent on the surface of gold@iron oxide nanocomposites: A pH-sensitive targeted drug delivery system for brain cancer theranostics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 114, 175-188.

Ghosh S, More P, Derle A, Kitture R, Kale T, Gorain M, Avasthi A, Markad P, Kundu GC, Kale S, Dhavale DD, Bellare J, Chopade BA (2015) Diosgenin functionalized iron oxide nanoparticles as novel nanomaterial against breast cancer. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15:9464–9472

Gopal SV, Mini R, Jothy VB, Joe IH (2015) Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticles using DMSO as a Stabilizer. *Materials Today: Proceedings*, 22:1051–1055

Gupta AK, Wells S (2004) Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 3(1):66–73

Hassanzadeh H, Alizadeh M, Rezazad BM (2018) Formulation of garlic oil-in-water nanoemulsion: antimicrobial and physicochemical aspects. *IET Nanobiotechnology*, 12, 647–652.

Hu Y, Mignani S, Majoral JP, Shen M, Shi X (2018) Construction of iron oxide nanoparticle-based hybrid platforms for tumor imaging and therapy. *Chemical Society Reviews*, 47:1874–1900

Huang SW, Umar A, Dar GN, Kim S (2014) Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticles for Phenyl Hydrazine Sensor Applications. *Sensor Letters*, 12, 1-5.

Hurley KR, Ring HL; Kang H, Klein ND, Haynes CL (2015) Characterization of Magnetic Nanoparticles in Biological Matrices. *Analytical Chemistry*, 87, 11611–11619

Iannone A, Magin RL, Walczak T, Federico M, Swartz HM, Tomasi A, Vannini V (1991) Blood Clearance of Dextran Magnetite Particles Determined by a noninvasive in vivo ESR method. *Magnetic Resonance in Medicine*, 22(2): 435–442.

Jindal A (2017) The effect of particle shape on cellular interaction and drug delivery applications of micro- and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 532(1):450–464

Khoshnevisan K, Barkini M, Zare D, Davoodi D, Tabatabaei M (2012) Preparation and Characterization of CTAB-Coated Fe₃O₄ Nanoparticles. *Synthesis and Reactivity in Inorganic Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*, 42: 644-648.

Li GS, Smith RL, Inomata H, Arai K (2002) Preparation and magnetization of hematite nanocrystals with amorphous iron oxide layers by hydrothermal conditions. *Materials Research Bulletin*, 37: 949–955.

Lim J, Yeap SP, Che HX, Low SC (2013) Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Research Letters*, 8: 381.

Lu A, Salabas EL, Schuth F (2007) Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46:1222-1244

Lungu II, Grumezescu AM, Volceanov A, Andronescu E (2019) Nanobiomaterials used in cancer therapy: an up-to-date overview. *Molecules*, 24(19):3547

Malekzadeh AM, Ramazani A, Rezaei SJT, Niknejad H (2017) Design and construction of multifunctional hyperbranched polymers coated magnetite nanoparticles for both targeting magnetic resonance imaging and cancer therapy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 490:64–73.

Mashhadizadeh, M.H., Amoli-Diva, M., Pourghazi, K. (2013). Magnetic nanoparticles solid phase extraction for determination of ochratoxin A in cereals using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1320:17-26.

Mishra D, Arora R, Lahiri S, Amritphale SS, Chandra N (2014) Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticles by Solvothermal Method. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*, 5: 628–631.

Niu X, Che J, Gao J (2019) Nanocarriers as a powerful vehicle to overcome blood-brain barrier in treating neurodegenerative diseases: Focus on recent advances. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(5):480–496.

Nosrati H, Sefidi N, Sharafi A, Danafar H, Kheiri Manjili H (2017) Bovine serum albumin (BSA) coated iron oxide magnetic nanoparticles as biocompatible carriers for curcumin-anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*, 76:501–509.

Phuoc NT, Whittaker MR, Mak C, Davis TP (2018) The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12(1):129–142.

Ramesh AV, Rama Devi D, Mohan Botsa S, Basavaiah, K (2018) Facile green synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles using aqueous leaf extract of *Zanthoxylum armatum* DC. for efficient adsorption of methylene blue. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 6(2): 145–155.

Ramirez-Nuñez AL, Jimenez-Garcia LF, Goya GF, Sanz B, Santoyo-Salazar J (2017) In vitro magnetic hyperthermia using polyphenol-coated Fe₃O₄@ γ-Fe₂O₃ nanoparticles from *Cinnamomum verum* and *Vanilla planifolia*: the concert of green synthesis and therapeutic possibilities. *Nanotechnology*, 29(7):074001

Rath K, Sen S (2019) Garlic extract based preparation of size controlled superparamagnetic hematite nanoparticles and their toxicity applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 18: 108-118.

Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P (2012) Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chemical Reviews*, 5818–5878.

Roca AG, Gutiérrez L, Gavilán H, Brollo MEF, Veintemillas-Verdaguer S, del Puerto Morales M (2018) Design Strategies for Shape-Controlled Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Advanced Drug Delivery*, 138: 68-104

Sallem F, Haji R, Fasser DV, Nury T, Maurizi L, Boundon J, Lizard G, Millot N (2019) Elaboration of trans-resveratrol derivative loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for glioma treatment. *Nanomaterials*, 9(2):287

Shahwan T, Abu Sirriah S, Nairat M, Boyac E, Eroğlu AE, Scott TB, Hallam KR (2011) Green synthesis of iron nanoparticles and their application as a Fenton-like catalyst for the degradation of aqueous cationic and anionic dyes. *Chemical Engineering Journal*, 172:258–266

Shen M, Cai H, Wang X, Cao X, Li K, Wang S, Guo R, Zheng L, Zhang G, Shi X (2012) Facile one-pot preparation, surface functionalization, and toxicity assay of APTS-coated iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology*, 23 105601

Siddiqi KS, Rahman A, Husen A (2016) Biogenic Fabrication of Iron/Iron Oxide Nanoparticles and Their Application. *Nanoscale Research Letters*, 11(1):498

Tarantash M, Nosrati H, Kheiri Manjili H, Baradar Khoshfetrat A (2018) Preparation, characterization and in vitro anticancer activity of paclitaxel conjugated magnetic nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44:1895–1903.

Villa S, Riani P, Locardi F, Canepa F (2016) Functionalization of Fe₃O₄ NPs by Silanization: Use of Amine (APTES) and Thiol (MPTMS) Silanes and Their Physical Characterization. *Materials*, 9: 826.

Wang W, Zheng L, Lu F, Hong R, Chen MZQ, Zhuang L (2017) Facile synthesis and characterization of magnetochromatic Fe₃O₄ nanoparticles. *AIP Advances*, 7: 056317.

Wei QY, He KM, Chen JL, Xu YM, Lau A (2019) Phytofabrication of nanoparticles as novel drugs for anticancer applications. *Molecules*, 24(23):1–44.

Wu M, Huang S (2017) Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis, drug delivery and treatment (review). *Molecular and Clinical Oncology*, 7:738–746.

Xie W, Gou Z, Gao F, Gao Q, Wang D, Liaw BS, Cai Q, Sun X, Wang X, Zhao L (2018) Shape-, size- and structure-controlled synthesis and biocompatibility of iron oxide nanoparticles for magnetic theranostics. *Theranostics*, 8(12):3284–3307

Yang L, Tian J, Meng J, Zhao R, Li C, Ma J, Jin T (2018). Modification and Characterization of Fe₃O₄ Nanoparticles for Use in Adsorption of Alkaloids. *Molecules*, 23: 562.

Yarjanli Z, Ghaedi K, Esmaeili A, Rahgozar S, Zarrabi A (2017) Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation. *BMC Neurosciences*, 18:51.

Yew YP, Shameli K, Miyake M, Khairudin NB, Mohamad SE, Naiki T, Lee KK (2018) Green biosynthesis of superparamagnetic magnetite Fe₃O₄ nanoparticles and biomedical applications in targeted anticancer drug delivery system: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 1-18

Yin Y, Cui L, Yan F, Zhang Z, Li W, Wang L (2017) Epigallocatechin gallate based magnetic gold nanoshells nanoplatform for cancer theranostic applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(3):454–463

Zhang L, Dou YH, Gu HC (2006) Sterically induced shape control of magnetite nanoparticles. *Journal of Crystal Growth*, 296:221–226

Zhang L, Zhang Y (2009) Fabrication and magnetic properties of Fe₃O₄ nanowire arrays in different diameters. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321: L15–L20.

Zhou Q, Wei Y (2017) For better or worse, iron overload by superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a MRI contrast agent for chronic liver diseases. *Chemical Research in Toxicology*, 30:73–80.

Zhou X, Shi Y, Ren L, Baob S, Han Y, Wu S, Zhang H, Zhong L, Zhang Q (2012) Controllable synthesis, magnetic and biocompatible properties of Fe₃O₄ and α-Fe₂O₃ nanocrystals. *Journal of Solid State Chemistry*, 196:138–144

Zhou Y, Quan G, Wu Q, Zhang X, Niu B, Wu B, Huang Y, Pan X, Wu C (2018) Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 8, 165-177.

Zhu N, Li H, Yu P, Niu J, Farroq MU, Udego IO, Li H, Niu X (2018) Surface Modification of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Nanomaterials*, 8, 1-27.