

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

Programa de Maestría en Ciencias de la Salud

“Síntesis y caracterización de nanopartículas de hierro para la purificación de la proteína MAP3773C de Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis y Fotocatálisis de Nitrobenceno”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD
P R E S E N T A

QFB. VICTOR ALFREDO REYES VILLEGAS

Directora de Tesis:

Dra. Bertha Landeros Sánchez

Co-Director de Tesis:

Dra. Esteban Hernández Guevara

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 292

Tijuana, B. C., a 17 de Diciembre del 2019

C. Víctor Alfredo Reyes Villegas
Pasante de: Maestro en Ciencias de la Salud
Presente

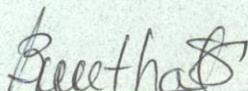
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por los C.C. Dra. Bertha Landeros Sánchez y Dr. Esteban Hernández Guevara

Quienes serán los responsables de la calidad de trabajo que usted presente, referido al tema “Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Hierro para la Purificación de la Proteína MAP3773c de *Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis* y Fotocatálisis de Nitrobenceno”

El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

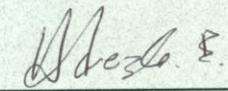
- I.- INTRODUCCIÓN GENERAL
- II.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE HIERRO
- III.- PURIFICACION DE MAP3773C
- IV.- FOTOCATÁLISIS DE NITROBENCENO

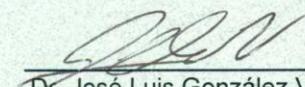

Dra. Bertha Landeros Sánchez
Director de Tesis

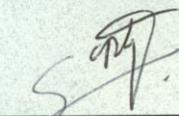
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA


Dr. Esteban Hernández Guevara
Co-Director de Tesis


Dr. José Luis González Vázquez
Director


Dra. Rocio Alejandra Chávez Santoscoy
Sub-Directora

INDICE DE CONTENIDO

Resumen:	4
Abstract:.....	5
Capitulo 1 : Introducción General.....	6
Introducción:.....	6
Mycobacterias y Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis.....	6
Proteína MAP3773C.....	7
Proteínas de Tipo Fur.....	7
Purificación de Proteínas	7
Purificación de Proteínas Tipo Fur	8
Efecto Corona.....	9
Nanopartículas	10
Nanopartículas Magnéticas	10
Fotocatálisis para remediación de agua	11
Fotocatálisis para la Degradación de Nitrobenceno	12
Nano fotocatalizadores magnéticos	13
Capitulo 2 : Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Hierro	15
Introducción.....	15
Justificación.....	17
Síntesis de nanopartículas	17
Caracterización de Nanopartículas	18
Objetivo General:.....	19
Antecedentes	19
Síntesis de nanopartículas	19
Caracterización de las Nanopartículas	20
Hipótesis	36
Experimental	36
Preparación de Nanopartículas de Fe ₃ O ₄	36
Caracterización de Nanopartículas de Fe ₃ O ₄	36
Resultados y Discusiones	39
Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Fe ₃ O ₄	39
Conclusiones:	51
Capitulo 3 : Purificación de MAP3773C	51

Introducción.....	51
Justificación.....	54
Purificación de MAP3773c con nanopartículas de Fe ₃ O ₄	54
Objetivo General:.....	56
Antecedentes	56
Purificación de Proteínas con Nanopartículas Magnéticas de Hierro	56
Hipótesis	57
Experimental	57
Caracterización de Complejo de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ -Histidina	57
Obtención de MAP3773C purificada.....	58
Resultados y Discusiones	59
Interacción de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ con histidina y MAP3773c.....	59
Conclusiones	72
Capitulo 4 : Fotocatálisis de Nitrobenceno.....	73
Introducción.....	73
Justificación.....	74
Fotocatálisis de nitrobenceno con Fe ₃ O ₄	74
Objetivo General:.....	75
Antecedentes	76
Fotocatálisis con nanopartículas magnéticas de Hierro.	76
Hipótesis	76
Experimental	76
Experimentos de fotocatálisis.....	76
Resultados y Discusiones	78
Fotodegradación de Nitrobenceno por nanopartículas de Fe ₃ O ₄	78
Conclusiones	85
References	85

Síntesis y caracterización de nanopartículas de hierro para la purificación de la proteína MAP3773C de Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis y Fotocatálisis de Nitrobenceno

Resumen:

Las nanopartículas magnéticas son de gran interés debido a las aplicaciones en distintos campos como biología y ciencia de materiales. La nanomagnetita es uno de los materiales más utilizados gracias a su magnetismo y comportamiento superparamagnético en la escala nanométrica, lo cual las hace lo suficientemente sensibles a campos magnéticos externos para controlar su movimiento. El método de preparación empleado fue el de co-precipitación en reversa asistido por ultrasonido el cual consiste en gotear soluciones de salinas de hierro (II)/hierro (III) a una solución de hidróxido de amonio la cual está a 60°C y bajo irradiación de ultrasonido. Los métodos de caracterización utilizados fueron: espectroscopias de UV-Vis, FT-IR y Raman, microscopía electrónica de barrido (SEM), dispersión dinámica de luz (DLS), difracción de Rayos X (XRD), potencial Zeta, magnetometría de muestra vibrante (VSM) y análisis termogravimétrico magnético (MTGA). Esta caracterización en conjunto nos da la información de: el compuesto sintetizado, el tamaño y forma de la partícula y/o cristal, carga superficial y sus características magnéticas. Por otra parte, se examinó la aplicación de estas partículas para la purificación de una proteína recombinante con cola de 6xHis-tag y la actividad fotocatalítica para nitrobenceno. Se encontró que las nanopartículas sintetizadas son Fe_3O_4 , tienen un tamaño < 20 nm, un comportamiento superparamagnético y como semiconductor. Dadas las características magnéticas y de semiconductor el material tiene potencial de ser utilizado como agente purificador (debido a la decantación magnética) y como fotocatalizador (por su propiedad de semiconductor). Las nanopartículas demostraron una interacción con histidina a pH 7 y 11 a través del anillo aromático y posiblemente el grupo carbonilo analizado por espectroscopia de UV-vis y FT-IR. Simultáneamente, mostraron una actividad fotocatalítica contra el nitrobenceno con

irradiación UV con el potencial de mineralizar este contaminante por medio de oxidación comprobado por espectroscopia de UV-vis y cromatografía de gases acoplado a masas (GC/MS).

Abstract:

Magnetic nanoparticles have been of great interest due to its application in different fields like biology and material science. Nanomagnetite es one of the most used materials thanks to its magnetism and superparamagnetic behavior in the nano scale, which makes it sufficiently sensible to external magnetic fields being capable of controlling its movement. The synthesis was achieved by an ultrasound assisted reverse co-precipitation (US-RP) method, which consists in adding dropwise a salt solution of iron (II)/iron (III) into a solution of ammonium hydroxide at 60°C under an ultrasonic bath. The characterization methods used were: UV-Vis, FT-IR and Raman spectroscopies, scanning electron microscopy (SEM), Dynamic light scattering (DLS), X Ray diffraction (XRD), Zeta potential, vibrating sample magnetometry (VSM) and magnetic thermogravimetric analysis (MTGA). This characterization in combined gave us the next information: compound synthesized, size and shape of particles/crystals, surface charge and magnetic properties. On the other hand, we examined the application for these particles to purify a recombinant protein with a 6xHis-tag and the photocatalytic activity for nitrobenzene. We found that the nanoparticles synthesized were Fe_3O_4 and have a size < 20 nm and a superparamagnetic behavior, and semiconductor characteristics as well. Due to the magnetic and semiconductor characteristics the material has potential to be used as a purification agent (thanks to magnetic decantation) and like a photocatalyst (for its semiconductor property). The nanoparticles demonstrated an interact with histidine at pH values of 7 and 11 through the aromatic ring and possibly the carboxyl group observed by UV-vis and FT-IR spectroscopy. Simultaneously, the nanoparticles showed a photocatalytic activity against nitrobenzene under UV irradiation with the

potential to mineralize this contaminant through oxidation confirmed by UV-vis spectroscopy and gas chromatography coupled mass spectrum (GC/MS).

Capitulo 1 : Introducción General

Introducción:

Mycobacterias y Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis

Diversas mycobacterias son responsables de diferentes enfermedades tales como tuberculosis en humanos (*Mycobacterium tuberculosis*) y en ganado (*Mycobacterium bovis*), y lepra en humanos (*Mycobacterium leprae*).

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (también conocida como *Mycobacterium paratuberculosis* o MAP) causa la enfermedad de Johne's (paratuberculosis) en animales rumiantes. La infección de animales rumiantes con MAP les genera paratuberculosis causando caquexia. La pérdida de peso rápida que se observa en la paratuberculosis es debido a un engrosamiento del tracto intestinal causado por una respuesta inmune del huésped, al igual que la acción sistémica de citocinas liberadas por los linfocitos y macrófagos [1].

De igual forma MAP se ha asociado con la enfermedad de Crohn (CD). En adición al potencial de MAP viable de ser infecciosa en humanos susceptibles, la exposición de MAP puede provocar respuestas inflamatorias perjudiciales en intestinos de infantes [2]. La CD es una enfermedad inflamatoria crónica del intestino (IBD) de etiología desconocida. Los pacientes por lo regular son jóvenes y debido a la naturaleza progresiva de la enfermedad, la CD se asocia con discapacidad y morbilidad significativa [3]. Así mismo, una disbiosis en la comunidad microbial gastrointestinal de intestinos de infantes es una preocupación adicional, ya que ha sido observada en niños con la CD. La disbiosis en el intestino infantil puede ser a causa de una exposición temprana a MAP, que pudiera ser facilitada por el sistema inmune subdesarrollado de las mucosas de los infantes [2].

Proteína MAP3773C

MAP3773c es una proteína constitutiva, que regula la reabsorción de hierro y esta misma se une a la caja de hierro de su propio promotor del gen que la codifica, por lo cual tiene actividad autorreguladora. [4] [5]. Esta proteína es parte de la familia de proteínas FUR (regulación de la reabsorción de hierro) y está involucrada en la reabsorción de Fe^{2+} y Zn^{2+} [6], es de 20.6 kDa y tiene afinidad por el hierro (datos no publicados). Uno de los mecanismos de defensa de las células huésped es la inanición de metales formando parte de la inmunidad nutricional. MAP posee ocho secuencias de polimorfismos largas (LSP) específicos del linaje conservados, que distinguen a MAP de sus ancestros. Una de esas ocho secuencias es la LSP 15 la cual contiene el gen para la proteína MAP3773c. Dadas las características inmunogénicas de la proteína es un blanco potencial para el desarrollo de una vacuna contra la enfermedad de John [6] [7]. Una característica muy importante de MAP es que la proteína MAP3773c disminuye su expresión en tejidos del huésped, pero aumenta dicha expresión cuando se localiza en macrófagos [8].

Proteínas de Tipo Fur

Se han descrito diferentes homólogos del gen FUR en muchas bacterias Gram negativas, incluyendo varios patógenos humanos como: *Yersinia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Helicobacter pylori*, *Bordetella*, *Campylobacter*, *Acinetobacter baumannii*, *Legionella*, *Neisseria*, y *Haemophilus*. También se han encontrado proteínas semejantes a las tipo FUR en bacterias Gram positivas p. ej., *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus*, y hasta en *cyanobacteria* [9].

Las estructuras de proteínas FUR muestran la presencia de sitios para zinc estructural, entre dos o tres sitios de unión a metales funcionales, región de dimerización y otra de unión a ADN [10]. La actividad de unión a ADN es activada a través de la unión de iones de metales divalentes en este caso hierro usándolo como cofactor [11] [12] [13].

Purificación de Proteínas

El desarrollo de técnicas y métodos de separación, purificación de macromoléculas biológicas, tales como las proteínas, ha sido un importante prerrequisito para diversos adelantos hechos en

la biociencia y biotecnología. Las técnicas más utilizadas para la purificación de proteínas son precipitación, cromatografías y electroforesis.

La precipitación de proteínas se logra al agregar sales, solventes orgánicos, polímeros orgánicos, variación de pH o temperatura. Los métodos de electroforesis más utilizadas son: exclusión de tamaño (SEC), intercambio iónico (IEC), cromatofocusion (CF), interacciones hidrofóbicas (HIC), metal inmovilizada (IMAC), unión covalente (CC) y afinidad (AC) [14].

Purificación de Proteínas Tipo Fur

Diferentes autores han purificado proteínas Fur recombinantes de *E. coli* por medio de IMAC obteniendo dímeros y monómeros [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21]. Pérard et al.(2016) purifico cinco proteínas FUR recombinantes, EcFur y YpFur proveniente de *Escherichia coli* y *Yersinia pestis* respectivamente como monómeros y dímeros usando IMAC, al igual que los tetrámeros de *Pseudomonas aeruginosa* (PaFur), *Francisella tularensis* (FtFur), *Legionella pneumophila* (LpFur) utilizando cromatografías de intercambio iónico y exclusión molecular [22]. BSAT et al. (1999) purifico FUR recombinante de *Bacillus subtilis* por medio de cromatografía de afinidad (heparin–Sephacrose CL-6B), seguido de precipitaciones y cromatografías de exclusión molecular [23]. Shin et al.(2007) purifico una proteína ZUR usando una columna de intercambio iónico con níquel unido (Chelex -100). [24] Mills et al. (2005) purifico FUR de *E. coli* utilizando una cromatografía IMAC y de exclusión molecular [25]. Hernández et al. (2002) purifico FUR de *Anabaena PCC 7119* utilizando cromatografía IMAC y de afinidad [26].

Los materiales utilizados anteriormente tienen un costo muy elevado (Tabla 1), ya que no se usa únicamente un solo tipo de cromatografía sino dos o tres. Esto se debe a que al utilizar únicamente una cromatografía, se llega a una purificación fraccionada o copurificación (purificación con contaminantes). Aunque los contaminantes se puedan llegar a encontrar en una concentración mínima esto puede afectar en el momento de realizar estudios de cristales o

funcionalidad, lo que obliga a utilizar más de una cromatografía con el fin de aumentar la concentración de proteína deseada y/o eliminar contaminantes afines a metales [27] [28].

Tabla 1. Comparación de Purificación de proteínas FUR

Purificación de FUR				
Proteína Purificada	Cromatografía	Tipo de Cromatografía	Proveedor	Referencia
FUR (Bacillus subtilis)	Heparin Sepharose CL-6B	Afinidad	General Electric	BSAT et al. (1999)
EcFUR (E. coli)				
YpFUR (Yersinia pestis)	IMAC Sepharose 6 Fast Flow	IMAC	General Electric	Pérard et al.(2016)
PaFUR(Pseudomonas aeruginosa)	Columna Superdex-75	HPLC, Exclusión molecular	Sigma-Aldrich	
FtFUR (Francisella tularensis)				Pérard et al.(2016)
LpFUR (Legionella pneumophila)	DEAE Sepharose Fast Flow	Intercambio Iónico	Sigma-Aldrich	
ZUR (Streptomyces coelicolor)	Chelex -100	Intercambio Iónico	BIO-Rad	Shin et al.(2007)
	IDA-Agarosa	IMAC	G-Biosciences	
FUR (E. coli)	Sephadex G-25 Fine	Exclusión Molecular	General Electric	Mills et al. (2005)
	Chelating Sepharose Fast Flow	IMAC	General Electric	
FUR (Anabaena PCC 7119)	Heparin-sepharose 6 Fast Flow	Afinidad	General Electric	Hernández et al. (2002)

Efecto Corona

Las nanopartículas pueden interactuar con proteínas, ya que al ingresar una nanopartícula a un medio fisiológico esta se recubre con proteínas afines a la partícula generando un complejo llamado proteína corona. Las proteínas se unen a la nanopartícula por medio de diferentes fuerzas (van der Waals, puentes de hidrógeno, electrostáticas, hidrofóbicas, etc.). Esta unión depende de las características de la nanopartícula y la afinidad de la proteína con la partícula [29]. La adsorción de proteínas con nanopartículas se puede lograr encontrando las condiciones óptimas de pH y fuerzas electrostáticas [30].

La adsorción de proteínas en la superficie de nanopartículas está gobernada por la afinidad de unión de proteína-nanopartícula al igual que la interacción proteína-proteína. Proteínas que se adsorben con alta afinidad forman lo que se le conoce como corona dura (unión proteína-nanopartícula), y proteínas que se adsorben con baja afinidad forman la corona blanda (unión proteína-proteína) [31].

Nanopartículas

No existe un acuerdo en cuanto a que califica como una nanopartícula. Se ha argumentado que únicamente partículas entre 1 y 10 nm se pueden considerar como una nanopartícula o todo aquello que se encuentre entre 1 y 1000 nm es una nanopartícula [32]. La definición de nanopartículas difiere dependiendo del material, campo y aplicaciones de interés. En un sentido más estrecho se considera nanopartícula a aquellas partículas en donde las mismas propiedades físicas de materiales sólidos cambiarían drásticamente [33]. Las nanopartículas se pueden clasificar como Zero-dimensionales, una-dimensión tales como nanobarras o nanotubos, y dos-dimensionales que son, en la mayoría de los casos, platos o apilaciones de platos [34].

Nanopartículas Magnéticas

El tamaño y forma de partículas magnéticas determinan sus características físicas y químicas, lo cual sirve como la fundación para el desarrollo de campos nuevos. [35]. Nanomateriales con propiedades magnéticas se han usado en campos como la electrónica, ciencia de materiales y ciencias biomédicas. Síntesis, pasivación, y funcionalización de varios tipos de nanopartículas magnéticas han sido usadas para diversas aplicaciones tales como: vehículo de fármacos, imagenología y separaciones y purificaciones magnéticas [36]. En este campo la separación magnética puede estar basada en (I) la naturaleza magnética de lo que se desea separar (p. ej. glóbulos rojos, bacterias magneto tácticas) o (II) convirtiendo un objeto magnético al adjuntarle una unidad magnética-sensible [37]. La separación magnética ofrece selectividad, sensibilidad y

captura controlada del blanco, utilizando un campo magnético externo para capturar moléculas con nanopartículas magnéticas por medio de interacciones de afinidad. Para poder diseñar una plataforma eficiente para la separación magnética se necesita un adsorbente superparamagnético con propiedades de estabilidad, biocompatible y ligandos de afinidad para capturar la molécula de interés con alta especificidad y selectividad [36]. Las nanopartículas de Fe_3O_4 han sido investigadas por ser altamente biocompatibles y tener propiedades magnéticas. Por otro lado, el dopaje con elementos metálicos se ha usado para modificar y mejorar la magnetización de nanopartículas y por lo regular utilizan los elementos: Co, Ba, Cu, Mn, Ni, y Zn [38].

El desarrollo de métodos simples y eficientes para la purificación de proteínas de interés de extractos celulares es muy importante en la proteómica [39].

Fotocatálisis para remediación de agua

La contaminación ambiental atrae una atención extensiva alrededor del mundo ya que implica problemas serios para la salud humana y el desarrollo de una sociedad. Diversos tipos de sustancias químicas, incluyendo metales pesados, contaminantes orgánicos, microbios, etc., derivados de la industria, agricultura, y desechos domésticos son liberados hacia el medio ambiente. Enfoques a la remediación de agua pueden ser divididos en varias categorías básicas: técnicas físicas como filtración, adsorción, sedimentación, flotación; métodos químicos incluyendo floculación, reducción y oxidación, intercambio iónico, electrocoagulación; medios biológicos y tecnologías combinadas. Los métodos tradicionales que tratan muestras de agua residual dependiendo de sus propiedades físicas o químicas se enfrentan a los problemas de alto costo económico, eficiencia baja relativa, inconveniencia en separación, y consecutiva contaminación secundaria. Procesos avanzados de oxidación (AOPs) juegan un papel importante en el manejo de contaminantes refractarios en agua, la catálisis fotoquímica y la degradación fenton son los dos enfoques más aplicados en este campo recientemente. La degradación

catalítica es otra característica superior establecida por los nanomateriales como un método potencial e indispensable para el tratamiento de agua [40]. La fotocatalisis es un proceso alternativo que puede remover contaminantes a temperatura y presión ambiental por oxidación [41]. La combinación de un contaminante con un fotocatalizador semiconductor seguido por iluminación con fotones lo suficientemente energéticos para producir un par hueco/electrón, también es una técnica bien conocida para la purificación de aire y agua [42]. La excitación de un semiconductor con energía de luz mayor a la de su band gap genera pares de hueco electrón que pueden ser usados en varios procesos redox en el interfaz semiconductor/solución [43]. Usualmente los semiconductores son preferidos para el uso de fotocatalizadores por su estrecho band gap, particularmente entre 1.4-3.8 eV [41]. La nanotecnología ha atraído mucha atención en los últimos años, debido a que el “efecto de tamaño cuantizado” es una de las propiedades únicas a los “nano tamaños” ya que no aparecen ni en su forma en bulto o a niveles atómicos y moleculares. En este fenómeno cuando el tamaño de un material se vuelve más pequeño, el nivel de las bandas se torna discreto y el band gap se vuelve más grande. En otras palabras, ya que es posible controlar el band gap de un material al controlar su tamaño, es posible esperar aplicaciones de un material con características que no se presentan convencionalmente [33].

Fotocatálisis para la Degradación de Nitrobenceno

El nitrobenceno (NB) es un contaminante carcinogénico [44], después de su exposición por inhalación, el NB causa tumores en el hígado, riñones, glándula tiroides de ratas, en los pulmones y glándulas mamarias de ratones. En humanos, los síntomas de intoxicación de NB son ardor en la boca y garganta, náuseas, vomito, mareo, desordenes de coordinación, cianosis, un olor de almendras amargas en el aire exhalado, inquietud, taquicardia, disminución de presión arterial, colapso, signos de parálisis, inconciencia y coma [45]. NB es altamente utilizado en la industria en explosivos, pesticidas, producción de pulpa de papel y en procesos industriales de colorantes [46],

perfumes, farmacéuticos, colorantes, hule sintético y plásticos [47]. NB es producido anualmente en el orden de 225,000 toneladas métricas, y se ha estimado que tanto como 9,000 toneladas métricas de nitrobenzeno son descargadas anualmente en aguas naturales [48].

Convencionalmente, NB en medio acuoso es procesado usando técnicas físicas, químicas y biológicas. Los tratamientos generales se basan en adsorción y biodegradación. Estas técnicas pueden ser efectivas, pero ocurre una contaminación secundaria, resultando en procesos de altos costos [49]. Sin embargo, NB es refractario a los métodos convencionales de oxidación química por su propiedad electro atractor del grupo nitro es notablemente fuerte. Por otro lado, NB también es resistente a los tratamientos convencionales biológicos debido a la toxicidad del compuesto y efectos mutagénicos en sistemas biológicos [46]. El carácter deficiente de electrones del grupo nitro previene la mineralización de NB por microorganismos [44]. Los AOPs, generalmente basado en la generación de especies altamente reactivas tales como radicales hidroxilos (HO^{\bullet}), son de gran interés para la degradación de contaminantes que son difíciles de eliminar con tratamientos convencionales [50]. Entre los AOPs, la fotocátalisis heterogénea parece ser un método atractivo ya que ha sido usado de manera satisfactoria para la degradación de varias familias de contaminantes orgánicos. La razón del aumento en el interés por el método de fotocátalisis es que el proceso puede usar oxígeno atmosférico como oxidante, y se puede llevar a cabo bajo condiciones ambientales y dirigirse a una mineralización orgánica a CO_2 , agua y aceites minerales [51]. La fotocátalisis por semiconductores a probado ser una tecnología prometedora para la remoción de varios contaminantes orgánicos, incluyendo compuestos nitro aromáticos, de agua subterránea y flujos de residuos [43].

Nano fotocatalizadores magnéticos

Un problema crítico en el proceso de remediación de agua es que el material usado en suspensión es necesario removerlo, y este proceso es costoso y consume tiempo. La adsorción magnética

para remover metales pesados, colorantes, pesticidas, etc., ha tenido un papel en el campo de remediación de agua a lo largo de los últimos años. Entre varios tipos de nanomateriales, nanomateriales magnéticos incluyendo Fe, Co, Ni, y sus aleaciones o óxidos han obtenido una atención especial basada en sus ventajas prominentes tales como alta eficiencia de separación, condiciones de operación amables, gran superficie de área, cinética rápida, y propiedad de regeneración [40]. Una revisión reciente ha resumido el progreso recientemente logrado en la construcción de MNP y su directa aplicación en catálisis con ejemplos de nanopartículas incluyendo óxido de hierro (Fe_2O_3 and Fe_3O_4), ferritas metálicas (MFe_2O_4 , M = Cu, Co and Ni), Fe^0 , Co^0 , Ni^0 , y nanopartículas multicomponentes [52].

Capítulo 2 : Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Hierro

Introducción

Las ferritas son materiales cerámicos teniendo óxidos de hierro como su componente principal.

El arreglo de aniones de oxígeno alrededor de cationes de metal puede variar, así dando origen a diferentes estructuras cristalinas. En consecuencia, las ferritas han sido clasificadas como, espinelas, granates y plumbitas magnéticas [53].

Las ferritas espinelas corresponden a la colección de materiales magnéticos que poseen un campo amplio de aplicaciones tecnológicas y biomédicas, debido a sus propiedades eléctricas y magnéticas únicas y versátiles, mostrando ambas magnetizaciones altas y resistividad. Las ferritas espinelas son descritas usando la fórmula general $(M_{1-\alpha}Fe_{\alpha})[M_{\alpha}Fe_{2-\alpha}]O_4$, donde M corresponde a un catión divalente (M = Fe, Co, Ni, Mn, Zn), y () y [] representa los sitios para cationes tetraédricos y octaédricos, respectivamente, en una subred con anión de oxígeno cubica centrada en las caras [54].

En años recientes las ferritas han atraído considerable atención como nanopartículas magnéticas con diversas aplicaciones [53]. La síntesis de materiales magnéticos nanoestructurados han sido un área particularmente importante de investigación y ha atraído un interés creciente debido a las aplicaciones potenciales que tales materiales tienen en ferrofluidos, materiales magnéticos avanzados, catálisis, pigmentos coloreados, medios de grabación magnéticos de alta densidad, y diagnósticos médicos [55].

Se ha establecido que el grado de cristalinidad, tamaño de partícula y morfología de partícula de las nanopartículas de óxido son fuertemente dependientes del método usado para su preparación [56]. Un amplio rango de nanopartículas y óxidos de nano metales han sido sintetizados y estudiado por varios métodos físicos y químicos en tiempos recientes [57].

Hay tres enfoques principales los cuales son aplicados para crear nuevos nanomateriales: 1) arriba hacia abajo, 2) abajo hacia arriba, y 3) enfoques virtuales. Los enfoques de arriba hacia abajo han sido los enfoques tradicionales para la miniaturización vía herramientas litográficas. Los enfoques de abajo hacia arriba es la auto ensamblado de precursores moleculares como bloques de construcción en soluciones químicas. Los enfoques de técnicas virtuales es la usada por los teóricos computacionales los que crean nuevas materiales en las simulaciones por computadoras. Las técnicas experimentales para el crecimiento de películas ultrafinas y para la producción selectiva de y análisis de nanoclusters atómicos han mejorado dramáticamente en las últimas décadas [58].

Las ferritas monodispersas han sido fabricadas por varios métodos sintéticos químicos, incluyendo, coprecipitación, método de micelas inversas, síntesis de plasma de microondas, técnicas de sol/gel, secado en frío, irradiación de ultrasonido, métodos hidrotermales, técnicas de pirolisis por láser y descomposición térmica de organometálicos y compuestos de coordinación [55].

Mientras que la técnica de coprecipitación es una de las rutas mas rentables para la síntesis de nanopartículas de hierro superparamagnéticas con alto rendimiento con propiedades magnéticas apropiadas, las nanopartículas generadas por medio de este método usualmente exhiben un bajo grado de cristalinidad y una polidispersidad grande relativa. Para, al menos en cierta parte, sobrellevar estos inconvenientes, varias versiones modificadas de la técnica de coprecipitación han sido desarrolladas. Estas, por mencionar algunas, incluyen la preparación de nanopartículas de Fe_3O_4 bajo campos magnéticos estáticos, coprecipitación de soluciones acuosas de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3$ al adicionar NaOH , usando alcanolaminas como base, coprecipitación in situ en una matriz de polímero funcionalizada con carboxilos, y

finalmente la asistencia de ultrasonido [59]. En adición, se ha demostrado que la técnica sonoquímica es un método efectivo para sintetizar nanopartículas de óxido de metal [60].

Basados en sus propiedades únicas físicas, químicas, térmicas y mecánicas, las nanopartículas superparamagnéticas ofrecen un alto potencial para diferentes aplicaciones. Estas aplicaciones demandan nanomateriales de tamaños específicos, figuras, características de superficie, y propiedades magnéticas. Campos de alta densidad de almacenaje de datos, ferro fluidos, imágenes por resonancia magnética, recubrimientos anticorrosivos modificados, materiales para electrodos y catálisis, tratamiento de aguas residuales, separaciones, biomedicinas y bioseparaciones, son algunas aplicaciones [61].

Justificación

Síntesis de nanopartículas

Un método común y económico para la síntesis controlada de una gran cantidad de nanopartículas magnéticas, sin ningún agente surfactante estabilizador, es la co-precipitación de sales de hierro en ambientes alcalinos [62]. El pH de la solución cambia rápidamente y de forma localizada en el método convencional de coprecipitación, en donde una solución acuosa alcalina es agregada a la solución de la mezcla de los iones férricos y ferrosos. Cabe resaltar que, en la coprecipitación en reversa, donde la solución ácida mezclada de las sales de metal es agregada gota a gota a una gran cantidad de solución básica, el pH favorable de la solución puede mantenerse hasta que todos los componentes precipiten por completo [60]. Un método efectivo para la síntesis de nanopartículas magnéticas es la técnica de sonoquímica. La sonoquímica surge del fenómeno de cavitación acústica, la cual es, la formación, crecimiento, y el colapso de burbujas en medios líquidos. Las temperaturas extremadamente altas de aproximadamente 5000K, presión (~20 MPa), y un muy alto ritmo de enfriamiento (~10¹⁰ K/S), vienen del colapso de las burbujas. Este colapso puede ocasionar condiciones de reacción extremas las cuales llevan a varias

propiedades únicas de las partículas sintetizadas; el efecto micro jet que surge del colapso de las burbujas puede causar un mezclado microscópico en el procedimiento de síntesis y crear condiciones de reacción relativamente uniformes [63].

Caracterización de Nanopartículas

Las nanopartículas están definidas en la tecnología de nanopartículas como “ partículas finas definitivas con tamaños en la región nanométrica formadas manteniendo sus respectivas características químicas, cuyas características difieren significativamente de aquellas en la forma en bulto”. El incremento vasto en área superficial específica al escalar hacia partículas finas a la nano escala eleva sus características físicas y químicas originales como materiales o partículas extensamente [33]. Las Nanopartículas superparamagnéticas de magnetita son importantes para un diverso rango de aplicaciones tales como, imagen de resonancia magnética, entrega de fármacos y separación magnética. Estas aplicaciones requieren que las nanopartículas sean superparamagnéticas con tamaños menores de 20 nm, y una estrecha distribución de tamaño para asegurar una uniformidad en la en las propiedades físicas y químicas [64]. El nano análisis/medición es muy importante para desarrollar “procesamiento” y “fabricación” para nanomateriales ya que las funciones de nanomateriales son influenciadas por su tamaño, forma y estructuras. Los métodos de caracterización para el análisis y medición del nano fenómeno son esenciales para el desarrollo de la nanobiotechnology. Especialmente, el desarrollo de análisis precisos a nivel atómico para nanoestructuras locales, tales como composición química y estado de unión, defectos, e impurezas, es una clave para elucidar el mecanismo del nano fenómeno. Recientemente, mejoramientos en los equipos analíticos han permitido a investigadores estudiar y entender las nanoestructuras locales en materiales funcionales desde el nivel atómico [33].

Objetivo General:

Síntesis y caracterización de nanopartículas de ferrita de hierro por el método de coprecipitación en reversa asistido por ultrasonido por medio de FeCl₃, FeSO₄ y NH₄OH

Objetivos Específicos:

- Sintetizar nanopartículas de hierro
- Caracterizar propiedades ópticas por espectroscopias de UV-vis, infrarojo y raman.
- Caracterizar propiedades morfológicas como tamaño y forma por XRD, SEM y DLS
- Caracterizar composición química por XRD
- Caracterizar propiedades eléctricas y magnéticas por potencial zeta, VSM y MTGA

Antecedentes

Síntesis de nanopartículas

Para la mayoría de las aplicaciones de magnetita, se requiere que las nanopartículas de magnetita tengan un tamaño y forma uniforme y bien dispersadas en un solvente. El factor principal que afecta a la mayoría de las propiedades interesantes es el tamaño de la partícula. El tamaño y forma de las partículas de magnetita son generalmente controlados por el método de síntesis. Hay varias técnicas que han sido utilizadas para la síntesis de magnetita, las cuales incluyen coprecipitación de iones ferrosos y férricos en una solución básica, reacción hidrotérmica, coprecipitación oxidativa, reacciones de reducción con α -D-glucosa como reductor y precipitación de una solución parcialmente reducida de cloruro férrico [65]. El proceso más sencillo sintético es basado en el método de coprecipitación, el cual involucra la coprecipitación de iones M²⁺ y M³⁺ en medios acuosos básicos [56] Este método es el más a menudo utilizado en la obtención de óxidos de hierro, y consiste en la precipitación de los óxidos empezando con una solución acuosa de Fe²⁺/Fe³⁺ en un medio alcalino. La obtención de magnetita se puede describir por la siguiente reacción:



Generalmente , la síntesis se lleva a cabo en un rango de pH de 8 a 14, junto con una razón molar de 2:1 de Fe^{3+} / Fe^{2+} . Modificaciones en las condiciones de síntesis puede resultar en la formación de fases intermediarias, tales como hidróxidos y/o oxyhidróxidos [66].

El proceso de coprecipitación incluye varias etapas: nucleación, crecimiento y procesos secundarios como aglomeración, atrición y fragmentación. Las partículas obtenidas con el proceso convencional de coprecipitación son relativamente grandes con una distribución de tamaño ancha, debido a la dificultad de evitar la nucleación durante el subsecuente crecimiento del núcleo. Por otra parte, la tecnología sonoquímica se ha empezado a desarrollar para la preparación de magnetita debido a que la irradiación con ultrasonido puede disminuir el tamaño de partícula de magnetita [65]. El método de coprecipitación sonoquímico es preferido debido a su simplicidad, buen control en el tamaño de partícula y alto porcentaje de partículas monodispersas [67].

Wang et al. (2010) demostró que la asistencia de ultrasonido al método de coprecipitación en reversa (US-RP) comparado con el método convencional de coprecipitación en reversa en agitación magnética (MS-RP) producía nanopartículas de Fe_3O_4 más pequeñas, así como también el efecto de NH_4OH como base en el tamaño de partícula [60].

Caracterización de las Nanopartículas

Las diferencias en las propiedades que surgen con un material entrando al dominio de la escala nanométrica hacen que la caracterización post síntesis sea muy importante. El tipo de caracterización dependerá de la aplicación específica para la cual las nanopartículas se utilizarán. Las caracterizaciones típicas de nanopartículas comprende: (I) visualización de las nanopartículas para obtener su tamaño, forma y morfología superficial, lo cual se hace por microscopia

electrónica y microscopia de fuerza atómica(AFM); (II) determinación de su tamaño y carga superficial de las nanopartículas lo cual se hace por métodos tales como esparcimiento dinámico de luz (DLS) y mediciones de potencial zeta; (III) determinación de la estructura cristalina de la nanopartícula por técnicas de difracción de rayos x; (IV) análisis elemental de las nanopartículas o nanoestructuras por métodos tales como espectroscopia de dispersión de energía de rayos x; (V) técnicas espectroscópicas como espectroscopia de infrarrojo, espectroscopia UV-visible [68]. Todos los materiales poseen momentos magnéticos; las técnicas para medir esta propiedad en bulto macroscópica se definen como magnetometrías. Hay dos técnicas directas para medir el momento magnético de materiales: uno utiliza la detección del cambio en el flujo magnético producido por la muestra, y el otro utiliza la detección de un cambio en la fuerza que experimenta una muestra [69].

Caracterización por Microscopia Electrónica (EM)

Se observa que la mayoría de los electrones llegan dentro de un volumen con forma de gota la cual es alargada para Z pequeños, y aplastada para Z grandes. Dentro de este volumen los electrones interactúan con la muestra para producir radiaciones electromagnéticas y electrones libres. Los varios productos de interacción son: (1) electrones secundarios (2) electrones reflejados o retro dispersos (3) electrones transmitidos (4) Radiación X (5) Electrones Auger (6) Radiación cátodo luminiscente (7) Corriente absorbida (especimen). De estos, (3) son usados para producir imágenes en la microscopia electrónica de transmisión, (1) y (2) en microscopia electrónica de barrido, mientras que (4)-(7) puede proveer información analítica adicional sobre la muestra en cualquier tipo de microscopia. Dentro de la familia de microscopios electrónicos hay dos rangos bien definidos de microscopios, correspondiendo a microscopios de transmisión y reflexión, el cual mira directamente a la estructura interna de especímenes translucidos y las características superficiales de un material, respectivamente. Ambos microscopios pueden ser

utilizados para estudiar partículas, para TEM se esparce una monocapa de partículas en las rejillas de soporte y para SEM solo se polvea una pequeña cantidad de muestra en el porta muestra, y un recubrimiento de carbón o metálico si es necesario. Cuando el tamaño de partícula es por debajo de $0.1 \mu\text{m}$ el TEM es preferible ya que producirá un contorno más claro a partículas muy pequeñas hasta el rango sub-nanométrico. El SEM es preferible para partículas por arriba de $10 \mu\text{m}$, estas son inconvenientemente grandes para medir tamaño con TEM, ya que partes de esta se pudieran perder detrás de las barras de las rejillas de soporte [70].

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM):

En un microscopio electrónico de transmisión (TEM), los electrones penetran una muestra delgada y posteriormente son fotografiadas por lentes apropiados. El grosor de una muestra de TEM debe ser muy pequeña: usualmente en el rango de 10 nm a $1 \mu\text{m}$. Los TEMs usan un voltaje de aceleración de electrones entre 100 kV y 300 kV , pocos instrumentos de alto voltaje han sido construidos con voltajes de aceleración tan altos como 3 MV . Una limitación de los TEM es que, a no ser que la muestra se haga muy delgada, los electrones son fuertemente dispersados dentro de la muestra, o incluso hasta absorbidos en vez de transmitidos.

Microscopía Electrónica de Superficie o Barrido (SEM):

El voltaje de aceleración máximo para SEM es normalmente 30 kV , lo cual es menor que para el TEM. Mientras que el TEM usa un haz incidente estacionario, la sonda de electrones del SEM es escaneado horizontalmente a través de la muestra en dos direcciones perpendiculares. Cuando los electrones acelerados entran a un sólido, son dispersados de ambas maneras elásticamente (por interacciones electrostáticas con el núcleo atómico) o inelásticamente (por interacciones con electrones atómicos). La mayoría de las interacciones son dispersiones frontales, lo cual implica ángulos de deflexión menos de 90° . Pero una pequeña fracción de los primarios son elásticamente retro dispersados ($\theta > 90^\circ$) con solo una pequeña fracción de pérdida de energía.

Sabemos que la pérdida de energía de electrones primarios aparecerá como la ganancia de energía de los electrones atómicos que son responsables por la dispersión inelástica. La distancia promedio que viajan los secundarios en el sólido es muy pequeña, normalmente entre uno o dos nm. Aquellos secundarios creados en la superficie puede que escapen al vacío, especialmente si están viajando hacia la superficie. En promedio los secundarios que escapan son generados solo dentro de una muy pequeña profundidad (<2 nm) debajo de la superficie, llamado profundidad de escape. Debido a que las señales de electrones secundarios (SE) usadas en SEM son derivadas secundarias que escapan al vacío, la imagen de SE es propiamente de la estructura superficial (topografía) de la muestra, se dice que la imagen presenta contraste topográfico [71].

Caracterización por Dynamic Light Scattering (DLS):

DLS, también conocido como espectroscopia de correlación de fotón, es uno de los métodos más populares utilizados para determinar el tamaño de NPM. Durante la medición de DLS, la suspensión de NPM es expuesta a un haz de luz, y mientras que la luz incidente interactúa con las NPM, la dirección e intensidad del haz de luz son ambos alterados debido a un proceso conocido como dispersión o esparcimiento. Dado que las NPM están en constante movimiento aleatorio debido a la energía cinética, la variación de intensidad con el tiempo, por lo tanto, contiene información de ese movimiento aleatorio y se puede utilizar para medir el coeficiente de difusión de la partícula. Dependiendo de la forma de la NPM, para partículas esféricas, el radio hidrodinámico de la partícula R_H se puede calcular de su coeficiente de difusión por la ecuación de Stokes-Einstein $D_f = k_B T / 6\pi\eta R_H$, donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, y η es la viscosidad del medio circundante. El radio hidrodinámico es el radio de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión dentro del mismo ambiente viscoso de las partículas que están siendo medidas [72]. Las nanopartículas dispersas, esparcen luz incidente proporcional a la potencia 6 de su radio. Cuando las partículas son < 1/10 de la longitud de onda

de la luz incidente (p. ej. $\lambda/10$) en tamaño, la luz dispersa lleva la misma energía (dispersión elástica) a la luz incidente y no es dependiente del ángulo (dispersión de Rayleigh). Sin embargo, cuando el tamaño de la partícula excede este límite de $\lambda/10$ la dispersión de Rayleigh es remplazada por la dispersión de Mie anisotrópica donde la luz esparcida es no igual a la energía (dispersión inelástica) de la luz incidente y es dependiente del ángulo donde la luz dispersada es más intensa hacia la dirección de la luz incidente. Las partículas en una dispersión coloidal esparcen un láser incidente y la intensidad de la luz esparcida es detectada en DLS. Las partículas en continuo movimiento dentro de la dispersión causan interferencias constructivas y destructivas y, por ende, la intensidad de la luz esparcida fluctúa con el pasar del tiempo. En DLS la fluctuación de la intensidad de la luz dispersa es correlacionada a pequeños intervalos de decaimiento (τ) y la intensidad ACF (función de autocorrelación) es obtenido a través de la siguiente ecuación mono-exponencial para muestras con partículas mono dispersas : $G(\tau) = 1 + b \cdot e^{-2D_t q^2 \tau}$ Donde, b = constante dependiente del instrumento y configuraciones ópticas, D_t = coeficiente de difusión traslacional y q = vector de dispersión el cual puede expresarse como: $|q| = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0 \sin \frac{\theta}{2}}$ donde, n_0 = índice de refracción (RI) del solvente, λ_0 = longitud de onda en el vacío y θ = angula de dispersión. La dispersión ACF ($G(\tau)$) es escrito comúnmente como $G_2(\tau)$ y es expresado como una función del campo de función de correlación $G_1(\tau)$ como se menciona en la siguiente ecuación: $G_2(\tau) = 1 + G_1(\tau)^2$. En los instrumentos de DLS (p. ej. Malvern Zetasizer®) un correlograma es generado donde RCF (función de correlación cruda) es graficado contra el tiempo de retardamiento (τ) como se muestra en la ecuación:

$RCF = G_2(\tau) - 1 = G_1(\tau)^2$ donde se muestra que la RCF es dependiente del campo de función de correlación $G_1(\tau)$. La función de autocorrelación [$G_2(\tau)$ o $G_2(\tau) - 1$] en DLS es calculada por ajuste de datos y luego el D_t es calculado utilizando la ecuación de Stokes-Einstein, donde k_B =

constante de Boltzmann $1.38064852 \times 10^{-23} J/K$), T = temperatura, η = viscosidad absoluta y R_H = radio hidrodinámico [73].

Caracterización Potencial Zeta (ζ):

La carga superficial de NPM juega un papel importante en la estabilidad coloidal. Puede ser descrita cualitativamente como la naturaleza y comportamiento de los grupos superficiales en solución a cierto pH en la presencia de un electrolito. Cuantitativamente, puede ser medido como un potencial eléctrico en la doble capa interfacial (EDL) de la superficie de las nanopartículas en suspensión. Un valor alto de potencial zeta (+ o -) es un indicador de la estabilidad de la dispersión de NPM debido a la interacción electrostática [74]. En general, 30 mV es la línea divisora [75]. El ζ puede ser calculado indirectamente de las técnicas experimentales (flujo de corriente, movilidad electroforética y conductividad eléctrica) usando aproximaciones teóricas. Es aceptado que los datos de ζ pueden ser calculados a partir de la movilidad electroforética (μ_e) utilizando la ecuación Smoluchowski, aunque esta no se ajuste bien a partículas pequeñas (<10 nm) o con potenciales de superficie muy altos. Técnicas alternativas han sido propuestas para el cálculo indirecto del ζ a partir de la μ_e . La ecuación de Henry puede corregir las limitaciones del tamaño, pero solo válida para potenciales bajos. De lo contrario, la teoría general de O'Brian y White a resultado en una ayuda significativa al problema, incluso si se consideran altos potenciales de superficie. En adición, la teoría por Ohshima proponiendo expresiones analíticas cubriendo un amplio rango de parámetros en el fenómeno de electrocinética (por ejemplo, el tamaño de partícula y el potencial de superficie) definitivamente se puede considerar de gran ayuda al calcular el ζ desde μ_e [76]. La μ_e de la partícula es calculado primero por: $\mu_e = \frac{V}{E}$ donde V = velocidad de la partícula ($\mu m/s$), E = fuerza de campo eléctrico ($Volt/cm$) – ambas cantidades conocidas. El ζ entonces se calcula de la μ_e por la ecuación de Henry's: $\mu_e = \frac{2\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta f(Ka)}{3\eta}$ donde ε_r =permitividad relativa/ constante dieléctrica, ε_0 = permitividad del vacio, ζ = potencial zeta , $f(Ka)$ = función de Henry y η = viscosidad

a una temperatura experimental. Cuando la capa eléctrica doble (EDL) es pequeña comparado con el radio de la partícula, el cual se puede deber a partículas grandes (hasta 1 μ m) dentro de soluciones acuosas a altas concentraciones salinas (10⁻² M), el valor de f(Ka) se toma como 1.5 y la ecuación de Henry se modifica a la ecuación de Helmholtz-Smoluchowski (HS): $\mu_e = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta}$. Por lo contrario cuando la EDL es mucho mas grande que la misma partícula debido a partículas pequeñas (≤ 100 nm) dispersas en bajas concentración de sal (10⁻⁵M) el valor de f(ka) se toma como 1 y la ecuación de Henry se puede modificar como la ecuación de Hückel: $\mu_e = \frac{2\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{3\eta}$ [73].

Caracterización Difracción de Rayos X (XRD):

La difracción de rayos X es una técnica poderosa no destructiva que puede ser utilizada para la identificación de fase, determinación de orientación, medición de parámetros de red, evaluación de calidad de cristal, y determinación de estructura cristalina [77]. EL propósito principal de la difracción de rayos X por cristales es conocer la condición particular en la cual los rayos X dispersados desde los átomos y los rayos X incidentes están completamente en fase y se refuerzan unos a otros para producir un haz de difracción detectable. Para este propósito, el método más importante y familiar es dado por la ley de Bragg la cual incorpora el ángulo de Bragg. También es requerido recordar las siguientes dos relaciones geométricas: 1. El ángulo entre el haz incidente de rayos X y la normal al plano de reflexión es igual a aquel entre la normal y el haz de rayos x difractados. El haz incidente de rayos X, el plano normal, y el haz de rayos X difractados son siempre coplanar. 2. El ángulo entre el haz difractado de rayos X y el transmitido siempre es 2 θ y este ángulo se llama "ángulo de difracción". Si los rayos X incidentes de longitud de onda (λ) impactan un cristal donde todos los átomos están dispuestos en un arreglo periódico regular con distancia interplanar d, se detecta un haz de difracción con suficiente intensidad solo cuando la "condición de Bragg" o "Ley de Bragg" es satisfecha. Los rayos X difractados de todos los átomos en todos los planos son considerados completamente en fase tal que se produce un haz de rayos

x difractados con intensidad apreciable en una dirección particular la cual satisface la ley de Bragg ($2d\sin\theta=\lambda$). El ángulo de difracción 2θ de cualquier grupo de planos (h k l) puede ser medido combinando la ecuación de la ley de Bragg con las ecuaciones de espaciado de planos las cuales relacionan la distancia por medio de la relación entre la distancia de planos adyacentes a los índices de Miller y parámetro de red para cada sistema de cristal [78]. La difracción de rayos x se puede realizar para obtener la estructura cristalina de la partícula. En un patrón de difracción, la intensidad se puede utilizar para medir la proporción de óxido de hierro formado en la mezcla, comparando las intensidades de los picos experimentales y los de referencia [79]. La difracción de rayos X también puede revelar el tamaño de cristal, por medio de la ecuación de Scherrer [80]. El análisis de Scherrer de la XRD determina el tamaño basado en el ancho del pico de difracción y puede ser calculado por la ecuación $\tau = (K\lambda)(\beta\cos\theta)^{-1}$, donde K es la constante de la forma (usualmente 0.89 pero varía con la forma actual del cristal), λ es la longitud de onda de los rayos x utilizados, β es el ancho de pico a media altura en radianes y θ es el ángulo de Bragg [74]. La ecuación de Scherrer es básicamente aplicable a determinar solamente el diámetro de nanopartículas esféricas (<100 nm) [81].

Espectroscopia de Energía dispersa de Rayos X (EDS o EDX)

A menudo hay una necesidad para la información química, tal como la composición química local. Para este propósito, se requiere cierta respuesta del espécimen que sea sensible al número atómico (Z) exacto de los átomos. Conforme Z incrementa, la carga nuclear aumenta, atrayendo electrones más cerca al núcleo cambiando su energía. Los electrones que son de mayor uso no son los electrones exteriores (valencia) si no los electrones de las capas internas. Ya que estos últimos no juegan un papel en el enlace químico, su energía no es afectada por los átomos del alrededor y permanecen indicativos de la carga nuclear y por lo tanto del Z. Cuando un electrón de una capa interna tiene una transición de un nivel de energía superior a uno inferior, un fotón

de rayos x es emitido, cuya energía ($hf = hc/\lambda$) es igual a la diferencia en los dos niveles cuanticos. Los electrones primarios entrando a una muestra de TEM, SEM o STEM causan una emisión de rayos X, y por la identificación de la longitud de onda (WDS) o energía de fotones (EDS) presente, se puede realizar un análisis químico (más correcto: elemental) [71]. Este método bastante exitoso de análisis de rayos X es a menudo popularmente conocido por análisis de energía dispersa de rayos X (EDAX). Esta técnica utiliza detectores de semiconductores para clasificar la radiación x de acuerdo con la energía en lugar de la longitud de onda. El detector, un disco de monocristal de Si (Li) o altamente puro germanio (HPGe o IG) de 3-5 mm de grosor y un área activa entre 10 y 30 mm², convierte la energía incidente de fotones de rayos x a pulsos de corriente proporcional a la energía del fotón. Estos pulsos son amplificados, digitalizados y alimentados a un analizador multicanal o a la memoria de una computadora, la cual los almacena en un sitio apropiado a la altura del pulso. La memoria puede tener 1000 canales cada uno con un ancho de 10, 20, 40 u 80 eV, por lo que el rango de la energía total cubierto por el análisis sería de 10, 20, 40 u 80 keV, respectivamente. El progreso del análisis y su espectro final se imprime en un monitor de TV, el cual podría estar en monocromático o a color. En consecuencia, el espectrómetro de energía dispersa es capaz de analizar todo el espectro simultáneamente. En la práctica el rango de energía de 1-10 keV es particularmente útil, conteniendo elementos de la línea K con Z de 11 a 32, líneas L de Z de 30 a 80 y líneas M de Z = 62 hacia arriba [70].

Caracterización Espectroscopia de Transformada de Fourier de Infrarrojo (FT-IR):

La región infrarroja ocupa solo una pequeña porción del espectro de radiación electromagnética, localizado entre la región ultravioleta más energética y la región de radio frecuencias de baja energía. En el análisis del espectro infrarrojo, es común reportar la absorción de bandas en ambas unidades de frecuencia y longitud de onda. Los centímetros recíprocos (cm⁻¹) o número de onda son unidades de frecuencia, ya que son equivalentes a ciclos por centímetros. La región infrarroja esta entre 4000-625 cm⁻¹ (2.5-16 μm), el infrarrojo cercano es de 12,500-4000 cm⁻¹ y el infrarrojo lejano de 625-50 cm⁻¹. Un espectrómetro de infrarrojo mide

la absorción de radiación infrarrojo de la muestra como una función de la frecuencia de la radiación [82]. La espectroscopia de infrarrojo es una herramienta importante para sondear varios fenómenos de ordenamiento y provee información no solo de la posición de iones, sino también de los modos de vibración de cristales en general y de ferritas en particular. Es una técnica muy útil para deducir investigación estructural y la redistribución de cationes entre sitios octaédricos y tetraédricos de ferritas. Se observan fuertes bandas de absorción en el rango de 407 cm^{-1} - 654 cm^{-1} , las cuales son consistentes con el esqueleto de ferritas para los sitios octaédricos y tetraédricos respectivamente. Generalmente las espinelas tienen estructuras cúbicas centrada en las caras con una gran celda unitaria conteniendo ocho unidades de fórmulas. Hay dos tipos de redes para la ocupación de cationes. Los sitios A y B tienen coordinaciones tetraédricas y octaédricas, respectivamente. Comúnmente los cationes Me^{+2} y Fe^{+3} se distribuyen en ambos sitios. En espinelas normales, los cationes Me^{+2} ocupan sitios tetraédricos y los cationes Fe^{+3} ocupan sitios octaédricos. Sin embargo, en la espinela inversa los cationes Fe^{+3} ocupan ambos sitios tetraédricos y octaédricos, donde los cationes Me^{+2} ocupan sitios octaédricos [83].

Caracterización UV-visible:

En la medición de espectroscopio de UV-vis (luz ultravioleta visible), la absorción de luz como función de la longitud de onda proporciona información acerca de las transiciones de electrones que ocurren en un material. La fracción de luz transmitida es descrita por la ley de Berr-Lambert ($\frac{I}{I_0} = e^{-\sigma(N_1-N_2)l}$), la cual postula que la que la fracción de luz medida después de la interacción con la muestra (I , usualmente medida como transmitancia o reflectancia) contra la intensidad incidente (I_0) es dependiente de la longitud del camino de la luz a través de muestra (l), la sección transversal de absorción (σ) de la transición, y la diferencia en la población del estado inicial (N_1) y el estado final (N_2) de los niveles de energía electrónicos inicial (E_1) y final (E_2). Esto es escrito a menudo simplemente como la ley de Beer: ($A = \epsilon cl = -\log_{10} \frac{I}{I_0}$) donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de absorbtividad molar del material, c es la concentración de las especies absorbantes y l es la longitud de camino de la luz a través de la muestra. Nótese que la intensidad

medida de un sistema real puede ser complejo debido a transiciones que ocurren en múltiples estados iniciales y finales [84]. Si los nanomateriales dispersos en fluidos tienen bandas de absorción características en la longitud de onda 190-1100 nm, es un método fácil y confiable para evaluar la estabilidad de nano fluidos utilizando espectroscopia de UV-vis [85]. Hay que resaltar que las nanopartículas de Fe exhiben una intensa banda de absorción en la región ultravioleta visible. Su espectro UV-vis conocido como banda de absorción del plasmon de superficie es producido por el movimiento de los electrones de conducción en las partículas como consecuencia del campo eléctrico de la luz incidente. Las propiedades de la banda de absorción del plasmon de superficie de las nanopartículas de Fe dependen de su tamaño, forma, medio que lo rodea, acoplamiento de los coloides y solutos adsorbidos [86].

Caracterización de Espectroscopia de Raman

Cuando fotones interactúan con materia, tal como cuando una muestra es iluminada con luz monocromática, puede ser reflejada, absorbida, o dispersada. La espectroscopia de Raman examina esta interacción entre luz y materia cuando la luz es esparcida. Los electrones en un átomo pueden ser excitados a un estado virtual o estados excitados. Hay dos tipos de esparcimientos: elásticos y no elásticos. El esparcimiento más común es la dispersión elástica, llamada dispersión de Rayleigh, en donde los fotones dispersados tienen la misma longitud de onda que la luz incidente. Mientras que el esparcimiento no elástico, también llamado dispersión de Raman, el fotón incidente interactúa con la materia y su longitud de onda es desplazada a valores ya sean más bajos (desplazamiento rojo) o más altos (desplazamiento azul). En un cristal perfecto, la ley de conservación de momento lleva a una regla de selección de la dispersión de Raman de primer orden de un fotón, gobernada por la ecuación $q = 0$, donde q denota el vector de onda de un fonon. Esto implica que el espectro Raman de un cristal perfecto solo es contribuido por fonones en el centro de la zona Brillouin. Sin embargo, cuando el tamaño del cristal es

reducido, simetrías traslacionales de materiales cristalinos se pierde. Entonces la regla pasada ($q = 0$) ya no es válida. Consecutivamente no solo los modos vibracionales a $q = 0$ sino también $q \neq 0$ contribuyen al espectro Raman. En adición, la pérdida de simetría en las fronteras de nanopartículas también resulta en la aparición de superficies específicas y contribuciones de interfases vibracionales. Estos dos factores a menudo son despreciados en la espectroscopia de Raman de materiales en bulto, pero son muy significantes en nano cristales, donde la concentración de fronteras de nanopartículas es bastante alta. Finalmente, la reducción en la dimensión de dominios de materia hasta la escala nanométrica también induce un confinamiento cuántico de las funciones de onda vibracionales y electrónicas. En la mayoría de los casos, progresivamente hay desplazamientos del pico Raman a energías más bajas, y la forma de línea se convierte gradualmente más ancha y asimétrica (hacia el lado de menor energía) conforme el tamaño estructural se vuelve más pequeño. Por lo tanto, las nanopartículas presentan diferentes propiedades electrónicas y vibracionales con respecto a sistemas en bulto [87].

Caracterización de Espectroscopia de fotoelectrón por Rayos X (XPS):

La espectroscopia de fotoelectrones por rayos X (XPS), la cual es también referida como espectroscopia de fotoemisión por rayos x, es una técnica de análisis superficial que está basada en la medición de espectros de energía de fotoelectrones emitidos de la superficie de un material bajo irradiaciones con una irradiación de rayos x suaves monocromáticos. XPS es rutinariamente utilizado para un análisis cualitativo y/o cuantitativo de composiciones elementales de superficie y análisis químico o estado electrónico de cada elemento en la superficie de la muestra. Una característica importante del análisis de XPS es que la técnica es uno de los métodos más sensibles de superficie para el análisis de elementos que están presentes en la superficie de la muestra dentro de los 1-10 nm [33].

Cuando la energía del fotón es más pequeña que la energía de enlace de los electrones de las capas internas, el fotón interactúa con los niveles de valencia de la molécula o sólido, llevando a cabo una ionización y la remoción de uno de estos electrones de valencia. Dado que existe una energía de enlace característica asociada con cada orbital atómico del núcleo para cada elemento, cada elemento, por lo tanto, dará lugar a un conjunto de picos característicos en el espectro de fotoelectrón a energías cinéticas determinadas por la energía del fotón y las respectivas energías de enlace. Es posible identificar el estado químico (p. ej. Valencia) cuando la precisión del instrumento es del orden de 0.1 eV. El fenómeno de XPS está basado en el efecto fotoeléctrico ($E_K = h\nu - E_B$). La energía de enlace (E_B) es dependiente del ambiente químico del átomo, haciendo útil la XPS para identificar el estado de oxidación y ligandos de un átomo. Dado que las energías de enlace (E_B) de niveles de energía en sólidos son convencionalmente medidos con respecto al nivel Fermi de un sólido, en lugar del nivel de vacío, esto involucra una pequeña corrección a la ecuación ($E_K = h\nu - E_B$) con el fin de tomar en cuenta la función de trabajo (E_W) del sólido. Las energías medidas experimentalmente de los fotoelectrones son aquellas dadas por: $E_K = h\nu - E_B - E_W$. Está claro de la ecuación que (a) No es posible la fotoemisión para $h\nu < E_W$ (b) En sólidos, no hay fotoemisión de niveles con $E_B + E_W > h\nu$ (c) La energía cinética E_K de fotoelectrones aumenta conforme la energía de enlace E_B de un sólido disminuye (d) Un rango de energías cinéticas pueden ser producidas si la banda de valencia es ancha

Dado que las energías de enlace de diferentes niveles (E_B) de un elemento dependen del nivel de energía, se sigue la siguiente: (a) Para cualquier elemento particular, $E_B(1s) > E_B(2s) > E_B(3s) \dots$ (b) La energía de enlace de un orbital incrementa con el número atómico (Z) del elemento, $E_B(\text{Na } 1s) < E_B(\text{Mg } 1s) < E_B(\text{Al } 1s) \dots$ (c) La energía de enlace de un orbital no es afectada por efecto de isótopo, para todos los isótopos de un elemento, la energía de enlace será la misma [88]. Una característica del espectro teórico es que se dividen en dos los orbitales p hasta f . Esto es debido

al acoplamiento entre el spin electrónico y el momento angular orbital para estos orbitales. Los orbitales s no se dividen ya que no tienen momento angular. Uno de dos métodos puede ser aplicado para determinar la magnitud de este acoplamiento, acoplamiento $j-j$ o acoplamiento $L-S$ (Russell-Sanders). Este último predomina para números atómicos debajo de ~ 20 . En el acoplamiento $j-j$, la magnitud del momento angular total para un electrón dado es la suma vectorial de su spin y momento angular orbital. Dado que los orbitales s no tienen momento angular, los electrones con configuración en spin-up o spin-Down tienen la misma magnitud de momento angular. En orbitales p , el acoplamiento de vectores de estado de spin-up o spin-Down con los vectores de momento angular orbital de ± 1 da un total de momento angular de $1/2$ o $3/2$ [69].

Caracterización de Propiedades Magnéticas

En magnetismo, hay una distinción fundamental entre las propiedades intrínsecas y extrínsecas. Las propiedades intrínsecas, tales como magnetización espontánea M_s , la temperatura de Curie T_c y la anisotropía magneto cristalina, son realizadas a longitud atómica y escalas de tiempo, pero describen cristales infinitos. Las propiedades intrínsecas referencian a él origen atómico del magnetismo e involucran fenómenos cuánticos tales como, intercambio, interacción de campo de cristal, salto interatómico y el acoplamiento spin-orbita. En contraste, las propiedades magnéticas extrínsecas, tales como coercitividad H_c y la remanencia M_r , reflejan la estructura real del imán (morfología). Las propiedades magnéticas derivadas del ciclo de histéresis son propiedades extrínsecas, ya que describen la estructura real del imán [89].

Empezando por subrayar que cualquier material responderá a un campo magnético aplicado. Por lo tanto, estrictamente hablando, todo siempre es magnético, aunque no en el sentido usual en el cual usualmente se refiere a cosas como imanes.

Cuando un campo H es aplicado, la inducción magnética B resultante dentro del material escribe: $B = \mu_0(H + M)$

Donde M es la magnetización dentro de la muestra y μ_0 la permeabilidad magnética. La magnetización está ligada al campo aplicado vía la susceptibilidad magnética de acuerdo con: $M = \chi H$ [90].

La mayoría de los materiales exhiben pequeña susceptibilidad magnética (paramagnetismo) o inclusive hasta susceptibilidad magnética negativa (diamagnetismo) [40].

La magnetización es no cooperativa (diamagnetismo y paramagnetismo) cuando es gobernada únicamente por el comportamiento magnético de los momentos magnéticos individuales. Por otro lado, un arreglo cooperativo (ferromagnetismo, anti-ferromagnetismo, ferrimagnetismo, y muchos más) depende en las interacciones entre numerosos (1 mol), momentos magnéticos y, si imaginariamente removemos un momento magnético del bulto, este único ya no es capaz de describir el comportamiento magnético del conjunto.

Diamagnetismo: Es intrínseco a todos los materiales. Generalmente cuando hay electrones bajo un campo magnético aplicado externo, la precesión alrededor del núcleo cambia la frecuencia para promover un campo magnético extra y protegerse del externo. Entonces esperamos una magnetización lineal y negativa en función del campo magnético.

Paramagnetismo: este arreglo surge de la polarización de los momentos magnéticos debido a la acción de un campo magnético. Sin un campo magnético aplicado hay momentos magnéticos apuntando hacia todas las direcciones y entonces la magnetización es cero. La aplicación de un campo magnético promueve una orientación relativa de los momentos magnéticos, incrementando el valor de magnetización. A valores altos de campos magnéticos, todos los momentos magnéticos son paralelos, y la magnetización alcanza su valor máximo (saturación: M_S)

Ferromagnetismo: Dos parámetros caracterizan el arreglo ferromagnético, (1) por encima de la temperatura de Curie (T_C) se comporta como un sistema paramagnético y por debajo de la T_C el sistema tiene una magnetización espontánea. (2) El valor de saturación de la magnetización (M_S) es análogo al caso de paramagnetismo, mide la suma aritmética de todos los momentos magnéticos paralelos.

Anti-ferromagnetismo: Considerando dos arreglos magnéticos: M_A y M_B , de la misma magnitud. Cada uno es ferromagnético. La diferencia es que M_A está orientado en sentido opuesto a M_B .

Ferrimagnetismo: En este caso dos arreglos tienen diferentes valores de momento magnético ($M_A \neq M_B$) en paralelo y en sentidos opuestos [91].

Los efectos únicos inducidos por la nano escala distinguen el magnetismo de los nanomateriales de sus contrapartes en bulto. Cuando un material es cortado a dimensiones más pequeñas, el número de dominios magnéticos incluidos en el material es disminuido y la coercitividad es incrementada. Cuando el tamaño se acerca a un valor crítico, el material solo puede soportar dominios magnéticos individuales y el comportamiento magnético de este material uni-dominio depende principalmente de la rotación de magnetización. Dependiendo de las características magnéticas, el tamaño de uni-dominio puede ser de decenas, centenas o hasta miles de nanómetros. Cuando las dimensiones del material continúan encogiéndose debajo del tamaño de uni-dominio, los átomos superficiales y la temperatura empiezan afectar drásticamente el comportamiento magnético y el material puede convertirse en superparamagnético a temperatura ambiente en tal caso puede ser magnetizado como un material ferromagnético, pero su dirección de magnetización es aleatorizada por agitación térmica, mostrando magnetización remanente nula y ninguna coercitividad. La resistencia al cambio de magnetización en un material (coercitividad) es una medida principal para la suavidad magnética. Materiales magnéticos suaves requieren fácil cambio de magnetización durante el uso, por lo tanto, valores pequeños de

coercitividad (menos de 400 Am⁻¹ o 5 Oe) son deseables. La saturación de magnetización es otra figura de mérito, donde valores más altos son preferentes, resultando en menos material necesitado para un componente dado. Estas dos cantidades pueden ser determinadas de un experimento de ciclo de histéresis utilizando una técnica cuasi estática (magnetómetro de muestra vibrante) [40].

Hipótesis

- Ho: El método de síntesis US-RP genera nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄
- H1: El método de síntesis US-RP no genera nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄

Experimental

Preparación de Nanopartículas de Fe₃O₄.

Síntesis de nanopartículas de Fe₃O₄

Las nanopartículas de Fe₃O₄ se sintetizarán por un método de precipitación asistido por ultrasonido (US-RP). Se mezclara una solución de 5.0 mL de 1.0 mol/L de FeCl₃ con 10.0 mL de 0.5 mol/L de FeSO₄. La solución mezclada de Fe²⁺/Fe³⁺ se agregara por goteo a 20 mL de 3.5 mol/L de agua de amonio a 60 °C bajo irradiación de ultrasonido, la cual se lleva a cabo a 25 kHz con un poder de 140 W (KQ-200KDE, China). Después de 30 min de reacción, las nanopartículas de Fe₃O₄ de color negro generadas se recolectan por separación magnética, se lavan con agua hasta obtener pH neutro, y se redispersan en 50 mL de agua [60]. Se filtran por vacío con un filtra de 220 nm con exceso de agua y se pasan a un horno a 100 °C por 5 min.

Caracterización de Nanopartículas de Fe₃O₄

Caracterización por UV-Vis de Nanopartículas de Hierro

Los espectros de UV-Vis se obtuvieron con el espectrofotómetro UV-Vis DR 6000, HACH. Las siguientes soluciones fueron analizadas en el espectrofotómetro; 1 ml de nanopartículas suspendidas en 50 ml de agua se aforo a 10 ml, soluciones de 0.01M de FeSO₄ y FeCl₃ por separado. La comparación de espectros se realizó dispersando nanopartículas a una concentración final de

2.5 mg/L en etilenglicol, n-propanol [86], agua destilada (TMAH 9.3 mg/mL & 1 mM NaCl) [92] y agua HPLC. Antes de cada lectura se ambienta la celda previamente lavada y se utiliza como blanco una solución sin nanopartículas. La energía de band gap para las transiciones directas e indirectas fue calculado de los espectros de UV-Vis utilizando la expresión de Davis y Mott [93].

Caracterización de FT-IR

Se obtuvo el espectro de IR a partir del polvo de nanopartículas utilizando el equipo Nicolet IS10 Thermo Scientific FT-IR con ATR.

Caracterización de espectroscopia de Raman

El espectro Raman fue medido con un microscopio Raman confocal (alpha300R; WITec) utilizando un láser Nd: YVO4 con una longitud de onda de excitación de 532 nm con potencia de 0.26 μ W. La dispersión Raman se obtuvo con un objetivo de 100x, ambas rejillas de 672 líneas mm^{-1} (4cm^{-1}) y 1800 líneas mm^{-1} (1cm^{-1}) y con una velocidad de adquisición de espectros puntuales de $\leq 10\mu\text{s}$ de 10 s y 10 acumulaciones. Los centros de los picos Raman se obtienen por medio del ajuste Lorentziano [94].

Caracterización de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Las muestras fueron nano estructuralmente caracterizadas utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (SEM; JEOLJ7600F, Tokio, Japón) con un voltaje de aceleración de 1 keV y electrones secundarios.

Caracterización de tamaño de partícula (DLS) y Potencial Zeta

La dispersión de nanopartículas resuspendida a 5 ppm en agua destilada con una concentración de 0.0093 g/mL de TMAH y 1 mM de NaCl, [92] tanto para las lecturas del diámetro hidrodinámico (D_h) y potencial zeta. El D_h se mide por medio de DLS con el equipo Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments; la distribución de tamaño se reporta en intensidad. El potencial zeta se midió con el

mismo equipo Zetasizer Nano ZS en un rango de pH de 3 a 12 ajustando con HCl y NaOH. Las celdas se lavaron con agua regia y alcohol, las celdas se ambientan antes de cada lectura.

Caracterización de Difracción de rayos X (XRD)

El polvo secado de nanopartículas de Fe_3O_4 fue caracterizado por difracción de rayos X (XRD) utilizando el equipo Bruker D8 Advance diffractometer (Bruker Co., Billerica, MA, USA), con radiación de $\text{Cu K}\alpha_1$, $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ a 30 mA y 30 kV, con pasos de 2θ de 0.02° por 1.2004 s por paso desde el ángulo de Bragg de 15° a 75° (2θ). La ecuación de Scherrer se utilizó para estimar el tamaño del cristal con el ancho del pico máximo a media altura (FWHM) del pico máximo correspondiente al plano (311) [95].

Caracterización de Espectroscopia de fotoelectrón por Rayos X (XPS)

Caracterización de Magnetometría de Muestra Vibrante

Las propiedades magnéticas de la curva de magnetización se determinaron por la gráfica de magnetización (emu g^{-1}) en función del campo aplicado H obtenidas a 300 K y 3 T con un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) en un Quantum Design MPMS3 [56].

Caracterización de Punto de Curie por Análisis Termogravimétrico

Una aproximación de la transición magnética se puede explorar utilizando un imán debajo de la muestra durante un análisis termogravimétrico (TGA) para determinar la temperatura de transición magnética [96]. Los termogramas para establecer la temperatura de Curie fueron obtenidos por análisis termogravimétrico magnético en una termobalanza TA modelo Q5000 con un imán permanente [97], hasta una temperatura de $950 \text{ }^\circ\text{C}$ con una rampa de $10 \text{ }^\circ\text{C min.}^{-1}$ bajo una atmósfera inerte de Ar [98].

Resultados y Discusiones

Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Fe_3O_4

Síntesis de Nanopartículas

Los óxidos de hierro existen en muchas formas en la naturaleza, siendo magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), y hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) los más comunes. La Magnetita es conocida como óxido de hierro negro y presenta el magnetismo más fuerte que cualquier óxido de metal de transición [99].

En la figura 1a se observa una solución acuosa con el nanomaterial de color negro sintetizado por la técnica US-RP, posteriormente se acercó un imán durante un minuto observando la propiedad magnética del nanomaterial (Fig.1b).

La caracterización de las nanopartículas magnéticas se realizó por espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis). En la figura 1c se muestran los espectros de UV-Vis correspondientes a los reactantes (curva a y b) y el nanomaterial sintetizado (curva c), se observa claramente que el producto tiene un espectro totalmente diferente al de los reactantes utilizados y no presenta una señal máxima obvia. El espectro obtenido por el nanomaterial sintetizado es similar a lo reportado por Gan et. al. [100] el cual presentó un espectro de UV-Vis de nanopartículas de Fe_3O_4 .

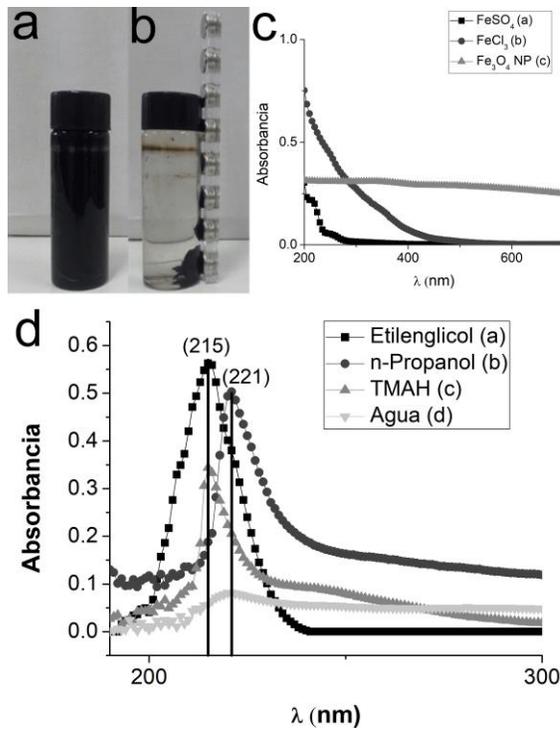


Figura 1: Separación magnética del producto negro generado suspendido en agua sin (a) y con (b) con campo magnético. Espectros de UV-vis (c) de los reactivos utilizados: FeSO_4 (curva a), FeCl_3 (curva b) y Fe_3O_4 MNP (curva c). Comparación de espectros de UV-vis de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 dispersas en diferentes medios: etilenglicol (■), n-propanol (●) TMAH 9.3 mg ml⁻¹ & 1 mM NaCl (▲) y agua destilada (▼).

Espectroscopia de UV-vis

Khordad, R. (2016) propone por simulaciones que las nanopartículas de Fe_3O_4 dispersas en etilenglicol y n-propanol, generan un espectro de absorción de UV-Vis con pico máximo dependiente del tamaño de partícula [86]. Jun-Dong, H et al. (2010) demostró que con una solución de TMAH 9.3 mg/ml & 1Mm NaCl se obtiene suficiente fuerza de repulsión (repulsión electroestática y repulsión estérica) para contraponer la atracción magnética [92].

En la figura 1d se presenta el espectro obtenido de las nanopartículas sintetizadas dispersas en etilenglicol(curva a), n-propanol (curva b), TMAH 9.3 mg/ml & 1Mm NaCl (curva c) y Agua (curva d), el espectro muestra un pico de absorbancia en la región ultravioleta a la longitud de onda de 215 nm (curva a y c) y 221 nm (curva b y d) muy parecido a lo obtenido por Awwad et al (2012) donde el pico máximo está cercano a los 230 nm [101]. La magnetita es un óxido de hierro el cual presenta hierro en sus dos estados de oxidación, este material presenta una banda de absorción

de UV-Vis a los 300 nm debido a una transición de cationes de los sitios octaédricos y tetraédricos [102]. Varias propiedades ópticas dependen del tamaño de la nanopartícula, al disminuir el tamaño de la partícula la absorción máxima se encuentra en una longitud de onda más corta; donde se observa un desplazamiento azul. De igual manera es importante reconocer que a mayor distribución del diámetro de partícula promedio se obtiene una absorbancia máxima más ancha y con menor distribución del tamaño de partícula promedio se obtiene una absorbancia máxima más estrecha [34]. Esto explica el ancho de los picos de los cuatro espectros al igual que el desplazamiento del punto máximo en la curva a y c ya que presentan una mayor dispersión por efecto del etilenglicol, el cual actúa como agente dispersante, y el surfactante TMAH respectivamente.

*Energía directa e indirecta de Band gap

Al graficar $(h\nu\alpha)^{1/2}$ y $(h\nu\alpha)^2$ en función de la energía del fotón($h\nu$), la energía óptica del band gap para transiciones indirectas y directas fue determinado, respectivamente. Los valores respectivos para los polvos son obtenidos al extrapolar $(h\nu\alpha)^{1/2} = 0$ para transiciones indirectas y $(h\nu\alpha)^2 = 0$ para transiciones directas como se muestra en la Fig. 2. En la tabla 2 se muestran nuestros resultados comparados con los de El-Diasty et. al. [93] y El Ghandoor et. al. [103], la diferencia puede ser atribuida al efecto de tamaño cuántico donde el tamaño de la partícula afecta su energía de band gap [93] . La energía de band gap de los nanomateriales es inversamente proporcional a su tamaño. Es fácil decir que las energías de band gap de nanomateriales puede ser controlado al controlar su tamaño [103].

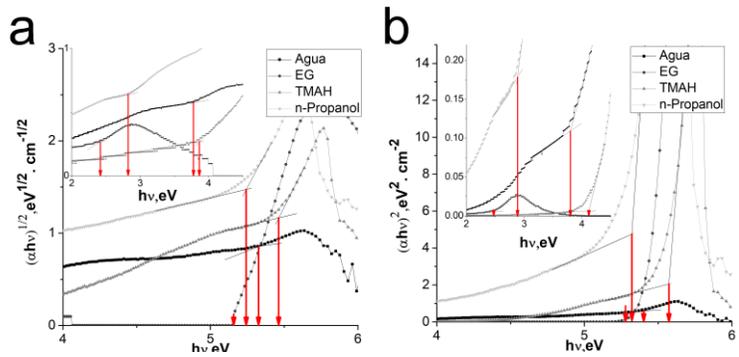


Figura 2: Determinación de la energía óptica de band gap para la transición (a) indirecta y (b) directa de las MNP (nanopartículas de Fe_3O_4) dispersas en agua (■), EG (●), TMAH (▲) y n-propanol (▼).

Tabla 2. Band gaps (eV) directas e indirectas calculadas en diferentes medios

MNP	EG	n-Propanol	Agua	TMAH	Referencia
Directa	2.47	2.88	3.8	4.12	2.87 [93]
	5.27	5.32	5.4	5.57	5.5 [103]
Indirecta	2.42	2.82	3.78	3.86	1.92 [93]
	5.16	5.24	5.32	5.46	5 [103]

Espectroscopia de FTIR

Las nanopartículas de Fe_3O_4 presentan un espectro infrarrojo con una vibración característica a el número de onda (cm^{-1}) de $640\ cm^{-1}$, $1630\ cm^{-1}$ y $3400\ cm^{-1}$ característicos del enlace Fe-O, H_2O y O-H respectivamente. La banda dividida en dos a $640\ cm^{-1}$ es característica de nanopartículas de Fe_3O_4 [104]. En la figura 3a se muestra el espectro de IR de las nanopartículas de hierro sintetizadas, en donde se muestran dos picos cercanos a $630\ cm^{-1}$ y $598\ cm^{-1}$ correspondientes al enlace Fe-O, de igual forma se observan el estiramiento de enlace O-H en la banda de $3362\ cm^{-1}$ y la deformación del enlace H-O-H en $1633\ cm^{-1}$. Las demás bandas presentes entre $816\ cm^{-1}$, $972\ cm^{-1}$ y $1115\ cm^{-1}$ se deben a otras especies de hidróxidos de óxido de hierro presentes en la superficie de la nanopartícula [105]; los cuales pueden ser lepidocrocita ($751\ cm^{-1}$, $795\ cm^{-1}$, 892

cm^{-1} , 1022 cm^{-1} , 1157 cm^{-1}), akaganeita (900 cm^{-1}), goetita (788 cm^{-1} , 1018 cm^{-1}), schwertmannita ($1040\text{-}1070 \text{ cm}^{-1}$, $1110\text{-}1140 \text{ cm}^{-1}$). [102] [106]

Espectroscopia de Raman

La magnetita es un pobre dispersor de Raman, particularmente debido a la baja potencia de laser, la cual es requerida para evitar a la muestra de padecer de una transformación de fase inducida por el láser [107]. Potencias de iluminación muy bajas son requeridas para evitar la transformación de estructuras de magnetita a estructuras de hematita. Con la potencia de iluminación 0.2 mW , las típicas firmas Raman de la estructura de magnetita (picos característicos fuertes $660\text{-}700 \text{ cm}^{-1}$ y topes pequeños característicos a $300 \text{ \& } 540 \text{ cm}^{-1}$) son obtenidos. El segundo orden (relacionado al carácter de resonancia del espectro Raman bajo excitación verde) presenta picos a $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ es esperado para materiales como magnetita puros [108]. En la Fig. 3b se muestra el espectro Raman y la deconvolución de los picos correspondientes a 344 cm^{-1} , $\sim 540 \text{ cm}^{-1}$, entre $660 \text{ y } 700 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$.

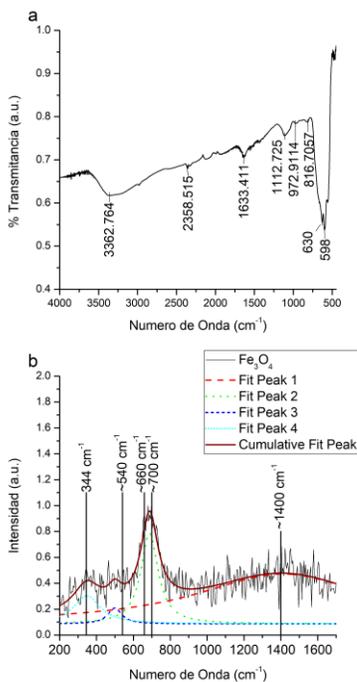


Figura 3: Espectros de las MNP sintetizadas: (a) ATR FT-IR y (b) Espectro Raman

Difracción de Rayos X

El difractograma de XRD de las nanopartículas de Fe_3O_4 sintetizadas se presenta en la fig.4a donde se observan los picos de difracción los cuales pueden ser indexados a una estructura espinela inversa de nanopartículas de Fe_3O_4 de acuerdo con la literatura (JCPDS No. Tarjeta 19-0629). Los picos intensos y nítidos sugieren que los cristales de Fe_3O_4 son altamente cristalinos. Sin embargo, el ancho de los picos de reflexión se debe al tamaño de partícula en el dominio nano [109]. En la Tabla 3 se observa de mejor manera como los picos e intensidades del difractograma, y las distancias Inter planares se asemejan a los de la Tarjeta JCPDS 19-0229. La aplicación de la ecuación de Scherrer al pico (311) con 2θ de 35.58° de las nanopartículas de magnetita indico que el tamaño de los cristales es de 15.57 nm [110].

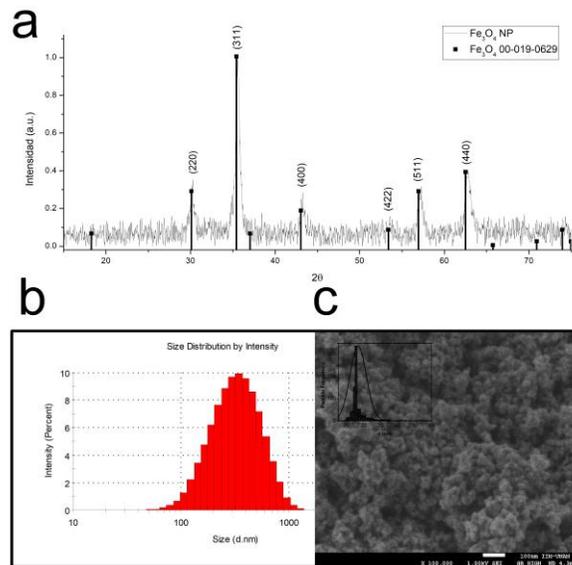


Figura 4: Identificación de fase y tamaño de MNP: (a) difractograma de rayos X, (b) distribución de diámetro hidrodinámico (Dh) por la técnica de DLS y (c) Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) con histograma de distribución de tamaño de partícula.

Tabla 3. Comparación de tarjeta JCPDS 00-019-0629 y nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) sintetizadas

Formula	JCPDS	2θ JCPDS	2θ Muestra	d (Å) JCPDS	d (Å) Muestra	I JCPDS	I Muestra	H	K	L
---------	-------	--------------------	----------------------	------------------	--------------------	------------	-----------	---	---	---

Fe ₃ O ₄	00-019-0629	30.10	30.14	2.97	2.96	30	32.55	2	2	0
		35.42	35.58	2.53	2.52	100	100	3	1	1
		43.05	43.28	2.10	2.09	20	28.43	4	0	0
		53.39	53.58	1.71	1.71	10	15.93	4	2	2
		56.94	57.26	1.62	1.61	30	30.9	5	1	1
		62.52	62.8	1.48	1.48	40	40.25	4	4	0

Tamaño y Morfología de Partícula

El análisis por DLS mostró que las nanopartículas sintetizadas presentan un D_h de 350 nm con una Des. Std de 83.10 y un PDI (índice de poli dispersión) de 0.402 (fig. 4b). En la fig. 4a y fig. 4c se muestra la difracción de rayos X (XRD) y SEM del cual se obtuvo un tamaño de cristal de 15.57 nm y 16.7 nm respectivamente. Wang, Nan, et al. (2010) publico que sintetizaron nanopartículas magnéticas de tamaño de 16.5 nm, 15 nm y 345.5 nm por el método de XRD, SEM y DLS respectivamente [60]. La dispersión y la prevención de aglomeración se debe al balanceo de tres fuerzas de atracción primarias: 1) Fuerzas a tractoras magnéticas; 2) fuerza gravitacional; 3) fuerzas de van der Waals [111]. En la ausencia de estabilizadores, aglomerados de magnetita se agregan y fácilmente salen de suspensión. El ritmo de agregación y sedimentación son dependientes en la concentración de partículas y las condiciones acuosas tales como pH y fuerza iónica [112]. En la Figura 5 muestra por medio de DLS cómo se presenta aglomeración de las nanopartículas, ya que, va aumentando el tamaño conforme pasa el tiempo entre una lectura y

otra hasta quedar totalmente aglomerada. En las fig. 6-9 se muestran el comportamiento anteriormente descrito de las NPM, en imágenes de SEM.

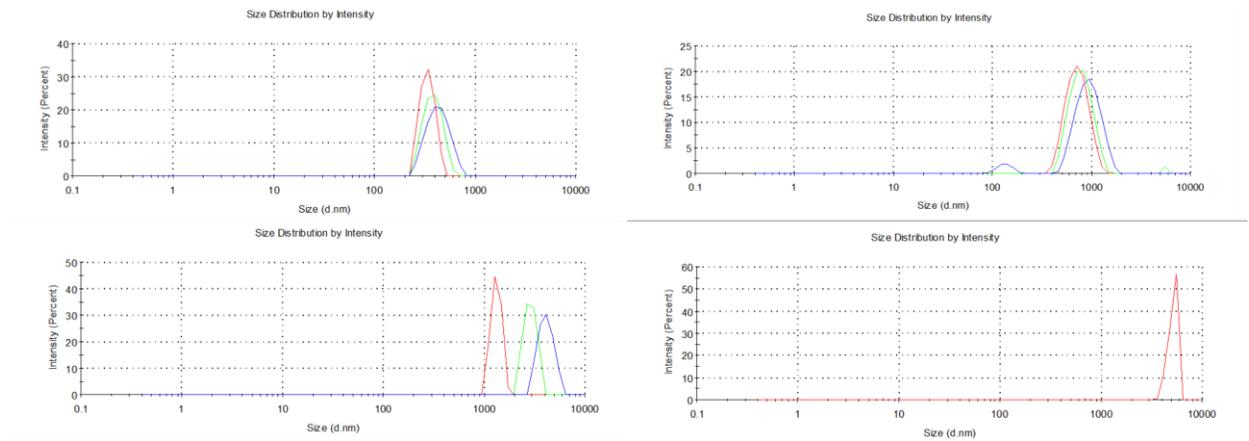


Figura 5: Mediciones de DLS comprobando agregación de MNP (nanopartículas de Fe_3O_4) conforme pasa el tiempo.

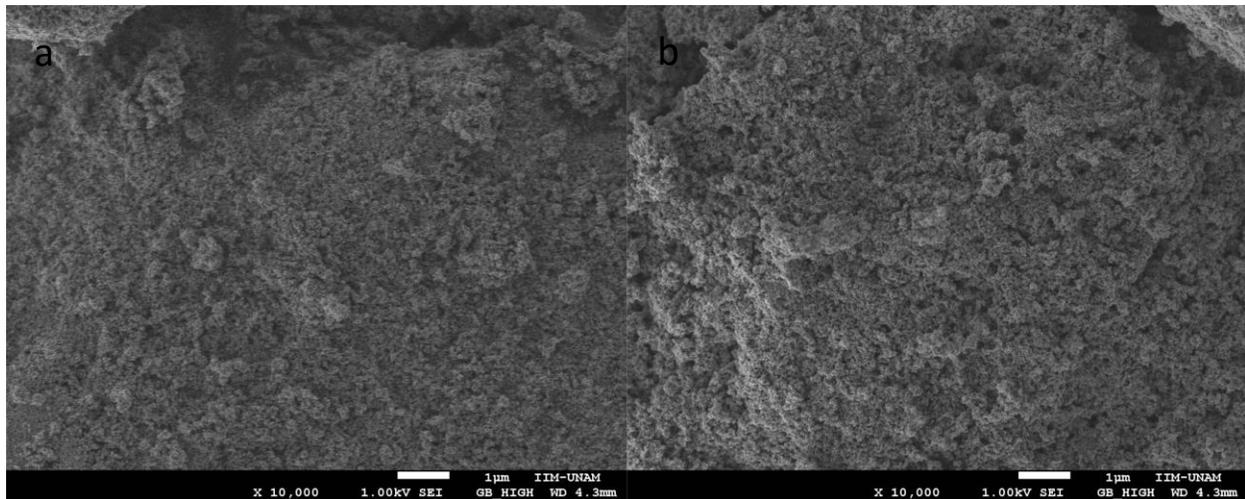


Figure 6: Imágenes de SEM con una aceleración de electrones de 1 kV de las MNP (nanopartículas de Fe_3O_4) con aumento de (a) 10,000 y (b)100,000.

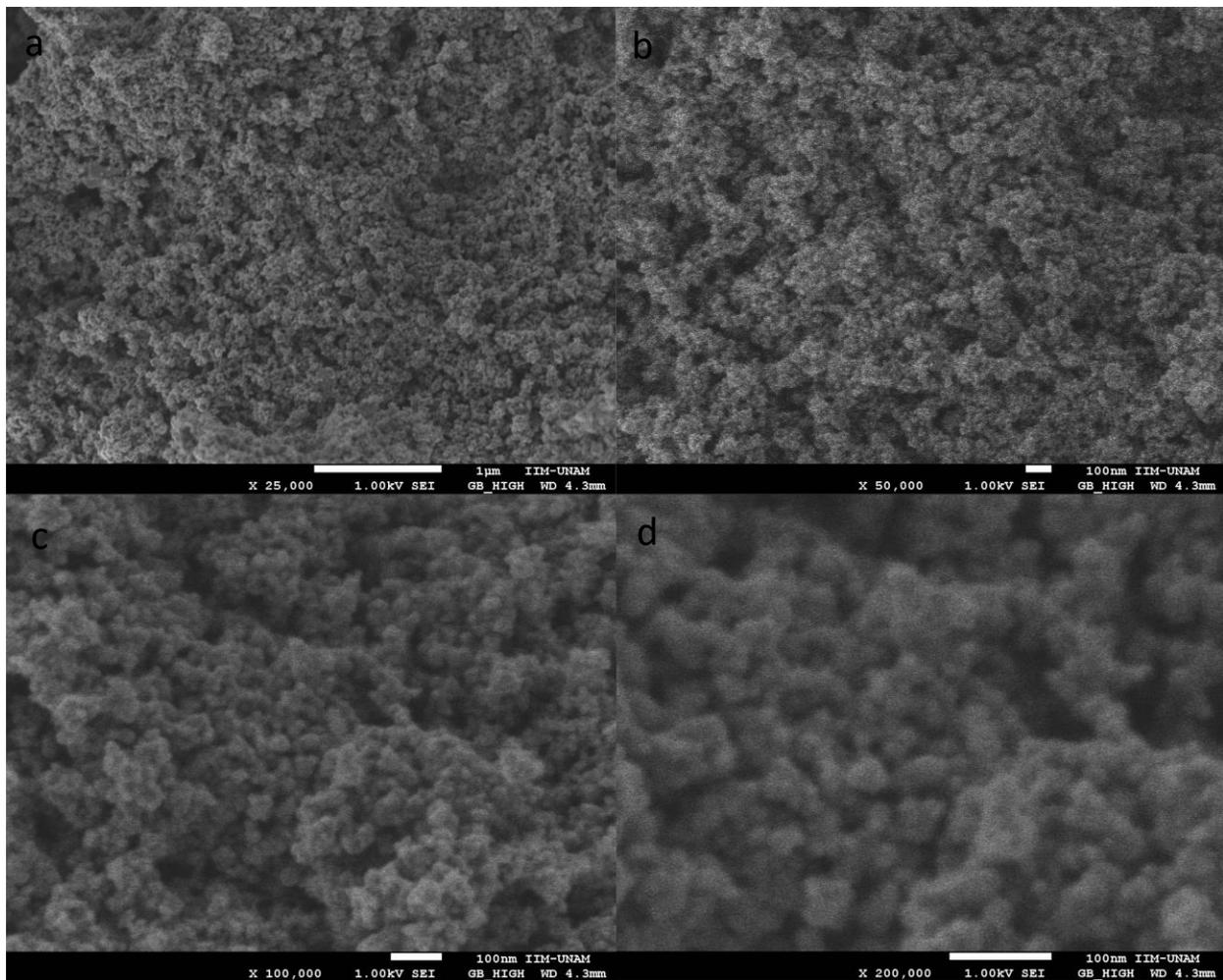


Figura 7: Imágenes de SEM con una aceleración de electrones de 1 kV de las MNP (nanopartículas de Fe₃O₄) con aumento de (a) 25,000, (b) 50,000, (c) 100,000 y (d) 200,000.

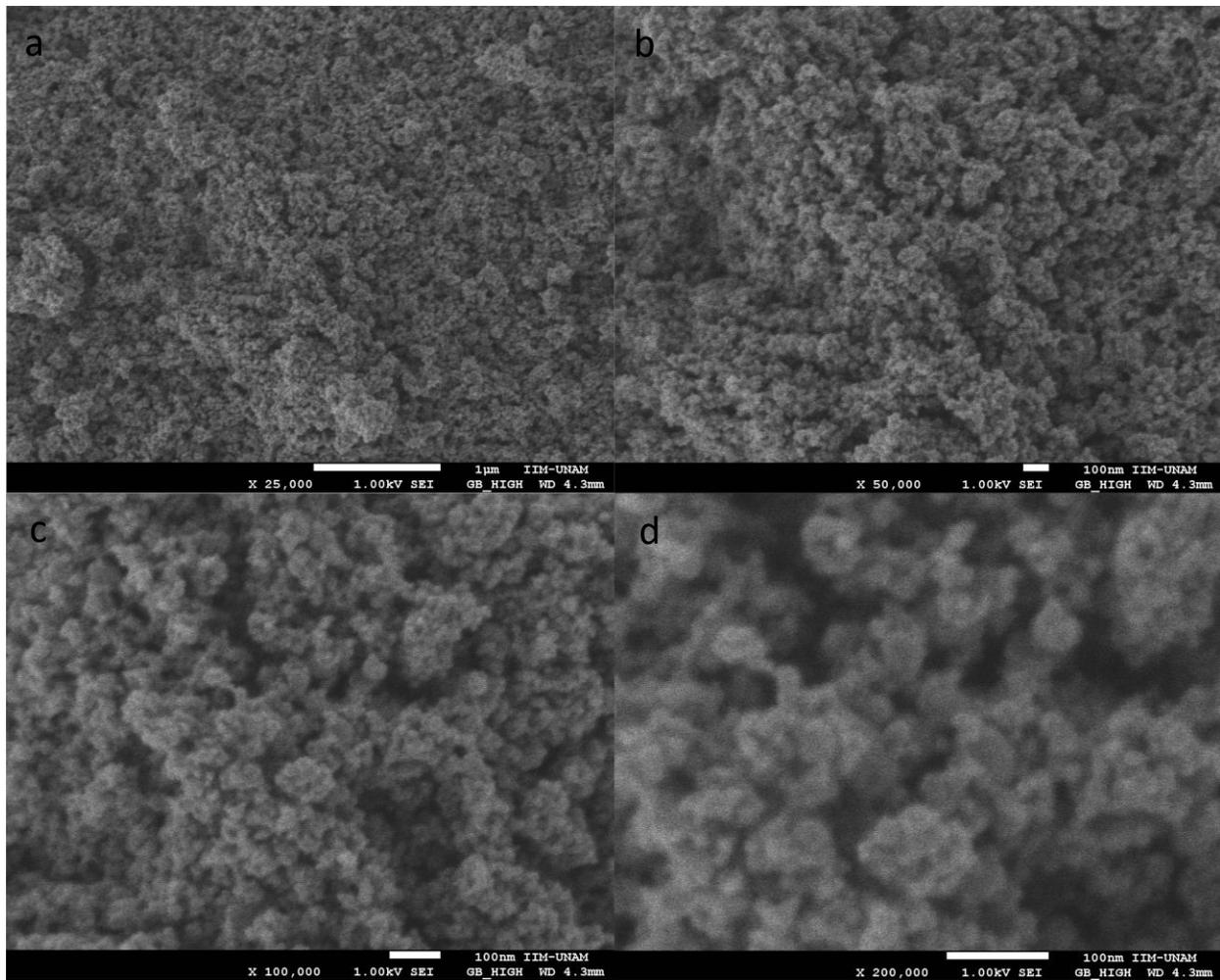


Figura 8: Imágenes de SEM con una aceleración de electrones de 1 kV de las MNP (nanopartículas de Fe₃O₄) con aumento de (a) 25,000, (b) 50,000, (c) 100,000 y (d) 200,000.

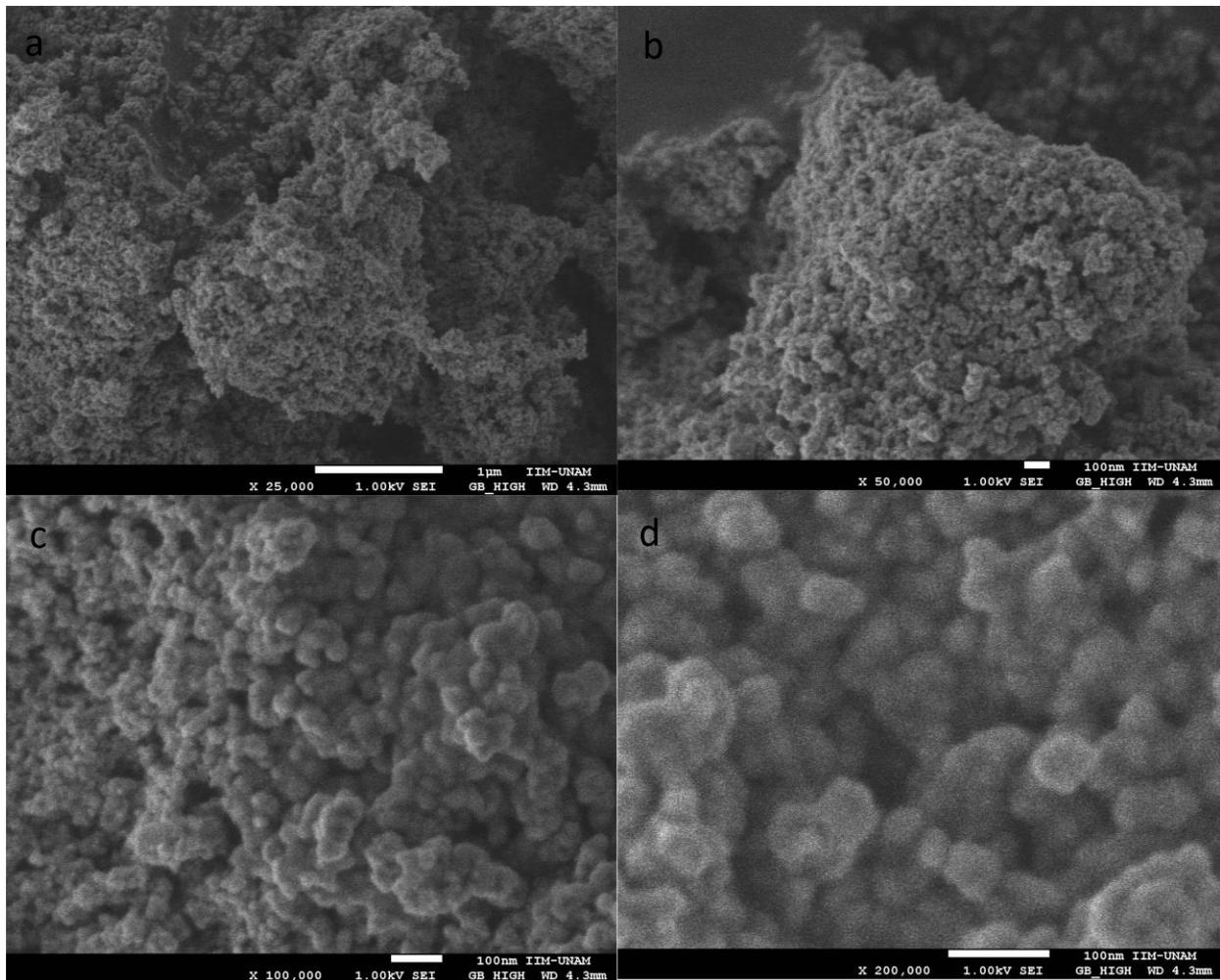


Figura 9: Imágenes de SEM con una aceleración de electrones de 1 kV de las MNP (nanopartículas de Fe_3O_4) con aumento de (a) 25,000, (b) 50,000, (c) 100,000 y (d) 200,000.

Medición de Potencial Zeta

En sistemas acuosos, las partículas de óxido de hierro están hidratadas, y los grupos Fe-OH recubren completamente su superficie. Los óxidos de hierro hidratados tienen una naturaleza anfótera [113]. Dependiendo del pH de la solución, la superficie de la magnetita será positiva o negativa, el punto isoeléctrico (IEP) se observa a pH 6.8 [79]. La superficie del óxido está cargada positivamente a un pH por debajo del PCZ y con carga negativa por arriba [114]. En la fig. 10 se

observa que el IEP de las nanopartículas de Fe_3O_4 sintetizadas se localiza entre los valores de pH (6.5-7.3) anteriormente publicados, utilizando TMAH como surfactante. [115] [116]

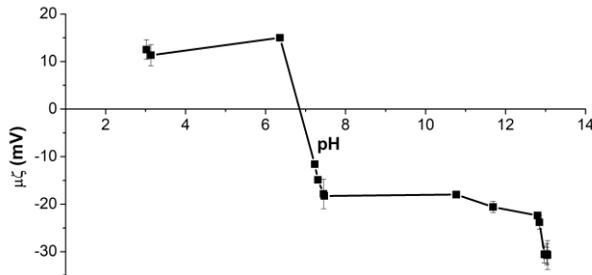


Figura 10: Localización del punto isoeléctrico (IEP) de MNP (Fe_3O_4) a través de mediciones de potencial zeta, a diferentes valores de pH en una solución de TMAH 9.3 mg mL^{-1} & 1 mM NaCl .

Características Magnéticas por VSM y Temperatura de Curie por TGA

En la figura 11a se muestra la curva de magnetización de VSM obtenido a 300 K correspondiente a las nanopartículas de Fe_3O_4 las cuales presentan una saturación de magnetización (M_s) de 76.89 emu/g al mayor campo magnético medido, una coercitividad (H_c) y remanencia magnética (M_R) prácticamente de 0 Oe y 0 emu/g y ningún ciclo de histéresis. Las nanopartículas superparamagnéticas no presentan ciclo de histéresis en la curva de magnetización con ambos remanencia y coercitividad siendo cero [117]. La falta de saturación de magnetización a campos altos es debido al efecto de partículas pequeñas y área superficial grande, lo cual lleva a spin canting. El valor de M_s es ligeramente menor (15.11 emu/g) a él reportado para Fe_3O_4 bulto (92 emu/g a temperatura ambiente) lo cual se asigna a efectos de superficie como spin canting [118].

En la figura 11b se muestra el TGA de las nanopartículas de Fe_3O_4 con un campo magnético externo, donde se observa una disminución del peso (o fuerza) cerca de $530.26 \text{ }^\circ\text{C}$ el cual se le atribuye a punto de Curie de Fe_3O_4 [119]. El punto de Curie de Fe_3O_4 es de $858 \text{ }^\circ\text{K}$ ($\sim 584.85 \text{ }^\circ\text{C}$) [120]. El punto de Curie (T_c) de nanoestructuras magnéticas es complicado. Por definición el punto de Curie es una singularidad y por lo tanto no es posible definir un T_c exacto bien definido en una nanopartícula. Cuando una o más dimensiones en un sistema son extremadamente pequeñas

(debajo de 50 nm), el crecimiento de la longitud de la correlación de spin eventualmente será limitada a la dimensión más pequeña y el sistema presentará una temperatura de transición T_c reducida siguiendo la relación de escalamiento de tamaño finito. El efecto es conocido como escalamiento finito de tamaño [40] [121].

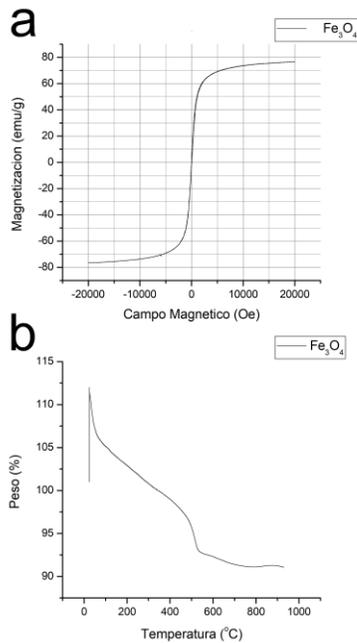


Figura 11: Curva de magnetización (a) obtenida por magnetómetro de muestra vibrante (VSM) a 300 K y determinación del punto de curie por análisis termogravimétrico magnético (b) de MNP (Fe_3O_4)

Conclusiones:

La síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4 por medio del método US-RP con las siguientes características: color negro, semiconductoras, composición química de Fe_3O_4 , cristalinas, esféricas de ~ 15 nm, anfóteras y superparamagnéticas.

Capítulo 3 : Purificación de MAP3773C

Introducción

La adsorción es convencional pero un importante proceso de separación [122]. La adsorción de moléculas orgánicas y biomoléculas en una interfase sólido/ líquido de superficies inorgánicas es un fenómeno común en la naturaleza y se dice haber influenciado el origen de la vida. Varias

industrias usan estos procesos termo/químicos incluyendo tratamientos de aguas residuales, minería, producción de comida y purificación de farmacéuticos. Usualmente la formación de enlaces covalentes y por lo tanto un cambio del estado químico del adsorbato puede ser diferenciado de la fisisorción, la cual se basa en mecanismos de unión más débiles como puentes de hidrogeno, interacciones dipolo/dipolo, dipolo/dipolo inducido o inducido dipolo/inducido dipolo. La habilidad para diseñar las superficies de materiales, las cuales pueden prevenir, facilitar o, generalmente , controlar la adsorción de biomoléculas de la fase acuosa, pueden ser aplicadas en múltiples sectores de la industria o investigación [123].

La bioseparación magnética es una tecnología en desarrollo y principalmente aplicado al campo de separación. El fundamento de este método es utilizar partículas magnéticas para unir las moléculas blanco vía ligando para formar un complejo que puede ser separado de la solución en bulto con un gradiente de campo magnético. Sus aplicaciones incluyen inmovilización de enzimas, ordenación celular, adsorción de proteínas y purificación, desprendimiento de ácido nucleico, y entrega de fármacos [124].

Recientemente, la preparación y aplicación de nanopartículas ha sido de gran interés por sus propiedades físicas y químicas inusuales debido al tamaño extremadamente pequeño y gran área superficial. Las nanopartículas no porosas pudieran satisfacer los requerimientos anteriores. Sin embargo, debido a que las nanopartículas son tan pequeñas, los procesos adsortivos pudieran ser llevados a cabo en un sistema de suspensión en agitación en vez del empaquetamiento convencional. Para facilitar la recuperación y manipulación de las nanopartículas, un método prometedor es el de incorporar magnetismo a las nanopartículas [122].

Las partículas magnéticas de tamaño nano pueden ser producidas con grandes áreas superficiales presentando una alta capacidad de adsorción para proteínas. Por lo tanto, puede ser útil sintetizar

partículas magnéticas en el tamaño nano con áreas superficiales grandes y utilizarlas como portadores adecuados para la adsorción/ desorción de proteínas [124].

La adsorción basada en adsorbentes magnéticos es ahora reconocido como una técnica efectiva y económica debido a su alta calidad, regeneración y propiedades de separación magnética [125].

Las nanopartículas de ferrita tienen una gran área superficial y presencia de fuerzas no balanceadas en la superficie ideal para la adsorción [53]. Recientemente, las nanopartículas de óxido de hierro, particularmente nanopartículas de magnetita (MNP) con la fórmula $\text{FeO-Fe}_2\text{O}_3$ o Fe_3O_4 , han emergido como adsorbentes nuevos en la nanotecnología para el tratamiento de aguas residuales y muchas otras aplicaciones como biomedicina, ciencia de materiales y ciencias biológicas [126]. La magnetita o ferrita de hierro ha sido usada para separar una variedad de sustancias como especies de metales disueltos, materia particulada, materiales orgánicos y biológicos [127].

La aplicación de las nanopartículas de magnetita se extiende desde catálisis como catalizador o acarreador de material, el uso como almacenaje de energía o media hasta implementaciones médicas como tratamiento por hipertermia, agentes de contraste o materiales acarreadores para la entrega de fármacos y el uso como adsorbente reversible en la purificación de biomoléculas. Para el procesamiento posterior en la biotecnología, biomoléculas conteniendo secuencias de péptidos, con una afinidad de unión específica al adsorbente, tal como la etiqueta His pueden ser usados para la separación de la molécula blanco de una suspensión compleja. En el caso de la etiqueta His, el acoplamiento reversible covalente de múltiples moléculas de histidina a iones divalentes como Ni_2^+ es usado como mecanismo de unión [123].

Justificación

Purificación de MAP3773c con nanopartículas de Fe_3O_4

Entre las varias técnicas de purificación, la cromatografía de afinidad de metal inmovilizado y la cromatografía de afinidad de óxido de metal han sido utilizadas para selectividad y confiable separación de proteínas con etiqueta de histidina basado en la interacción de metal de coordinación entre histidina y iones de metales de transición. En el caso de los sorbentes IMAC, el ion de metal divalente (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} o Zn^{2+}) tiene constantes de afinidad modestas y mayor estabilidad de ligando comparado con ligandos de afinidad bioespecíficos [128]. La cromatografía de metal inmovilizado ha sido considerada como uno de los acercamientos más efectivos para la separación de proteínas etiquetadas con His, lo cual está basado en la formación y disociación de los enlaces de coordinación entre el residuo consecutivo de seis histidinas (6xHis) y iones metálicos bajo diferentes condiciones [39].

Las MNPs han recibido una atención considerable por diferentes propiedades importantes que poseen: grandes proporciones superficie/volumen, alta eficiencia, y baja toxicidad. El pretratamiento de mezclas de complejos con sedimentación y filtración pueden ser eliminados usando tecnologías magnéticas. Los adsorbentes convencionales tienen diámetros en el rango de sub-micras a micras, y tienen enormes porosidades internas para asegurar una adecuada área superficial para la adsorción. La limitación de difusión dentro de las partículas porosas lleva a una disminución en la proporción de adsorción y la capacidad de disponibilidad de proteína. Por lo tanto, un adsorbente con alta capacidad y baja resistencia de difusión sería lo deseado para la adsorción de biomoléculas. Cuando se usan nanopartículas, el proceso adsortivo puede ser realizado en una suspensión en agitación en vez del empaquetamiento convencional ya que las nanopartículas presentan una disminución de alta presión. Comparado con los aislamientos convencionales, las ventajas de la separación magnética son atribuidas a su velocidad, precisión, y simplicidad. En adición, las MNP pueden ser fácilmente recuperadas y regeneradas, aun en la

presencia de contaminantes coloidales, y los problemas de abordaje de membrana en la microfiltración y los cambios de presión en cromatografías pueden ser reducidos al usar separaciones magnéticas [129].

La purificación de ligandos es una técnica donde una molécula usada como diana es inmovilizada en un soporte sólido y para separar ligandos de mezclas complejas. Sin embargo, las moléculas dianas adheridas deben tener una afinidad tan fuerte como sea posible para interactuar con las moléculas de interés. Si la molécula adherida a la superficie de las MNP posee afinidad para interactuar con el producto de interés, esto facilita la separación. Ambos mecanismos de adsorción y elución son gobernados por las propiedades superficiales tales como electrostáticas, hidrofóbicas y enlace-H entre MNP y biomoléculas. Para la adsorción, estas interacciones pueden resultar en fuerzas atractivas, mientras que, en la elución, las fuerzas repulsivas son activadas [130]. Es por esto, que nuestro agente de afinidad para histidina de la proteína recombinante con etiqueta de histidina serían las nanopartículas magnéticas.

La purificación de una proteína recombinante con etiqueta de histidina por medio de MNPs sin algún agente de afinidad es una idea atractiva, dado que se sabe que la histidina tiene cierta afinidad por metales divalentes y las MNPs poseen gran área superficial. Este trabajo permitiría explorar métodos nuevos para la purificación de proteínas con nanopartículas magnéticas sin agentes de afinidad y sin un soporte cromatográfico, generando una aportación a la biotecnología. Además, el diseñar y producir las nanopartículas magnéticas sin algún agente de afinidad favorece a la disminución en los tiempo de producción y costos.

El utilizar nanomateriales magnéticos para la purificación de dichas proteínas es un método muy viable ya que está totalmente comprobado que las proteínas pueden tener afinidad por las nanopartículas (efecto corona) en ciertas condiciones. Esta propiedad magnética se puede aprovechar para reducir considerablemente el tiempo de purificación una vez que se conozcan

las características y las condiciones óptimas para una interacción nanopartícula-proteína. La purificación de una proteína tipo Fur (afinidad por hierro) y/o con etiqueta de His, por medio de nanopartículas de hierro que se conoce que son magnéticas (bioseparación magnética), permitiría una interacción MNP-proteína y favorecer la purificación del complejo formado y decantar el resto solo por decantación magnética.

Objetivo General:

Utilizar nanopartículas de ferrita de hierro como adsorbente para el aminoácido de L-His y proteínas que presenten este aminoácido y su uso como agente de purificación.

Objetivos Específicos:

- Observar la interacción de las nanopartículas con L-histidina a distintos pH.
- Observar el efecto de la concentración de de L-His en la interacción con nanopartículas.
- Observar el efecto de la concentración de nanopartículas en la interacción con L-His.
- Observar la interacción de nanopartículas con L-His por medio de espectroscopia ATR FT-IR.
- Purificar MAP3773c con nanopartículas de hierro.
- Proponer un método de purificación de MAP3773c con nanopartículas de hierro.

Antecedentes

Purificación de Proteínas con Nanopartículas Magnéticas de Hierro

Diversas técnicas de bioseparación han sido propuestas como alternativas avanzadas a los clásicos métodos de separación: precipitación, centrifugación, cromatografías y separación de ligandos. Entre estas, la separación de ligandos es una técnica donde el blanco es inmovilizado en un soporte sólido y usado para separar ligandos fuera de la mezcla compleja. La separación de ligandos consume mucho tiempo lo cual se puede evitar con la bioseparación magnética, ya que todos los pasos para la bioseparación magnética se puede llevar a cabo en un solo tubo de ensayo [130]. Por ejemplo: Li et al. (2016) utilizo MNPs de Fe_3O_4/Cu -apatita para purificar

thioredoxina 9 con etiqueta de Histidina directo del lisado celular [39], Rashad et al. (2017) utilizo MNPs de $MnFe_2O_4-SiO_2-Ni-Salen$ para purificar la Proteína-A con etiqueta de histidina [131] al igual que MNPs de $Fe_3O_4-Histidina-Ni$ para purificar la proteína-A con etiqueta de histidina directo del extracto celular [132], Gadke et al (2016) utilizo MNPs funcionalizadas con 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano con grupos acoplados de ácido nitrilotriacético (GNTA-SPION) directamente de los cultivos celulares para purificar la proteína-A [133]. Fernández et al. (2016) utilizo nanopartículas magnéticas funcionalizadas con affitin antilisozima (MNP- H_4 -Ct) y affitin anti-IgG (MNP-D1Sso7d-DM-Ct) para purificar lisozima y anti-IgG de extracto celular de E.coli y solución de anti-IgG de plasma humano [134], Liu et al. (2017) utilizo MNPs funcionalizadas de Fe_3O_4 -arginina para purificar nattocinasa de una solución nattocinasa [129]. Guo et al. (2017) utilizo MNPs de Cu- Fe_3O_4 -CNC (donde CNC significa nano cristales de celulosa) para separar lisozima de una solución acuosa [135]. Por ultimo, Schwaminger et al. (2019) utilizo MNP desnudas para purificar GFP-6His a partir del extracto celular [136].

Hipótesis

- Ho: Alto rendimiento de purificación de Map3773c por medio de una bioseparación magnética con nanopartículas de hierro
- H1: Inexistente purificación de Map3773c por medio de una bioseparación magnética con nanopartículas de hierro.

Experimental

Caracterización de Complejo de nanopartículas de Fe_3O_4 -Histidina

La interacción de histidina con las MNP fue caracterizada por espectroscopia UV-Vis y ATR FT-IR.

Se realizaron tres series a pH 3 (Glicina-HCl 0.1 M) , 7.4 (Buffer PBS) y 11 (NH_3 0.1 M) de cinco soluciones a 60, 50, 25, 10 y 5 ppm de L-histidina y a 10 mL se le agregaron 10 mg de MNP [137].

La interacción observada al mantener la concentración de MNP constante dio pie a reducir la concentración de MNP con la menor concentración de L-histidina para observar una mejor

resolución de la interacción. Se realizaron dos series a pH 7.4 (Buffer PBS) y 11 (NH₃ 0.1 M) de cinco soluciones de 10 mL a 5 ppm de L-histidina y se agregaron 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg de MNP [138]. Las soluciones se dejaron en agitación por 24 horas a 37 °C y se leyeron en un barrido de UV-Vis de 190 a 900 nm.

Para caracterizar el sitio de interacción de las MNP con el aminoácido L-his se prepararon dos soluciones (10 mL) a pH 7.4 (Buffer PBS) y 11 (NH₃ 0.1 M) a una concentración de 5,000 ppm y se agregaron 10 mg de MNP. Las soluciones se dejaron en agitación por 24 horas a 37 °C, se separó la parte sólida (MNP-His pH 7_(s) y/o MNP-His pH 11_(s)), por decantación magnética, se dejaron secar las MNP por 3 horas en una estufa a 37 °C y se leyeron en un barrido de ATR FT-IR de 4,000 a 400 cm⁻¹ tanto las MNP-His pH 7_(s) y MNP-His pH 11_(s), como la solución sobrenadante (MNP-His pH 7_(l) y MNP-His pH 11_(l)) y la solución de L-his sin contacto con nanopartículas (His pH 7_(l), His pH 11_(l)) [139].

Obtención de MAP3773C purificada

Expresión

El proceso de expresión y confirmación de expresión es explicado por el M.C. German Ibarra Molina en su tesis de maestría (2016). En resumen, se induce la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) - pRSET-MAP3773c en LB broth usando IPTG (1 mM) como inductor, por 16 horas a 30 °C hasta obtener una densidad óptica de 0.6-0.7, el cultivo se centrifuga a 6000 rpm por 30 min. a 4 °C, se descarta el sobrenadante y se lisan los pellets (1.7 g de biomasa) por sonicación en 4.3 mL de BN Lysis Buffer (20 mM Tris, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8, glicerol 10 %, Triton X y PMSF, pH=7) [140]. El lisado se centrifuga 3 veces a 6000 rpm por 30 min. a 4 °C hasta obtener un sobrenadante claro. Para la confirmación de la expresión se precipitan las proteínas con ácido tricloroacético al 10 % (100 µL) en 85 µL de agua destilada y 15 µL de muestra, se incuba en hielo(20 min.), se centrifuga (6000 rpm por 30 min. a 4 °C) y se lava con etanol frio (1 mL al 95%) , se centrifuga

(6000 rpm por 30 min. a 4 °C), se dejan secar a temperatura ambiente, se resuspenden en 15 µL de agua destilada y se realiza electroforesis SDS-PAGE en gel al 17%. [4].

Purificación

Para la purificación se equilibraron las nanopartículas con 10 volúmenes de buffer de equilibrio del IMAC Buffer Kit Profinia™ (300 mM KCl, 50 mM KH₂PO₄, 5 mM Imidazol pH 8) o 50 mM Tris buffer pH 8 (TB8) y se incubó con 0.1 mL de extracto por 1 hora bajo agitación vigorosa. Enseguida se lava (L1 y L2) con 0.2 mL por duplicado con soluciones del IMAC Buffer Kit Profinia™, wash buffer 1 (WB1) (300 mM KCl, 50 mM KH₂PO₄, 5 mM Imidazol pH 8) y wash buffer 2 (WB2) (300 mM KCl, 50 mM KH₂PO₄, 10 mM Imidazol pH8) o con TB8 tanto L1 como L2. Finalmente, se eluye (E1) con 0.2 mL durante 24 h con buffer de elución del IMAC Buffer Kit Profinia™ (300 mM KCl, 50 mM KH₂PO₄, 250 mM Imidazol pH8) o IMAC Buffer (50 mM imidazol, 500 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄·2H₂O pH 7.5). Las purificaciones se realizaron como se menciona con anterioridad al menos que se indique lo contrario [136]. La observación cualitativa de la corona proteica restante después de la elución en la superficie de las nanopartículas se realizó en base al protocolo publicado por Docter et al. (2014) [141]. Las muestras obtenidas se analizaron por medio de una electroforesis SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) [142].

Resultados y Discusiones

Interacción de nanopartículas de Fe₃O₄ con histidina y MAP3773c

Interacción de Nanopartículas de F₃O₄ con L-histidina

La interacción electrostática juega un papel importante en el comportamiento de adsorción de moléculas zwitteriónicas como los aminoácidos y grupos hidroxilo anfóteros en óxidos de metales y es altamente dependiente en el pH. Generalmente, la unión de aminoácidos polares es

influenciado por efectos electrostáticos tales como cambio de pH y fuerza iónica de la fase líquida. Por otra parte, la formación de enlaces covalentes e hidrogeno entre aminoácidos y la superficie también es posible [139]. De acuerdo con la literatura, L-his puede estar presente en cinco diferentes formas iónicas dependientes del pH . En adición, los valores de pKa de los diferentes sitios de protonación son 1.6, 6, 9 y 14 dando lugar a las cinco formas iónicas de la histidina: H_4His^{+2} , H_3His^{+1} , H_2His^0 , $HHis^{-1}$, His^{-2} [143].

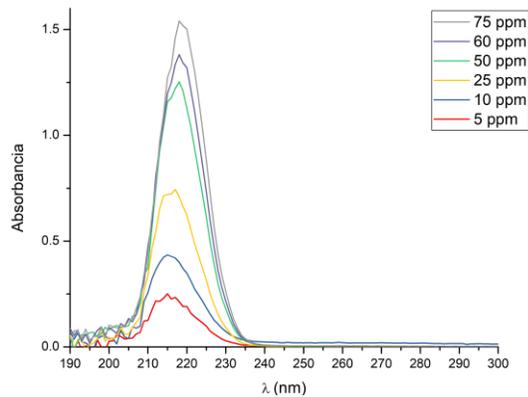


Figura 12: Espectros de curva de calibración de L-His a pH 3

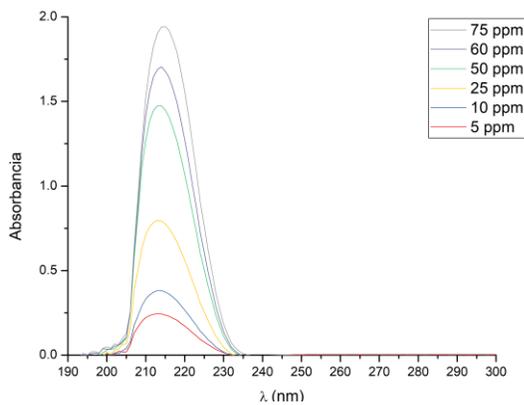


Figura 13: Espectros de curva de calibración de L-His a pH 7

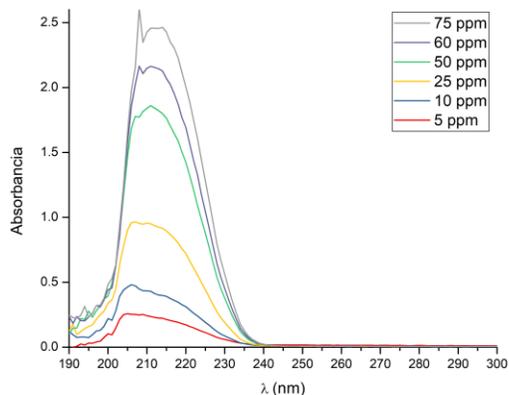


Figura 14: Espectros de curva de calibración de L-His a pH 11

En la figura 12-14 se muestran los espectros UV-Vis de la curva de calibración de L-histidina a pH 3, 7 y 11 respectivamente, dichas curvas compararan (Fig. 15-17) el efecto de la presencia de MNP a distintos pHs (3, 7 y 11). En el pH= 3 (Fig. 15) no se observa un aumento claro de la absorbancia, mientras que en los pHs de 7 y 11 (Fig. 16 y 17) se observa que existe un aumento de absorbancia de la histidina al estar en contacto con las MNP, aun cuando se realizó una decantación magnética.

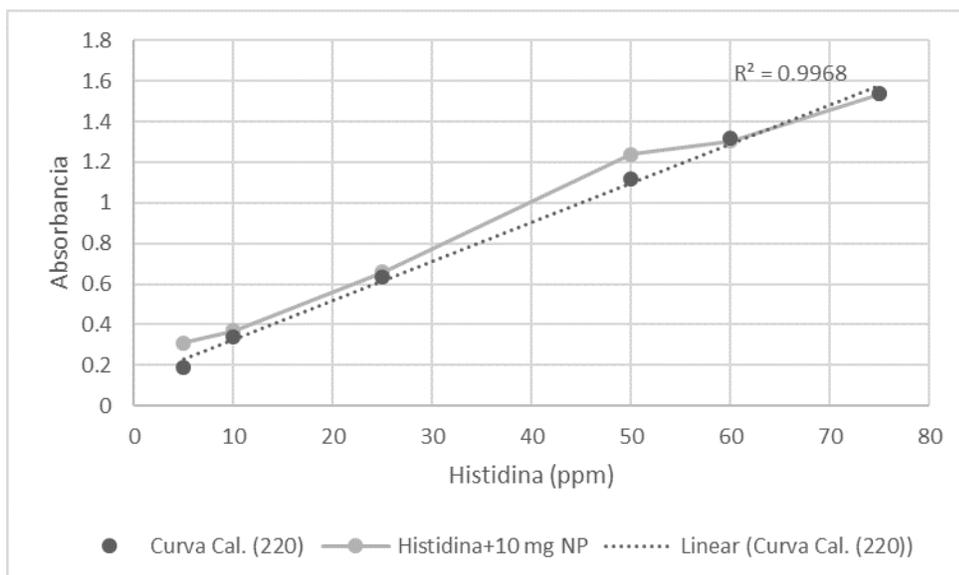


Figura 15: Curva de calibración de L-His a pH=3 y absorbancia de L-His a 5, 10, 25, 50, 60 y 75 ppm en presencia de 10 mg de MNP.

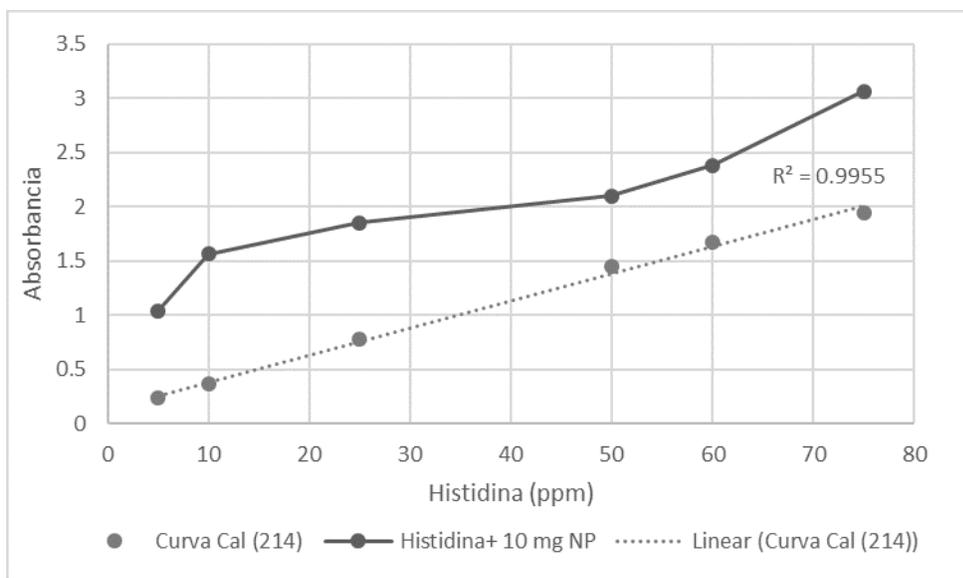


Figura 16: Curva de calibración de L-His a pH=7 y absorbancia de L-His a 5, 10, 25, 50, 60 y 75 ppm en presencia de 10 mg de MNP.

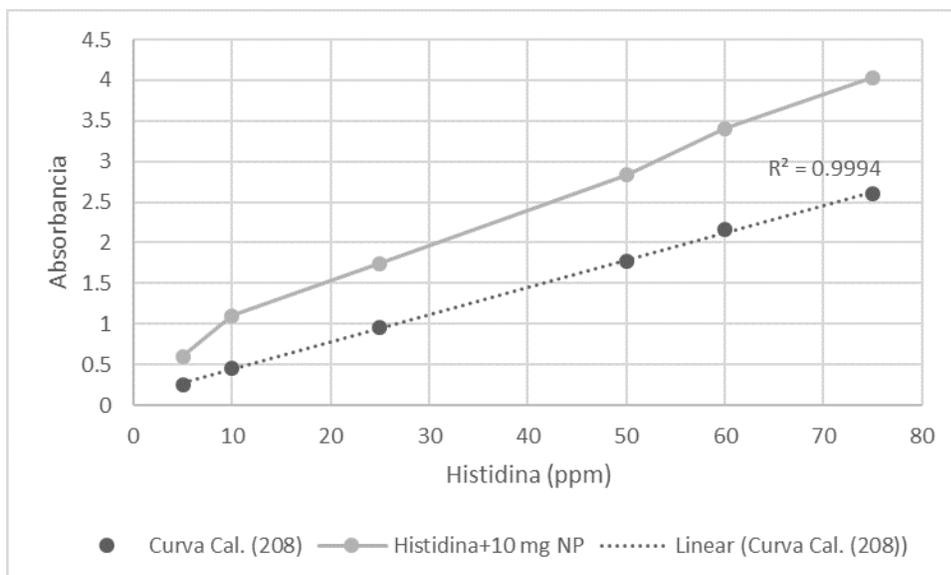


Figura 17: Curva de calibración de L-His a pH=11 y absorbancia de L-His a 5, 10, 25, 50, 60 y 75 ppm en presencia de 10 mg de MNP.

La adhesión de grupos sustituyentes en lugar de hidrógenos en una estructura básica cromófora cambia la posición e intensidad de la banda de absorción del cromóforo. Los sustituyentes que incrementan la intensidad de la absorción, y posiblemente la longitud de onda son llamados auxocromos. Al aumento de intensidad se le conoce como efecto hipercrómico y a el desplazamiento a una menor energía o mayor longitud de onda como desplazamiento

batocrómico [144]. Los espectros en la región UV de hidrocarburos aromáticos se caracterizan por tres conjuntos de bandas que se originan a partir de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$. Los compuestos aromáticos contienen una serie de picos agudos debido a la superposición de transiciones vibracionales sobre las transiciones electrónicas básicas. Así mismo, los solventes tienden a reducir, y a veces a eliminar, esta estructura fina como lo hacen ciertos tipos de sustitución [145]. En adición, en compuestos que son ácidos o bases, el cambio de pH puede tener efectos significantes en la posición de estas bandas [144]. Explicando de esta forma las diferencias entre las tres curvas de calibración y el aumento en la absorbancia.

El efecto hipercrómico observado se lo atribuimos a una interacción entre las MNP y L-His, que probablemente esta interacción ayude a suspender las nanopartículas en solución. Ya que en el pH= 3 (Fig.15) no se presentó un incremento de absorbancia y en teoría, no debería haber interacción electrostática ya que tanto las MNP y L-His tienen carga positiva a este pH. El recubrimiento de partículas con capas de adsorción provee una mejora en la resistencia contra la agregación de partículas y en medios acuosos, capas de estabilización electrostáticas, estéricas o combinados se pueden desarrollar para mejorar la estabilidad química y coloidal [146].

En adición se observan una (280 nm) y dos (260 y 320 nm) señales en los espectros de L-His obtenidos a pH= 7 (Fig. 18) y pH= 11 (Fig. 19) respectivamente con previo contacto con MNP. Estas señales no se presentaron en los espectros de la curva de calibración (Fig. 15-17). Por lo cual, este resultado es atribuido a un efecto hipercrómico y/o un desplazamiento batocrómico. Ya que, una banda de absorción débil en la región de 280 a 290 nm, que se desplaza hacia longitudes de onda más cortas cuando aumenta la polaridad del solvente, indica en definitiva la presencia de un grupo carbonilo y una banda de absorción débil próxima a 260 nm con indicios de estructura fina vibracional constituye una evidencia de la existencia de un anillo aromático [145]. Las interacciones propuestas han sido a través de los nitrógenos de las aminas (N_{am}), los nitrógenos

del imidazol (N_{im}) y los oxígenos de carboxilo (O_c). En la literatura se han realizado complejos de L-his con metales: Ag [147], $Cu^{+2}(2N_{am}2O_c, 2N_{am}N_{im}O_c$ o $2N_{am}2N_{im})$ [148] y Al^{+3} (de manera bidentada usando N_{am} y O_c o N_{im} y O_c) [149]. Tras estas interacciones se han observado la aparición de dos bandas en los espectros de UV-Vis a las longitudes de ~ 260 nm y ~ 320 nm respectivamente.

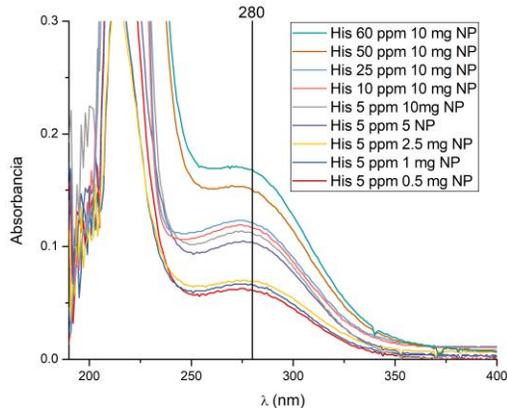


Figura 18: Espectro de L-his a pH 7 con previo contacto con MNP.

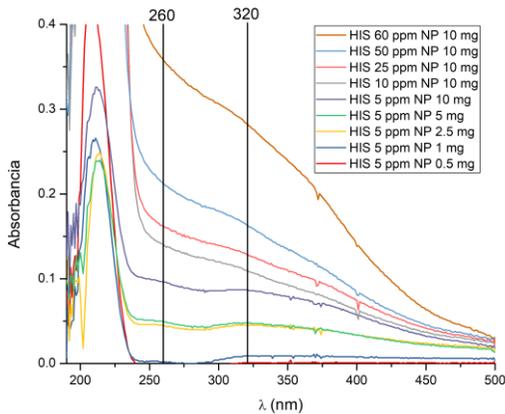


Figura 19: Espectro de L-his a pH 11 con previo contacto con MNP.

Sin embargo, también se han reportado complejos con L-his y Cu en un intervalo de pH 0-10 observando una intensa aparición y desplazamiento de una banda a 285 nm al cambio de pH. Presentando interacciones $2N_{am}2N_{im}O_c$ y $2N_{am}2N_{im}2O_c$ a un pH >7 [150]. Mientras que con el uso del péptido 6xHis en forma del complejo con Cu^{+2} [151] presento señales cerca de 320 nm para las especies observadas y un efecto hipsocrómico e hiperocrómico al ir aumentando el pH, así como también el tipo de interacción del metal con los residuos de histidina (por arriba del pH 7 siendo

2N_{im} y N⁻ nitrógenos de amidas). Otro estudio observó el complejo de Cu⁺² con distintos residuos de histidina de dos péptidos (Allo1A y Allo9A) diferentes al igual que el tipo de interacción del complejo (pudiendo ser N_{am}, N_{im}, O_c y N⁻) [152]. Esto concuerda con la formación del complejo observado para grupos carboxilos en óxidos de metal lo cual puede ser detectado por espectroscopia de IR [139].

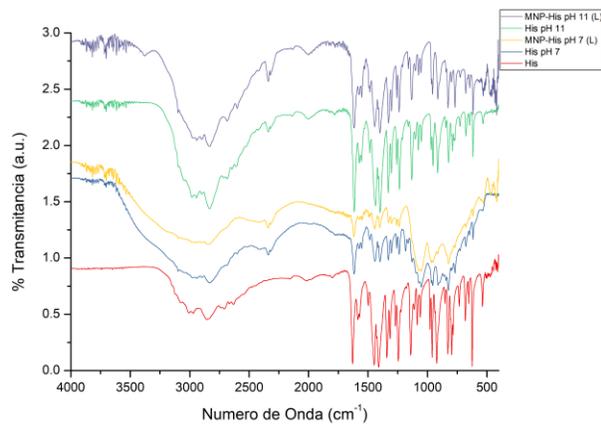


Figura 20: Espectros de IR de 400- 4000 cm⁻¹ de L-his deshidratadas a distintos pHs y las fases líquidas de L-his con previa interacción de 24 h con nanopartículas de Fe₃O₄ separadas por decantación magnética.

En la figura 20 se comparan los espectros de IR de L-his en polvo y las soluciones deshidratadas de L-his a 5,000 ppm a pH 7 y 11 donde no se observa ningún cambio o alteración obvio a causa de las nanopartículas en el espectro dentro del rango de 400-4000 cm⁻¹. Sin embargo, al reducir la escala entre 800-1700 cm⁻¹ (Fig. 21) se observan algunos cambios ligeros. Todas las soluciones deshidratadas tuvieron un corrimiento hacia el azul con respecto al espectro L-his en polvo. Ya que, un cambio en la constante dieléctrica de una solución como resultado de cambiar el pH o concentración de buffer puede causar cambios de frecuencias. De igual forma la posición de una banda de IR sugiere una correlación con la forma iónica y estas bandas pueden ser utilizadas como marcador para determinar el estado de protonación o el tipo de unión metal ion [143]. Así mismo, en la figura 21 se logran distinguir diferencias (tabla 5) entre las soluciones deshidratadas que

tuvieron contacto con nanopartículas con respecto a las que no. Estas diferencias pudieran apoyar el origen de los efectos hipercrómicos y batocrómicos discutidos en los espectros de UV-Vis fig. 18 y fig. 19, sin embargo, se requieren de más pruebas para asegurar la presencia de MNP en estas soluciones.

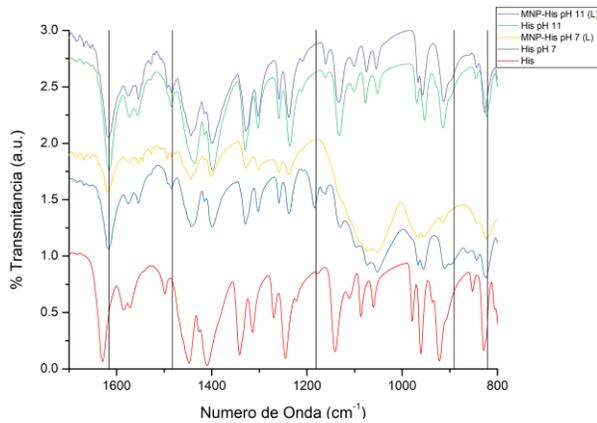


Figura 21: Espectros de IR de 800- 1700 cm⁻¹ de L-his deshidratadas a distintos pHs y las fases liquidas de L-his con previa interacción de 24 h con nanopartículas de Fe₃O₄ separadas por decantación magnética.

En la Fig. 22 se muestran los espectros de IR para las MNP y MNP que estuvieron en contacto con L-his a pH de 7 y 11 así como también sus respectivos sobrenadantes. Para las MNP-his pH 7_(s) se observa un aumento, ensanchamiento y desplazamiento de las señales correspondientes a vibraciones del anillo de imidazol y una ligera presencia, pero, ensanchamiento del grupo carbonilo. Para las MNP-his pH 11_(s) se observa una ligera presencia y ensanchamiento de las mismas señales que al pH con la diferencia en las intensidades. Esto corrobora la adsorción de L-his a las MNP a pH 11 (O_c y/o N_{am} y N_{im}) y a pH 7 con una interacción mucho mayor a N_{im} que a N_{am} y/o O_c [143] [153].

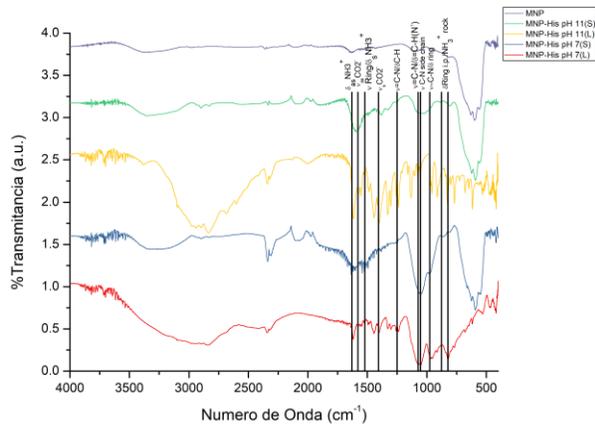


Figura 22: Espectros de IR de 400- 4000 cm^{-1} de MNP y MNP que estuvieron en contacto con L-his a pH de 7 y 11 así como también sus respectivos sobrenadantes.

Schwaminger et. al. (2015) observo la interacción de L-his con nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) en un sistema coloidal a un pH de 6. Donde investigo la influencia de la cadena lateral en la adsorción en una interfase de magnetita-agua con experimentos de incubación. El espectro de IR indico una participación del anillo de imidazol en el enlace con las MNP corroborado por XPS y de igual forma asumen una adsorción atreves del grupo carboxilo [139].

Purificación de Nanopartículas de Fe_3O_4 con MAP3773c

La corona proteica es una capa dinámica en la cual el arreglo y cantidad de proteínas son cambiables de acuerdo con las condiciones fisicoquímicas e interacción biológica [154]. Sin embargo, la interacción de las proteínas en la interfaz solido/liquido en superficies a la escala nano no está totalmente entendido y es difícil de analizar debido a la complejidad de estos sistemas [123]. Los patrones de la corona dependen de la fuente de las proteínas, tiempo de exposición, temperatura de exposición, condiciones estáticas y dinámicas, componentes del buffer y pH. De igual forma las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas también influyen como: el material, la composición, carga superficial, tamaño, curvatura de la superficie, , funcionalización, topología e hidrofobicidad. [141] [155] [154] [156]. Al menos dos condiciones son relevantes: el

medio en el que se dispersan las MNP y el medio en el cual se forma la corona [155].

La corona proteica se forma inmediatamente cuando las MNP se ponen en contacto con el fluido biológico. [154]. Se ha observado que el equilibrio de adsorción se alcanza después de periodos de tiempo cortos ya que cantidades comparables de proteína se enlazan después de 5 minutos de incubación y 2 días bajo las mismas condiciones de incubación [157]. Por lo cual se consideró que 1 hora sería tiempo suficiente para generar el equilibrio.

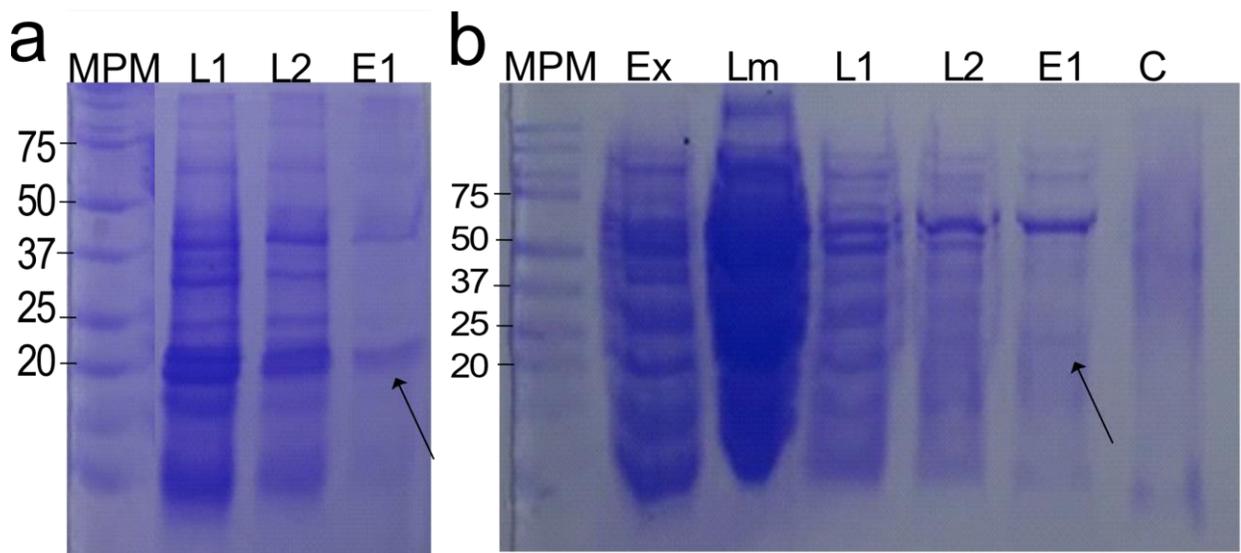


Figure 23: a) Electroforesis en gel de SDS-PAGE de purificación de MAP3773C por medio de NPM a partir de un extracto celular utilizando las soluciones del IMAC buffer Kit Profinia™. b) Duplicado. MPM (Marcador de peso molecular), Ex (Extracto), Lm (Lavado muerto), L1 y L2 (Lavado 1 y 2), E1 (Elución1) y C (corona presente después de la elución)

En figura 23a se muestra una purificación realizada con los buffers del IMAC Buffer Kit Profinia™. En los lavados (L1 y L2) se muestra como la mayoría de las proteínas se desorben de las nanopartículas incluyendo la proteína de interés. Una de las estrategias de la cromatografía IMAC es remplazar los enlaces de coordinación de las subunidades de histidina a los iones de hierro por moléculas de imidazol [136]. Por lo cual los lavados contienen una baja cantidad de imidazol (en comparación con el buffer de elución), esta razón pudiera ser una de las razones principales de la desorción de la mayoría de las proteínas en los pasos de lavado. De igual forma los buffers son a

base de fosfato, los iones de fosfato tienen alta afinidad hacia los óxidos de hierro lo cual genera enlaces de complejos fuertes [157]. Siendo esto otra razón por la cual en los lavados hay desorción de gran cantidad de proteínas incluyendo la de interés.

En el carril E1 de la figura 23a se muestra una proteína cercana al peso de 25 KDa que probablemente podría ser MAP3773c recombinante la cual pesa 20.6 KDa. La corona proteica dura consiste en una o varias capas proteicas las cuales se unen de manera dinámica en la superficie de la nanopartícula. Encima de esta corona dura, puede existir una corona suave, la cual consiste en una capa proteica que tiene intercambio rápido ya que están asociadas de manera muy débil [141]. La corona dura contiene proteínas de alta afinidad en la superficie de las MNP [154]. Por lo cual este carril nos sugiere que las MNP bajo las condiciones utilizadas puede generar una adecuada purificación, ya que en la corona dura se encuentra la proteína de interés unida con alta afinidad. Sin embargo, en la figura 23b se observa un duplicado en donde la proteína cercana a los 25 KDa se observa muy tenue indicada por una flecha, al igual que muchos contaminantes. Esto nos da información de que el periodo de incubación pudiera ser demasiado generando una corona dura más densa que la suave ya que la remoción de una proteína implica el movimiento de muchas otras [158], agregándole a esto la temperatura de incubación no fue controlada. Lo cual nos indica que en este sistema la temperatura influye en la formación de la corona por efectos de movilidad, posiblemente por efectos similares a los de Vroman, lo cual consiste en adsorptividad competitiva donde proteínas con alta movilidad arriban primero y son desplazadas después con proteínas con menos movilidad que tienen más afinidad por la superficie [159]. Lo cual nos dice que el sistema utilizado a cierta temperatura genera una corona suave la cual puede ser separada por lavados [154] dejando como corona dura la proteína de interés a un tiempo suficiente de 1 hora de incubación.

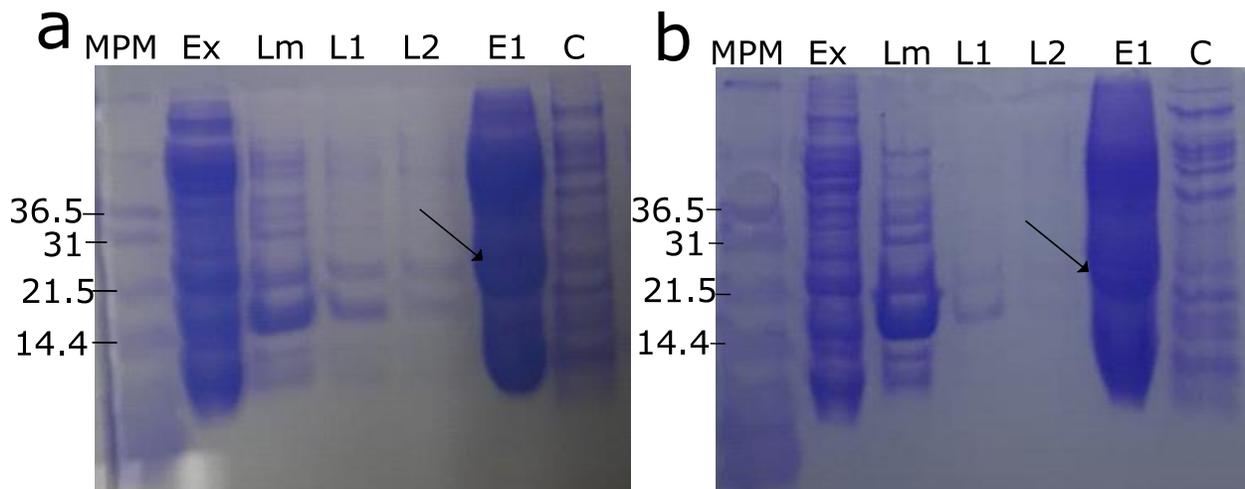


Figure 24: a) Electroforesis en gel de SDS-PAGE de purificación de MAP3773C por medio de NPM a partir de un extracto celular utilizando como equilibrio y lavados la solución tris buffer pH 8 y como elución IMAC Buffer (50 mM imidazol, 500 mM NaCl, 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 7.5). b) Duplicado. MPM (Marcador de peso molecular), Ex (Extracto), Lm (Lavado muerto), L1 y L2 (Lavado 1 y 2), E1 (Elución1) y C (corona presente después de la elución)

Cambiando las condiciones del buffer juegan un gran papel en la fuerza de interacción con las nanopartículas y el péptido 6xHis. Blank-Shim et al. (2017) demostró que la adsorción de homo-hexadimeros de his (6xHis) a nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 muestra una gran influencia en el ambiente (sistema de amortiguación) principalmente en las características electroestáticas de la superficie de la MNP. Por lo cual las condiciones del buffer nos permiten afinar la interacción entre el péptido con las MNP [160]. Schwaminger et al. (2019) señalo que, dentro de distintos buffers, el buffer Tris 50 mM genero una mayor afinidad entre las MNP con una proteína etiquetada con 6xHis [136]. El pH se decidió en base al estudio de Schwaminger et al. (2019) donde en el buffer Tris a pH 7 sus NPM adquieren una carga negativa, y en base al IEP de nuestras NPM a pH 8 se asegura una carga superficial negativa.

En la figura 24 se muestra una purificación realizada con TB8 como buffer de equilibrio, L1 y L2 e IB7.5 como elución. Comparando el Ex con el Lm se observa que la mayoría de las proteínas se adsorben a las NPM. La falta de especificidad de la adsorción de únicamente la proteína de interés pudiera ser debido a la falta de abundancia de esta, ya que las proteínas en mayor cantidad son

las primeras en interaccionar con la superficie de las MNP [154]. Indicando que se requiere tener la proteína de interés en mayor cantidad para purificarla de manera más eficiente. Sin embargo, en los lavados se desorden ciertas proteínas dentro de las cuales se puede considerar la MAP3773C. La corona suave está formada por proteínas con baja afinidad las cuales pueden ser despegadas por lavados [154]. Sin embargo, al lavar con soluciones libres de proteínas se pierde el equilibrio generado de las proteínas con mayor afinidad obligando a un reequilibrio y subsecuente disociación y difusión al medio. Esto como consecuencia directa de la ley de acción de masa, generando un desprendimiento de proteínas adheridas como corona [161]. Esto explicando la disociación de la proteína de interés en los lavados (los cuales no contienen imidazol) , aunque esta pueda ser eluida con los buffers de IMAC Buffer Kit Profinia™ que si contenían imidazol.

La elución muestra cómo se desorbe una gran cantidad de proteínas, a pesar de ello, en las nanopartículas aún existe una corona después de la elución. Esta afinidad por una gran variedad de proteínas puede ser debido a que, la molécula tris que contiene un grupo amina el cual puede cargarse positivamente y por lo cual interactuar con cargas negativas [123], de esta forma favoreciendo a la adsorción tris en la superficie negativa de las NPM y subsecuente adsorción de otras proteínas que no son las de interés. Ya que se ha observado que distintos aminoácidos se adsorben a la superficie de MNP y esta adsorción depende fuertemente de las características electroestáticas que pueden ser manipuladas por las condiciones del buffer [160]. De igual forma la contaminación de proteínas contenidas en la elución puede ser debido a insuficientes pasos de lavados de proteínas no adsorbidas [141], o proteínas de la corona suave las cuales de igual forma pueden ser desorbidas por pasos de lavados como se ha mencionado anteriormente. Dada la adsorción observada de gran cantidad de proteínas bajo las condiciones probadas en el buffer a

base de Tris se pudiera realizar una purificación donde la proteína de interés se localice en la corona suave y la cantidad de pasos a realizar pudieran ser disminuidos.

En adición, la corona proteica de las nanopartículas se ve afectada por las condiciones dinámicas del fluido ya que se ha observado una diferencia en las coronas formadas en incubaciones en condiciones estáticas [154]. Las condiciones que se deben afinar en los pasos de purificación realizados sin cambiar las soluciones utilizadas basándonos en lo visto previamente son: la movilidad del fluido (dinámica de incubación), temperatura, concentración de proteína de interés y la cantidad de lavados. Ya que se ha demostrado que a pH 8 las MNP pueden adsorber la proteína de interés en la corona dura y eluirla en el paso de elución.

Conclusiones

En este trabajo, las nanopartículas de magnetita sintetizadas por el método de US-RP con un tamaño de cristal de ~ 15 nm, y un comportamiento superparamagnético se utilizaron como agentes de purificación para la proteína MAP3773C con 6xHis y mostraron un potencial para ser utilizadas como una herramienta eficiente y efectiva para la purificación de una proteína recombinante con etiqueta 6xHis. Ya que se comprobó la adsorción del aminoácido a las MNP y de proteínas dentro de un extracto celular. De igual forma la elución de MAP3773C con 6xHis en mayor cantidad que otras proteínas en solución.

Capitulo 4 : Fotocatálisis de Nitrobenceno

Introducción

Recientemente, los nanomateriales han sido sugeridos como alternativas eficientes, costo-efectivos y ambientalmente amigables de los materiales para tratamientos existentes, desde los puntos de vista de ambos conservación de recursos y remediación ambiental [162]. Los semiconductores basados en óxido de hierro han demostrado ser materiales prometedores para aplicaciones como fotocatálisis y fotoelectrocatalisis en los campos de remediación ambiental y generación de combustible solar. Un gran número de publicaciones científicas analizando la actividad foto catalítica de ferritas pueden ser encontradas en la literatura. Las nanopartículas de ferritas espinelas son materiales atractivos para la decoloración foto catalítica y degradación de contaminantes orgánicos debido a su ausencia de toxicidad, fácil síntesis y disponibilidad de precursores [163].

El interés creciente en MNPs en la remediación ambiental está basado en los méritos de superparamagnetismo, gran área superficial, capacidad de remoción de contaminante alta, ruta corta de difusión, reactividad rápida, bajo costo, separación magnética fácil y rápida, y modificabilidad de superficie [126]. Debido a su carácter magnético inherente y su insolubilidad en un amplio rango de solventes una separación rápida y sin esfuerzo alguno es posible usando un imán externo [164]

Las aplicaciones comunes de los nanomateriales de óxido de hierro en aguas contaminadas puede ser dividido en dos grupos: (a) tecnologías las cuales usan nanomateriales de óxido de hierro como un tipo de nanosorbente o portador de inmovilización para mejorar la eficiencia de eliminación (referido como tecnologías de inmovilización/ adsortivos). (b) aquellas en donde se utilizan los nanomateriales de óxido de hierro como fotocatalizadores para descomponer o convertir los

contaminantes a una forma menos toxica (p.ej. tecnologías de fotocatalisis). Sin embargo, debería ser resaltado que varias tecnologías pueden utilizar ambos procesos. Los nanomateriales de óxido de hierro son prometedores para el tratamiento de aguas residuales a escala industrial, debido a su bajo costo, fuerte capacidad de adsorción, fácil separación y buena estabilidad [162].

Las ferritas pueden actuar como fotocatalizadores para la oxidación de compuestos, reducción de compuestos con el grupo nitro, hidrogenación de alcanos, degradación de colorantes y contaminantes orgánicos [53]. Hay nanomateriales de óxido de hierro que han sido ampliamente utilizados como fotocatalizadores, pero se observa una disminución de su uso frecuentemente debido a que la recombinación de la carga del hueco-electrón en la superficie del óxido es tan rápida como de nanosegundos [162]. La introducción de irradiación de ultrasonido ha demostrado ser un método simple para asistir la preparación eficiente del catalizador de MNPs de Fe_3O_4 con el método de co-precipitación en reversa. Wang et al. (2010) observó una mejora significativa en la actividad catalítica que se atribuye al menor tamaño, mayor área superficial y mejor dispersabilidad de las MNPs de Fe_3O_4 , las cuales son alcanzadas por la radiación de ultrasonido en la preparación de MNPs de Fe_3O_4 . Así mismo observó que la temperatura, concentración de NH_3OH y proporción de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ en la síntesis influye en la actividad catalítica. [60]

Justificación

Fotocatalisis de nitrobenceno con Fe_3O_4

Las tecnologías convencionales para el tratamiento de agua que están disponibles hoy en día tales como adsorción o coagulación, no eliminan completamente ni destruyen los contaminantes. La tecnología de adsorción la cual está categorizada bajo las técnicas físicas son un tratamiento prometedor para la remoción de contaminantes debido a su eficiencia, simplicidad, baratos y no son afectadas por toxicidad [41]. La adsorción no destruye los contaminantes orgánicos, sino que transfiere los contaminantes de un medio a otro. Si la destrucción completa es requerida,

tratamientos alternativos tales como oxidación química o reducción son utilizados [52]. La integración de los procesos de adsorción y fotocátalisis puede llevar a varios beneficios para el tratamiento de aguas residuales. Tales procesos híbridos no solo preservan todas las características interesantes de sus componentes individuales, sino que también supera serios inconvenientes de cada técnica cuando operados individualmente, de esta manera mejorando la eficiencia de remoción total [41] Las MNP y sus híbridos son candidatos bastante atractivos para adsorbentes de bajo costo para contaminantes orgánicos e inorgánicos de aguas contaminadas debido a su reusabilidad, fácil separación magnética, alta eficiencia de remoción, alta área superficial, y cinéticas rápidas. La degradación foto catalítica de contaminantes tóxicos orgánicos en sistemas fotocatalíticos de compuestos de óxido de hierro magnéticos—semiconductores puede romper con la convención de solo utilizar semiconductores con baja actividad bajo luz visible y los retos en el reciclaje del fotocatalizador de los productos finales [52].

Objetivo General:

Utilizar nanopartículas de ferrita de hierro como adsorbente y fotocatalizador en presencia de luz UV para la foto degradación de nitrobenceno y observar el perfil de degradación.

Objetivos Específicos:

- Evaluar actividad fotocatalítica de nanopartículas de ferrita de hierro sintetizadas por el método US-RP
- Evaluar el efecto de la concentración de nanofotocatalizador para la fotodegradación de nitrobenceno a 15 ppm a pH neutro.
- Evaluar el efecto del pH inicial de la solución con nitrobenceno a 15 ppm en la actividad fotocatalítica del nano fotocatalizador.
- Observar los productos de degradación de la reacción fotocatalítica por medio de GC-MS.

Antecedentes

Fotocatálisis con nanopartículas magnéticas de Hierro.

Nanopartículas de Fe_3O_4 han sido utilizadas como fotocatalizadores para: azul de metileno, rojo de metilo, rojo Congo, división de agua, naranja de metileno, Levofloxacin, rodamina B y Cr (VI) [165] [57] [166] [167] [168] [169] [170] [171] [172] [173]. Además, las mejoras en la eficiencia de la fotodegradación de moléculas orgánicas en sistemas UV/nano- Fe_3O_4 pueden ser atribuidas a la rápida transferencia de electrones fotogenerados resultando en una efectiva separación de los electrones y huecos. Los huecos por sí solos son fuertes oxidantes. Pueden oxidar OH^- y H_2O que están adsorbidos en la superficie de Fe_3O_4 , permitiendo la formación de radicales libres OH. El radical de OH combinado en la superficie de Fe_3O_4 es un fuerte oxidante y no solo oxida compuestos orgánicos adyacentes, sino que también se difunde en la solución y oxida los compuestos orgánicos. Después de una serie de procesos oxidativos, los compuestos orgánicos finalmente pueden ser convertidos en productos finales inocuos como, CO_2 , H_2O and NH_3 [57].

Hipótesis

- H_0 : Las nanopartículas de hierro fotocatalizan la degradación de NB
- H_1 : Las nanopartículas de hierro no fotocatalizan la degradación de NB

Experimental

Experimentos de fotocatálisis

Degradación de Nitrobenceno

Los experimentos de foto degradación se llevaron a cabo en un reactor fotoquímico Rayonet modelo RPR100, el cual se modificó para tener agitación magnética. La degradación de nitrobenceno se realizó en una celda cilíndrica de cuarzo con un volumen final de 250 ml de nitrobenceno a 15 ppm a un pH inicial de 2, 7 o 10 y cierta concentración de nanopartículas (50 ppm, 100 ppm o 150 ppm) bajo irradiación UV con lámparas UV de 254 nm o 575 nm a temperatura de 25 grados centígrados, la temperatura fue controlada por recirculación de la

solución en un condensador Liebig. Se tomo muestra a los tiempos 0, 20, 40, 60, 90 y 120 min, las nanopartículas empleadas se separaron de la muestra por medio de separación magnética. El % de degradación se midió por medio de espectrofotometría de UV-Vis, con el equipo UV-Vis DR 6000, HACH, a la longitud de onda de 265 nm (banda característica del nitrobenzeno) [174].

El consumo específico de energía (SEC) se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$SEC = (L * NP * t/m)$$

L= número de lámparas, NP= poder nominal de las lámparas (KW), t= tiempo para el máximo porcentaje degradado de nitrobenzeno (h) y m= masa de NB degradado (kg), calculado de la concentración inicial de NB y la concentración de NB a tiempo "t" [175].

Identificación de Intermediarios de Reacción por GC/MS

Para identificar los intermediarios de degradación de la degradación por fotocatalisis de nitrobenzeno, 50 ml de muestra fue extraído con diclorometano por duplicado (5 ml cada vez). La humedad en ~ 10 mL de extracto fue removida por ~4 g de sulfato de sodio anhidrido (Na₂SO₄), luego los solventes se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0.2 µm, y los filtrados se analizaron para detectar NB e intermediarios por cromatografía de gases/ espectroscopia de masas (GC/MS) [176]. Los datos de GC/MS fueron obtenidos por medio de un Thermo Scientific TRACE 1310 (GC) y Thermo Scientific single quadrupole ISQ LT (MS), con una columna modelo TG-SQC (30 m × 0.25 mm diámetro interno, 0.25 µm grosor de película). La temperatura del detector fue 240 °C, la temperatura del inyector fue de 250 °C, la temperatura de la línea de transferencia de 250 °C, la temperatura del horno empezó a 70 °C por 3 min., incrementando a una razón de 40 °C/min. hasta 280 °C, manteniendo esta temperatura durante 7 min. Helio fue usado como gas acarreador, a un flujo de 1 mL/min. El porcentaje de los productos de degradación detectados fue calculado usando el área bajo la curva de los picos del cromatograma correspondientes a NB y los

nitro fenoles (NPs) en proporción al %NB detectado por espectroscopia UV-Vis. El porcentaje de los intermediarios de reacción detectados es la suma de estos.

Resultados y Discusiones

Fotodegradación de Nitrobenceno por nanopartículas de Fe_3O_4

Para observar la concentración más efectiva de MNP para la fotocatalisis de NB (15 ppm), estas fueron variadas en un rango de 50-150 ppm. La degradación (Fig. 25) en porcentaje de la fotocatalisis en las concentraciones de 50, 100 y 150 ppm fueron 44.48, 63.25 y 42.42 respectivamente. El incremento de fotocatalizador no mejoro la degradación de NB. Con el aumento de concentración de catalizador, la turbidez de la suspensión, dispersión de luz y aglomeración de partículas sólidas aumenta. Como resultado, un efecto de ocultación del exceso de partículas ocurre lo cual enmascara algunas partes de la superficie fotosensible. Por lo tanto, la profundidad de penetración de los fotones disminuye y menos partículas catalizadoras pueden ser activadas. Por ende, la producción de radicales hidroxilos y la eficiencia de degradación disminuye [177]. Esta disminución también podría ser debido a la recolección de radicales reactivos por especies concentradas de hierro ($Fe^{2+} + OH^{\bullet} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{-}$) las cuales reducen la cantidad de $\bullet OH$ y causan que la eficiencia de degradación disminuya [178].

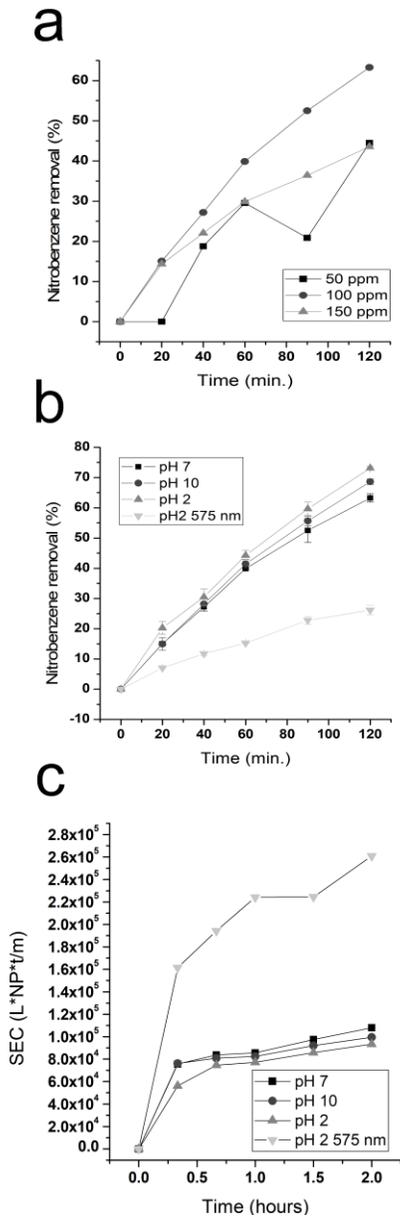


Figure 25: Fotocatálisis de nitrobenceno a 15 ppm y 25 C y lámparas de UV a 254 nm a menos de que se especifique a) a una concentración de MNP (Fe_3O_4) variando de 50 ppm (■), 100 ppm (●) y 150 ppm (▲) a Ph 7, b) variando el pH inicial de 2 (▲), 7 (■) y 10 (●) a 100 ppm de MNP y a pH 2 con luz de 570 nm (▼), c) Consumo específico de energía de la reacción de 0 a 2 horas.

El pH de la solución, el punto de carga cero y la naturaleza del contaminante también pueden influir en la distribución de las moléculas contaminantes. NB tiene un valor de pKa de 3.98 donde la forma aniónica predomina al incrementar el pH de la solución y por consecuencia, sus moléculas pueden ser atraídas con mayor facilidad a la superficie del catalizador a un pH debajo de su punto de carga cero [179]. En este sentido esperando un mayor % de degradación debajo del PZC de las

MNP con el NB en su forma aniónica. La fig. 25b ilustra la remoción de NB en porcentaje (%) al variar el pH inicial de la solución. Para el pH de 2 (▲), 7 (■) y 10 (●) la degradación observada fue 73.13, 63.25 y 68.64 % respectivamente. Adicionalmente, el pH final de estas reacciones fue ~3.8, ~7 y ~8 para la solución acida, neutra y básica respectivamente. Las nanopartículas de magnetita son moléculas anfóteras que tienen mejor dispersión en medios acuosos por arriba o debajo de su pH_{pzc} (6.5 - 7.3) previniendo la aglomeración como ya se ha mencionado. MNP tienden a agregarse cerca del pH_{pzc} , esto disminuye la disponibilidad de sitios activos en la superficie, [180] explicando la degradación menos efectiva a pH neutro y el aumento en el porcentaje de degradación en la solución acida y básica. Para asegurar que se lleva a cabo una mejor dispersión en la solución acida con respecto a la básica se midió el tiempo requerido para remover las nanopartículas de la solución con un campo magnético externo, determinando una diferencia una diferencia no apreciable en ninguna de las dos soluciones (datos no mostrados), sugiriendo que el rol de la dispersión en la mejora de las propiedades fotocatalíticas de las MNP en condiciones acidas pudiera no ser significativo. Sin embargo, las MNP poseen características superparamagnéticas lo cual significa que las nanopartículas tienen un solo dominio, como consecuencia cada cristalito tienen su propio momento magnético [181]. La investigación de efectos de campo magnético (MFE) en sistemas de reacciones heterogéneas, fotocátalisis en particular, es un tanto limitada, por lo cual aún hay debate en la reproducibilidad de los MFE así como también elucidar el mecanismo [182]. Sin embargo, se ha predicho que el comportamiento del hueco/electrón y radicales pueden ser afectados por la fuerza de Lorentz en el campo magnético, lo cual puede influenciar el desempeño del proceso fotocatalítico. La investigación de magnetoquímica demostró que el campo magnético tiene un efecto en las reacciones de radicales libres, e influencia las distribuciones de intermediarios y productos de la reacción [183]. En adición, Xie et al. (2013) propuso por primera vez el posible mecanismo de una automejora en la

actividad fotocatalítica por un efecto de campo magnético originado por el mismo fotocatalizador [184], y Feng et al. (2019) reportó que una mejora en la actividad fotocatalítica de $\text{BiOI}/\text{Mn}_x\text{Zn}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4$ pudiera ser debido a efectos de campo magnético de fotocatalizadores magnéticos y la mejora en la habilidad de absorción de luz [185]. Siendo posible que la diferencia en la degradación entre la solución ácida y básica es originado por un MFE y/o la distribución de los intermediarios de reacción. Por otro lado, la actividad de la superficie del catalizador incremento en un pH ácido debido a un incremento en la proporción de radicales hidroxilos generados debido a que estos se forman más fácilmente a pHs bajos [49]. Adicionalmente, a un pH bajo la atracción superficial entre el contaminante y la nanopartícula es más fuerte, generando radicales libres más eficiente, y posiblemente teniendo un rol del MFE en este incremento. Esto explica la actividad fotocatalítica de las MNP Fe_3O_4 a los diferentes valores de pH evaluados.

Debido a la absorbancia cerca del rango de la luz visible entre 300-517 nm (2.42-4.12 eV), evaluamos la actividad fotocatalítica en presencia de luz visible a una longitud de onda de 575 nm (2.16 eV) a las condiciones donde se observó una mayor remoción nitrobenzeno. Bajo estas condiciones observamos una remoción del 26 % la cual es menor que todas las reacciones en presencia de luz UV de 254 nm. Esto como consecuencia de su coeficiente de extinción más bajo a 575 nm, ya que los fotocatalizadores con coeficientes de extinción mayores requieren una menor cantidad de concentración de catalizador [186].

En la fig. 25c se muestran los resultados del consumo energético específico. El menor consumo de energía para degradar 1 Kg de NB se alcanzó al pH de 2 (triángulo), con un valor de 9.3×10^{-5} KW.h/kg de NB seguido por el pH 7 (■), 10 (●) y 2 con lámparas de 575 nm (▼) con valores de 1.1×10^{-5} , 9.9×10^{-4} y 2.6×10^{-5} KW.h/kg de NB respectivamente.

Comparamos el fotocatalizador TiO₂/SiO₂/NiFe₂O₄ (1000 ppm) usado por Li et. al. (2011) para la degradación de 50 ppm (100%) de NB en 5 horas activado con una lampara de 253.7 nm [187], dado que nosotros usamos una fuente de luz similar y obtuvimos una degradación de 73.13 % de NB a 2 horas con el fotocatalizador de MNP a 100 ppm y pH 2, obteniendo una degradación efectiva en un menor tiempo. Así mismo, el uso de fotocatalizadores de ferritas como MnFe₂O₄(200 ppm), MgFe₂O₄(200 ppm) [81] and ZnFe₂O₄ [188] en la literatura para la degradación de NB fue de 90%, 85% and 73% respectivamente en 4 horas mientras que nuestra ferrita sintetizada (FeOFe₂O₃) degrado 73.13% en 2 horas, el uso de menor de este fotocatalizador hizo la reacción más efectiva. Estos resultados muestran un nuevo, efectivo y de fácil síntesis, fotocatalizador para la foto degradación de NB presentando un mejor o similar % de remoción que la mayoría de las reacciones de fotocátalisis realizado a condiciones parecidas (tabla 4).

Tabla 4. Comparación de diferentes fotocatalizadores para la degradación de nitrobenzeno (NB)

Fotocatalizador	Concentración	Radiación	Solución	NB Conc.	Degradación	Referencia
AuNPs/HPW/TiO ₂ -NTs	200 mg/L	Visible Light	Agua	40 ppm	4 h 0.0078 K _{app}	[189]
1% TiO ₂ /Li, Pr: Y ₂ SiO ₅	1.5 g/L	TFL	Agua residual	5 ppm	4 h 97.08%	[190]
TiO ₂ -SWCNT	0.1 g	365	Agua	50 ppm	4 h 100%	[191]
Glass Plate (0.5 wt.%)Ti _{1-x} Fe _x O ₂₋₆	4 porta objetos	320-500	Agua	2.51 x 10 ⁻⁴ M	4 h 88.45%	[192]
TiO ₂	0.1 M	250-400	Agua	50 ppm	0.5 h 42%	
TiO ₂ -Arginina*	0.1 M, 3x10 ⁻² M *	250-400	Agua	50 ppm	0.5 h 62 %	[42]
TiO ₂ -Arginina*	0.1 M, 3x10 ⁻² M *	250-400	Agua+ Ph 50 ppm	50ppm	0.5 h 84 %	
SrFeO ₃₋₆	1 g/L	MVL	Agua	50 ppm	6 h 99%	[193]
MnFe ₂ O ₄	200 ppm	280-450 nm	Agua	50 ppm	4 h ~ 90%	[81]
MgFe ₂ O ₄	200 ppm	280-450 nm	Agua	50 ppm	4 h ~ 85%	
TiO ₂ /SiO ₂ /NiFe ₂ O ₄	1000 ppm	253.7 nm	Agua	50 ppm	5 h 100%	[187]
TiO ₂				50 ppm	4 h 77 %	
ZnFe ₂ O ₄		UV	Agua	50 ppm	4 h 73 %	[188]
ZnFe ₂ O ₄ -TiO ₂				50 ppm	4 h 70 %	
1% grafito TiO ₂	200 ppm	MVL	Agua	50 ppm	4 h 96 %	[194]
(1 wt. % Co)-TiO ₂	100 mg/L	320-500 nm	Agua	2.52 x 10 ⁻⁴ M	4 h 81.03%	[195]
(1 wt. % Ni)-TiO ₂	100 mg/L	320-500 nm	Agua	2.52 x 10 ⁻⁴ M	4 h 78.49%	

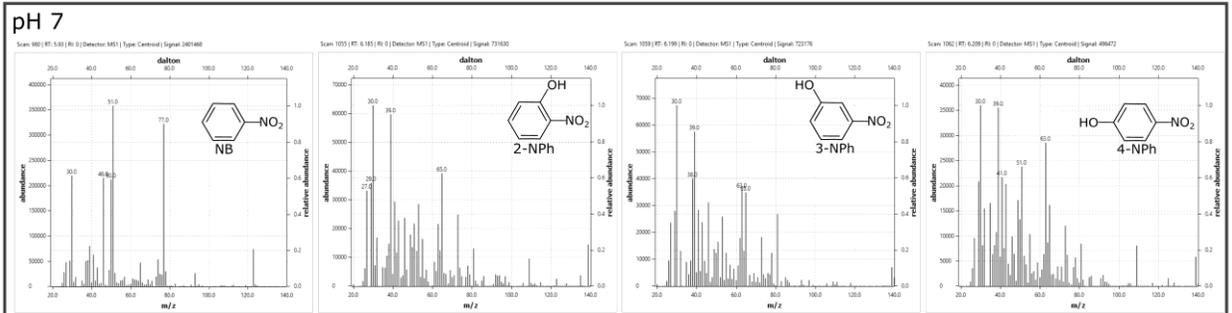
(0.5 wt. % Fe)-TiO ₂	250 mg/L	320-500 nm	Agua	0.37 x 10 ⁻⁴ M	4 h 99.73%	
Fe ₃ O ₄ nanopartículas	100 mg/L	253.7 nm	Aguar pH 2	15 ppm	2 h 73.13%	Este trabajo

Nota: Au NPs= nanopartículas de oro, TiO₂-NTs= nanotubos TiO₂, HPW= H₃PW₁₂O₄₀, TFL=luz de trifosforo, SWCNT= nanotubos de una sola pared, MVL=lampara de vapor de mercurio, Ph=fenol, * corresponde a arginina. Todas las reacciones donde no se especifique, el pH de la solución fue cercano a neutrón.

El estudio de GC/MS (Fig. 26) muestra que los productos fueron 2-NP, 3-NP and 4-NP. En la reacción a pH 7 los tres (2-NP, 3-NP and 4-NP) productos fueron detectados, donde a pH de 10 y 2 solo 3-NP y 4-NP, y 2-NP y 4-NP respectivamente (tabla 5) fueron observados. Los subproductos formados detectados en el sistema fueron todos productos de hidroxilación, estos resultados son consistentes con algunos estudios previos en la degradación foto catalítica [196]. Debido a que sus concentraciones fueron muy bajas esto indica que fueron solo productos intermedarios. La ruta de oxidación de nitrobenceno consiste en que, radicales hidroxilos podrían ser agregados al anillo aromático de NB y formar radicales hidroxil ciclohexadienil, el cual podría llevar a cabo diferentes reacciones poco después. Cuando el radical hidroxilo fue agregado en la posición orto, meta y para del anillo de NB, oxidación o desproporción del radical hidroxil ciclohexadienil podrían producir 2-NP, 3-NP y 4-NP, respectivamente. Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de la formación de otros productos no identificados en el sistema ya que estos productos detectados posteriormente podrían ser oxidados y finalmente mineralizados por los radicales hidroxilos como lo reportan estudios previos [46]. Siendo el mecanismo principal propuesto un proceso de oxidación el cual tiende a la mineralización. Adicionalmente, la degradación de NB por un catalizador de hierro (Fe₃O₄ o Fe₀) sin el producto intermedio más común anilina (tabla 5), así como su mineralización. Esta última información provee datos importantes, ya que anilina es perjudicial a la salud pública por su carcinogenicidad y el aumento de un desbalance en ecosistemas debido a su alta toxicidad a la vida acuática. Considerando la

naturaleza persistente de anilina y su amplia difusión globalmente, agua residual conteniendo anilina requiere un tratamiento apropiado anterior a su desecho [197].

a



b

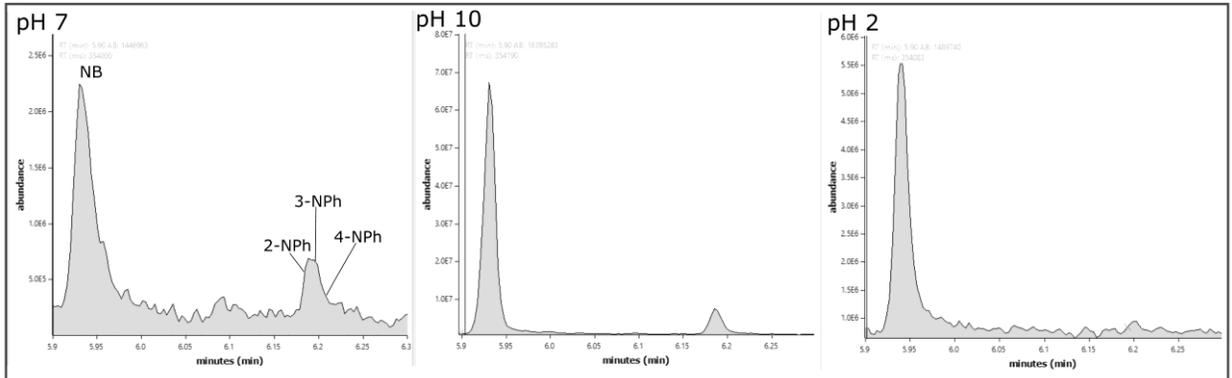


Figure 26: Espectroscopia de masas de las (a) moléculas detectadas de la degradación de nitrobenzeno (NB) fueron NB, 2-nitrofenol (2-NPh), 3-nitrofenol (3-NPh) y 4-nitrofenol (4-NPh). Cromatografía de gases (b) de los extractos de Fotodegradación de NB de las reacciones a pH 7, 10 y 2.

Tabla 5. Comparación de la reducción de nitrobenzeno (NB) usando hierro como catálisis

Catalizador	Concentración	NB	Condiciones	Degradación	Producto	Referencia
Fe ⁰	5 g	1.63 mM	Agua pH 3	45 min 1.23 mM	AN 0.71 mM	[44]
Nanopartículas de Fe ⁰ estabilizadas CMC	0.05 g/L	49 ppm	Agua	30 min 99%	AN 98%	[176]
Fe ₃ O ₄	1 g/L	40 μM	Agua pH 7.2 MOPS Buffer	60 min 99%	AN 99%	[198]
Fe ⁰ /Fe ₃ O ₄ /FeCl ₂	2.0 g Fe/L	200 ppm	Agua pH 3-9	30 min. >95 %	AN >93%	[199]
Fe ₃ O ₄ nanopartículas	100 mg/L	15 ppm	Agua pH 10	120 min. 68.64%	2-NP, 3-NP, 4-NP (8.06%)	Este Trabajo
			Agua pH 10	120 min. 68.64%	3-NP, 4-NP (<3.01%)	
			Agua pH 2	120 min. 73.13%	2-NP, 4-NP (3.01%)	

Nota: CMC:carboximetilcelulosa, AN= anilina, 2-NP= 2-nitrofenol, 3-NP= 3-nitrofenol, 4-NP= 4-nitrofenol

Conclusiones

En este trabajo, las nanopartículas de magnetita sintetizadas con un tamaño de cristal de ~15 nm, y un comportamiento superparamagnético se utilizaron como fotocatalizadores y mostraron una buena separación magnética. Las nanopartículas mostraron una actividad fotocatalítica bajo una fuente de luz de 254 nm para la foto degradación y mineralización de NB, así como también un band gap potencial para una actividad fotocatalítica bajo luz visible debajo de 517 nm. Las reacciones de foto degradación exhibieron un proceso de oxidación y mineralización corroborado por GC-MS al detector solamente productos intermediarios como 2-NP, 3-NP and 4-NP. Este es un fotocatalizador potencial debido al uso de reactivos comunes, síntesis sencilla, comportamiento superparamagnético, capacidad foto catalítica oxidativa y mineralización de compuestos orgánicos. Así como también una superficie foto catalítica potencial a ser activada en ambos tipos de luz, UV y visible.

References

- [1] *Miliotis, M. D., & Bier, J. W. (Eds.). (2003). International handbook of foodborne pathogens (Vol. 125). CRC Press..*
- [2] *Acharya, K. R., Dhand, N. K., Whittington, R. J., & Plain, K. M. (2017). Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in powdered infant formula using IS900 quantitative PCR and liquid culture media, International journal of food microbiology, 257, 1-9.*
- [3] *Burisch, J., Kiudelis, G., Kupcinskas, L., Kievit, H. A. L., Andersen, K. W., Andersen, V., ... & Valpiani, D. (2019). Natural disease course of Crohn's disease during the first 5 years after diagnosis in a European population-based inception cohort: an Epi-IBD study. Gut, 68(3), 423-433.*
- [4] *Sanchez, B. L. (2016). MAP3773c of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis has a iron regulatory activity.*
- [5] *Ibarra. German (2016) Self regulation of the MAP3773c gene of of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis..*

- [6] Eckelt, E., Jarek, M., Frömke, C., Meens, J., & Goethe, R. (2014). Identification of a lineage specific zinc responsive genomic island in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *BMC genomics*, 15(1), 1076.
- [7] Bertha Landeros Sánchez. *Clonación, expresión, purificación e inmunogenicidad de la proteína MAP3773c con actividad metalorreguladora* Libro de Resúmenes XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular Rubes editorial, S.L.
- [8] Janagama, H. K., Lamont, E. A., George, S., Bannantine, J. P., Xu, W. W., Tu, Z. J., ... & Sreevatsan, S. (2010). Primary transcriptomes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* reveal proprietary pathways in tissue and macrophages. *BMC genomics*, 11(1), 561.
- [9] Escolar, L., Pérez-Martín, J., & De Lorenzo, V. (1999). Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *Journal of bacteriology*, 181(20), 6223-6229.
- [10] Fillat, M. F. (2014). The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Archives of biochemistry and biophysics*, 546, 41-52.
- [11] Chandrangu, P., Rensing, C., & Helmann, J. D. (2017). Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 15(6), 338-350.
- [12] Hantke, K. (2002). Members of the Fur protein family regulate iron and zinc transport in *E. coli* and characteristics of the Fur-regulated *fhuF* protein. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 4(3), 217-222.
- [13] Hantke, K. (2001). Iron and metal regulation in bacteria. *Current opinion in microbiology*, 4(2), 172-177.
- [14] Janson, J. C. (Ed.). (2012). *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications* (Vol. 151). John Wiley & Sons.
- [15] Wee, S., Neilands, J. B., Bittner, M. L., Hemming, B. C., Haymore, B. L., & Seetharam, R. (1988). Expression, isolation and properties of Fur (ferric uptake regulation) protein of *Escherichia coli* K 12. *Biomaterials*, 1(1), 62-68.
- [16] D'Autréaux, B., Pecqueur, L., Gonzalez de Peredo, A., Diederix, R. E., Caux-Thang, C., Tabet, L., ... & Michaud-Soret, I. (2007). Reversible redox- and zinc-dependent dimerization of the *Escherichia coli* fur protein. *Biochemistry*, 46(5), 1329-1342.
- [17] Michaud-Soret, I., Adrait, A., Jaquinod, M., Forest, E., Touati, D., & Latour, J. M. (1997). Electrospray ionization mass spectrometry analysis of the apo- and metal-substituted forms of the Fur protein. *FEBS letters*, 413(3), 473-476.
- [18] Adrait, A., Jacquamet, L., Le Pape, L., Gonzalez de Peredo, A., Aberdam, D., Hazemann, J. L., ... & Michaud-Soret, I. (1999). Spectroscopic and saturation magnetization properties of the

- manganese-and cobalt-substituted Fur (ferric uptake regulation) protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 38(19), 6248-6260.
- [19] D'Autréaux, B., Touati, D., Bersch, B., Latour, J. M., & Michaud-Soret, I. (2002). Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16619-16624.
- [20] Cissé, C., Mathieu, S. V., Abeih, M. B. O., Flanagan, L., Vitale, S., Catty, P., ... & Crouzy, S. (2014). Inhibition of the Ferric Uptake Regulator by Peptides Derived from Anti-FUR Peptide Aptamers: Coupled Theoretical and Experimental Approaches. *ACS chemical biology*, 9(12), 2779-2786.
- [21] Mathieu, S., Cissé, C., Vitale, S., Ahmadova, A., Degardin, M., Pérard, J., ... & Crouzy, S. (2016). From peptide aptamers to inhibitors of FUR, bacterial transcriptional regulator of iron homeostasis and virulence. *ACS chemical biology*, 11(9), 2519-2528.
- [22] Pérard, J., Covès, J., Castellan, M., Solard, C., Savard, M., Miras, R., ... & De Rosny, E. (2016). Quaternary structure of fur proteins, a new subfamily of tetrameric proteins. *Biochemistry*, 55(10), 1503-1515.
- [23] Bsat, N., & Helmann, J. D. (1999). Interaction of *Bacillus subtilis* Fur (ferric uptake repressor) with the *dhb* operator *in vitro* and *in vivo*. *Journal of bacteriology*, 181(14), 4299-4307.
- [24] Shin, J. H., Oh, S. Y., Kim, S. J., & Roe, J. H. (2007). The zinc-responsive regulator Zur controls a zinc uptake system and some ribosomal proteins in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of bacteriology*, 189(11), 4070-4077.
- [25] Mills, S. A., & Marletta, M. A. (2005). Metal binding characteristics and role of iron oxidation in the ferric uptake regulator from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 44(41), 13553-13559.
- [26] Hernández, J. A., Bes, M. T., Fillat, M. F., Neira, J. L., & Peleato, M. L. (2002). Biochemical analysis of the recombinant Fur (ferric uptake regulator) protein from *Anabaena* PCC 7119: factors affecting its oligomerization state. *Biochemical Journal*, 366(1), 315-322.
- [27] Bolanos-Garcia, V. M., & Davies, O. R. (2006). Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760(9), 1304-1313.
- [28] Niedzialkowska, E., Gasiórowska, O., Handing, K. B., Majorek, K. A., Porebski, P. J., Shabalin, I. G., ... & Minor, W. (2016). Protein purification and crystallization artifacts: The tale usually not told. *Protein Science*, 25(3), 720-733.
- [29] Žūkienė, R., & Snitka, V. (2015). Zinc oxide nanoparticle and bovine serum albumin interaction and nanoparticles influence on cytotoxicity *in vitro*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 135, 316-323.

- [30] Sasidharan, N. P., Chandran, P., & Khan, S. S. (2013). Interaction of colloidal zinc oxide nanoparticles with bovine serum albumin and its adsorption isotherms and kinetics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 195-201.
- [31] Rahman, M., Laurent, S., Tawil, N., Yahia, L., & Mahmoudi, M. (2013). *Protein-nanoparticle interactions* (pp. 21-44). Berlin Heidelberg: Springer.
- [32] Huber, D. L. (2005). Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small*, 1(5), 482-501.
- [33] Naito, M., Yokoyama, T., Hosokawa, K., & Nogi, K. (Eds.). (2018). *Nanoparticle technology handbook*(p. 3, 275, 671). Elsevier.
- [34] Vollath, Dieter. *Nanoparticles-Nanocomposites-Nanomaterials: An Introduction for Beginners*. p. 183 John Wiley & Sons, 2013.
- [35] Li, C., Wei, R., Xu, Y., Sun, A., & Wei, L. (2014). Synthesis of hexagonal and triangular Fe₃O₄ nanosheets via seed-mediated solvothermal growth. *Nano Research*, 7(4), 536-543.
- [36] Yildiz, I. (2016). Applications of magnetic nanoparticles in biomedical separation and purification. *Nanotechnology Reviews*, 5(3), 331-340.
- [37] Iranmanesh, M., & Hulliger, J. (2017). Magnetic separation: its application in mining, waste purification, medicine, biochemistry and chemistry. *Chemical Society Reviews*.
- [38] Liu, X., Liu, J., Zhang, S., Nan, Z., & Shi, Q. (2016). Structural, magnetic, and thermodynamic evolutions of Zn-doped Fe₃O₄ nanoparticles synthesized using a one-step solvothermal method. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(2), 1328-1341.
- [39] Li, P., Li, L., Zhao, Y., Sun, L., & Zhang, Y. (2016). Selective binding and magnetic separation of histidine-tagged proteins using Fe₃O₄/Cu-apatite nanoparticles. *Journal of inorganic biochemistry*, 156, 49-54.
- [40] Hou, Y., & Sellmyer, D. J. (Eds.). (2017). *Magnetic Nanomaterials: Fundamentals, Synthesis and Applications*(p.3, 30, 50, 51,121,516, 525). John Wiley & Sons.
- [41] Yahya, N., Aziz, F., Jamaludin, N. A., Mutalib, M. A., Ismail, A. F., Salleh, W. N. W., ... & Ludin, N. A. (2018). A review of integrated photocatalyst adsorbents for wastewater treatment. *Journal of environmental chemical engineering*, 6(6), 7411-7425.
- [42] Crokek, D., Kemme, P. A., Makarova, O. V., Chen, L. X., & Rajh, T. (2008). Selective photocatalytic decomposition of nitrobenzene using surface modified TiO₂ nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(22), 8311-8318.
- [43] Makarova, O. V., Rajh, T., Thurnauer, M. C., Martin, A., Kemme, P. A., & Crokek, D. (2000). Surface modification of TiO₂ nanoparticles for photochemical reduction of nitrobenzene. *Environmental science & technology*, 34(22), 4797-4803.

- [44] Mu, Y., Yu, H. Q., Zheng, J. C., Zhang, S. J., & Sheng, G. P. (2004). Reductive degradation of nitrobenzene in aqueous solution by zero-valent iron. *Chemosphere*, 54(7), 789-794.
- [45] Hartwig, A. Nitrobenzene [MAK Value Documentation, 2017]. *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety*, 3, 1932-1982.
- [46] Zhang, Y., Zhang, K., Dai, C., Zhou, X., & Si, H. (2014). An enhanced Fenton reaction catalyzed by natural heterogeneous pyrite for nitrobenzene degradation in an aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 244, 438-445.
- [47] Srilakshmi, C., Saraf, R., & Shivakumara, C. (2015). Effective degradation of aqueous nitrobenzene using the SrFeO₃- δ photocatalyst under UV illumination and its kinetics and mechanistic studies, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 54(32), 7800-7810.
- [48] Isayev, O., Rasulev, B., Gorb, L., & Leszczynski, J. (2006). Structure-toxicity relationships of nitroaromatic compounds. *Molecular diversity*, 10(2), 233-245.
- [49] Jeong, S., Lee, H., Park, H., Jeon, K. J., Park, Y. K., & Jung, S. C. (2018). Rapid photocatalytic degradation of nitrobenzene under the simultaneous illumination of UV and microwave radiation fields with a TiO₂ ball catalyst. *Catalysis Today*, 307, 65-72.
- [50] Carlos, L., Fabbri, D., Capparelli, A. L., Prevot, A. B., Pramauro, E., & Einschlag, F. S. G. (2008). Intermediate distributions and primary yields of phenolic products in nitrobenzene degradation by Fenton's reagent. *Chemosphere*, 72(6), 952-958.
- [51] Stylidi, M., Kondarides, D. I., & Verykios, X. E. (2003). Pathways of solar light-induced photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous TiO₂ suspensions. *Applied Catalysis B: Environmental*, 40(4), 271-286.
- [52] Su, C. (2017). Environmental implications and applications of engineered nanoscale magnetite and its hybrid nanocomposites: A review of recent literature. *Journal of hazardous materials*, 322, 48-84.
- [53] Kaur, M., Kaur, N., & Vibha, V. (2016). Ferrites: synthesis and applications for environmental remediation. In *Ferrites and Ferrates: Chemistry and Applications in Sustainable Energy and Environmental Remediation*, ACS Symposium Series (pp. 113-136). American Chemical Society Washington, DC.
- [54] Rivero, M., del Campo, A., Mayoral, Á., Mazario, E., Sánchez-Marcos, J., & Muñoz-Bonilla, A. (2016). Synthesis and structural characterization of Zn_xFe_{3-x}O₄ ferrite nanoparticles obtained by an electrochemical method. *RSC Advances*, 6(46), 70067-40076.
- [55] Deng, H., Li, X., Peng, Q., Wang, X., Chen, J., & Li, Y. (2005). Monodisperse magnetic single-crystal ferrite microspheres. *Angewandte Chemie*, 117(18), 2842-2845.

- [56] Kovacheva, D., Ruskov, T., Krystev, P., Asenov, S., Tanev, N., Mönch, I., ... & Nihtianova, D. (2012). *Synthesis and characterization of magnetic nano-sized Fe₃O₄ and CoFe₂O₄*. *Bulg Chem Commun*, 44, 90-97.
- [57] Solomon, R. V., Lydia, I. S., Merlin, J. P., & Venuvanalingam, P. (2012). *Enhanced photocatalytic degradation of azo dyes using nano Fe₃O₄*. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 9(2), 101-109.
- [58] Singh, R. (2013). *Unexpected magnetism in nanomaterials*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 346, 58-73.
- [59] Dadfar, S. M., Roemhild, K., Drude, N. I., von Stillfried, S., Knüchel, R., Kiessling, F., & Lammers, T. (2019). *Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications*. *Advanced drug delivery reviews*, 138, 302-325.
- [60] Wang, N., Zhu, L., Wang, D., Wang, M., Lin, Z., & Tang, H. (2010). *Sono-assisted preparation of highly-efficient peroxidase-like Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for catalytic removal of organic pollutants with H₂O₂*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(3), 526-533.
- [61] Hasany, S. F., Ahmed, I., Rajan, J., & Rehman, A. (2012). *Systematic review of the preparation techniques of iron oxide magnetic nanoparticles*. *Nanosci. Nanotechnol*, 2(6), 148-158.
- [62] Roth, H. C., Schwaminger, S. P., Schindler, M., Wagner, F. E., & Berensmeier, S. (2015). *Influencing factors in the CO-precipitation process of superparamagnetic iron oxide nano particles: a model based study*, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 377, 81-89.
- [63] Dang, F., Enomoto, N., Hojo, J., & Enpuku, K. (2009). *Sonochemical synthesis of monodispersed magnetite nanoparticles by using an ethanol–water mixed solvent*. *Ultrasonics sonochemistry*, 16(5), 649-654.
- [64] Chin, S. F., Iyer, K. S., Raston, C. L., & Saunders, M. (2008). *Size selective synthesis of superparamagnetic nanoparticles in thin fluids under continuous flow conditions*. *Advanced Functional Materials*, 18(6), 922-927.
- [65] Sulistyaningsih, T., Santosa, S. J., Siswanta, D., & Rusdiarso, B. (2017). *Synthesis and characterization of magnetites obtained from mechanically and sonochemically assisted co-precipitation and reverse co-precipitation methods*, *Int J Mater, Mech Manuf*, 5(1), 16-9..
- [66] Silvério Neto, W., Thyago Jensen, A., Ribeiro Ferreira, G., Fonseca Valadares, L., Gambetta, R., Belém Gonçalves, S., & Machado, F. (2015). *A survey on synthesis processes of structured materials for biomedical applications: Iron-based magnetic nanoparticles, polymeric materials and polymerization processes*. *Current pharmaceutical design*, 21(37), 5336-5358.
- [67] Tabasum, A., Zahid, M., Bhatti, H. N., & Asghar, M. (2018). *Fe₃O₄-GO composite as efficient heterogeneous photo-Fenton's catalyst to degrade pesticides*. *Materials Research Express*, 6(1), 015608.

- [68] Pande, M., & Bhaskarwar, A. N. (2016). *Nanoparticles: Preparation and Characterization*(p.136). Momentum Press.
- [69] Kaufmann, E. N. (2003). *Characterization of Materials, 2 Volume Set. Characterization of Materials, 2 Volume Set*, by Elton N. Kaufmann (Editor). ISBN 0-471-26882-8.(pp.531,972-973) Wiley-VCH, January 2003., 1392.
- [70] Watt, I. M. (1997). *The principles and practice of electron microscopy*(p.32-33, 59,335, 423-424). Cambridge University Press.
- [71] Egerton, R. F. (2005). *Physical principles of electron microscopy* (pp. 11, 15, 17, 119, 125, 126,131). New York: Springer.
- [72] Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X., & Low, S. C. (2013). *Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. Nanoscale research letters*, 8(1), 381.
- [73] Bhattacharjee, S. (2016). *DLS and zeta potential—What they are and what they are not?. Journal of Controlled Release*, 235, 337-351.
- [74] Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., & Sen, T. (2011). *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. Advanced drug delivery reviews*, 63(1-2), 24-46.
- [75] Chen, C., Gunawan, P., & Xu, R. (2011). *Self-assembled Fe₃O₄-layered double hydroxide colloidal nanohybrids with excellent performance for treatment of organic dyes in water. Journal of Materials Chemistry*, 21(4), 1218-1225.
- [76] Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J., & Couvreur, P. (2012). *Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. Chemical reviews*, 112(11), 5818-5878.
- [77] Lee, M. (2016). *X-Ray Diffraction for Materials Research: From Fundamentals to Applications*(182). CRC Press.
- [78] Waseda, Y., Matsubara, E., & Shinoda, K. (2011). *X-ray diffraction crystallography: introduction, examples and solved problems*(73-75). Springer Science & Business Media.
- [79] Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., & Muller, R. N. (2008). *Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. Chemical reviews*, 108(6), 2064-2110.
- [80] Cullity, B. D., & Stock, S. R. (2014). *Elements of X-ray Diffraction*(p. 445). Pearson Education.
- [81] Pathak, T. K., Vasoya, N. H., Natarajan, T. S., Modi, K. B., & Tayade, R. J. (2013). *Photocatalytic degradation of aqueous nitrobenzene solution using nanocrystalline Mg-Mn ferrites. In Materials Science Forum* (Vol. 764, pp. 116-129), Trans Tech Publications.

- [82] Thompson, J. M. (2018). *Infrared Spectroscopy* (pp.1,2). Pan Stanford.
- [83] Balavijayalakshmi, J. (2014). *Synthesis and characterization of copper Doped mixed ferrite co ni co ni ni mn Nanoparticles co ni cu and ni mn cu ferrite Nanoparticles as humidity sensors and Electro catalysts*.
- [84] Chen, Z., Dinh, H. N., & Miller, E. (2013). *Photoelectrochemical water splitting* (p. 49). New York: Springer.
- [85] Yu, W., & Xie, H. (2012). *A review on nanofluids: preparation, stability mechanisms, and applications*. *Journal of nanomaterials*, 2012, 1.
- [86] Khordad, R. (2016). *Absorbance of Iron Nanoparticles Dispersed in the Ethylene Glycol and n-Propanol*. *Armenian Journal of Physics*, 9(3), 211-219.
- [87] Kumar, C. S. (Ed.). (2012). *Raman spectroscopy for nanomaterials characterization*(p. 381,386). Springer Science & Business Media.
- [88] Verma, H. R. (2007). *Atomic and nuclear analytical methods*(pp. 213-216). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [89] Liu, Y., & Shindo, D. S. D. (2005). *Handbook of Advanced Magnetic Materials. Volume I: Advanced Magnetic Materials: Nanostructural Effects*(pp. 1, 3, 14). Publisher: Springer, ISBN-10, 1402079834(2).
- [90] Kumar, C. S. (Ed.). (2017). *Magnetic Characterization Techniques for Nanomaterials*(p.192). Springer.
- [91] Reis, M. (2013). *Fundamentals of magnetism*(p.9, 11, 12, 148). Elsevier.
- [92] Hu, J. D., Zevi, Y., Kou, X. M., Xiao, J., Wang, X. J., & Jin, Y. (2010). *Effect of dissolved organic matter on the stability of magnetite nanoparticles under different pH and ionic strength conditions*, *Science of the Total Environment*, 408(16), 3477-3489.
- [93] El-Diasty, F., El-Sayed, H. M., El-Hosiny, F. I., & Ismail, M. I. M. (2009). *Complex susceptibility analysis of magneto-fluids: Optical band gap and surface studies on the nanomagnetite-based particles*. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 13(1-2),28-34.
- [94] Bauer, M., Davydovskaya, P., Janko, M., Kaliwoda, M., Petersen, N., Gilder, S., & Stark, R. W. (2011). *Raman spectroscopy of laser-induced oxidation of titanomagnetites*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 42(6), 1413-1418.
- [95] Frimpong, R. A., Dou, J., Pechan, M., & Hilt, J. Z. (2010). *Enhancing remote controlled heating characteristics in hydrophilic magnetite nanoparticles via facile co-precipitation*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 322(3), 326-331.

- [96] Huang, Z., & Tang, F. (2004). Preparation, structure, and magnetic properties of polystyrene coated by Fe₃O₄ nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), 142-147.
- [97] Zamora, J., Betancourt, I., & Figueroa, I. A. (2018). Switching of Coercivity Process in MnBi Alloys. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, 31(3), 873-878.
- [98] Can, K., Ozmen, M., & Ersoz, M. (2009). Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71(1), 154-159.
- [99] Teja, A. S., & Koh, P. Y. (2009). Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in crystal growth and characterization of materials*, 55(1), 22-45.
- [100] Gan, N., Jin, H., Li, T., & Zheng, L. (2011). Fe₃O₄/Au magnetic nanoparticle amplification strategies for ultrasensitive electrochemical immunoassay of alfa-fetoprotein. *International journal of nanomedicine*, 6, 3259.
- [101] Awwad, A. M., & Salem, N. M. (2012). A green and facile approach for synthesis of magnetite nanoparticles. *Nanoscience and Nanotechnology*, 2(6), 208-213.
- [102] Cornell, R. M., & Schwertmann, U. (2003). *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*. John Wiley & Sons.
- [103] El Ghandoor, H., Zidan, H. M., Khalil, M. M., & Ismail, M. I. M. (2012). Synthesis and some physical properties of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles. *Int. J. Electrochem. Sci*, 7(6), 5734-5745.
- [104] Ebrahiminezhad, A., Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Barar, J., & Davaran, S. (2012). Impact of amino-acid coating on the synthesis and characteristics of iron-oxide nanoparticles (IONs). *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33(12), 3957-3962.
- [105] Freyria, F. S., Esposito, S., Armandi, M., Deorsola, F., Garrone, E., & Bonelli, B. (2017). Role of pH in the aqueous phase reactivity of zerovalent iron nanoparticles with acid orange 7, a model molecule of azo dyes. *Journal of Nanomaterials*, 2017.
- [106] Mielczarski, J. A., Atenas, G. M., & Mielczarski, E. (2005). Role of iron surface oxidation layers in decomposition of azo-dye water pollutants in weak acidic solutions. *Applied Catalysis B: Environmental*, 56(4), 289-303.
- [107] Li, Y. S., Church, J. S., & Woodhead, A. L. (2012). Infrared and Raman spectroscopic studies on iron oxide magnetic nano-particles and their surface modifications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324(8), 1543-1550.
- [108] Cvejic, Z., Rakic, S., Kremenovic, A., Antic, B., Jovalekic, C., & Colomban, P. (2006). Nanosize ferrites obtained by ball milling: Crystal structure, cation distribution, size-strain analysis and Raman investigations. *Solid State Sciences*, 8(8), 908-915.

- [109] ur Rahman, O., Mohapatra, S. C., & Ahmad, S. (2012). *Fe₃O₄ inverse spinal super paramagnetic nanoparticles*. *Materials Chemistry and Physics*, 132(1), 196-202.
- [110] Lobato, N. C. C., Mansur, M. B., & Ferreira, A. D. M. (2017). *Characterization and Chemical Stability of Hydrophilic and Hydrophobic Magnetic Nanoparticles*. *Materials Research*, 20(3), 736-746.
- [111] Harris, L. A. (2002). *Polymer stabilized magnetite nanoparticles and poly (propylene oxide) modified styrene-dimethacrylate networks (Doctoral dissertation, Virginia Tech)*.
- [112] Vikesland, P. J., Rebodos, R. L., Bottero, J. Y., Rose, J., & Masion, A. (2016). *Aggregation and sedimentation of magnetite nanoparticle clusters*. *Environmental Science: Nano*, 3(3), 567-577.
- [113] Illés, E., & Tombácz, E. (2006). *The effect of humic acid adsorption on pH-dependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 295(1), 115-123.
- [114] Hajdú, A., Tombácz, E., Illés, E., Bica, D., & Vékás, L. (2008). *Magnetite nanoparticles stabilized under physiological conditions for biomedical application*. In *Colloids for Nano-and Biotechnology* (pp. 29-37). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [115] Pang, S. C., Chin, S. F., & Anderson, M. A. (2007). *Redox equilibria of iron oxides in aqueous-based magnetite dispersions: Effect of pH and redox potential*. *Journal of colloid and interface science*, 311(1), 94-101.
- [116] Andrade, Â. L., Fabris, J. D., Ardisson, J. D., Valente, M. A., & Ferreira, J. M. (2012). *Effect of tetramethylammonium hydroxide on nucleation, surface modification and growth of magnetic nanoparticles*. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 15.
- [117] Arsalani, N., Fattahi, H., & Nazarpour, M. (2010). *Synthesis and characterization of PVP-functionalized superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as an MRI contrast agent*. *Express Polym Lett*, 4(6), 329-38.
- [118] Cabrera, L., Gutierrez, S., Menendez, N., Morales, M. P., & Herrasti, P. (2008). *Magnetite nanoparticles: electrochemical synthesis and characterization*. *Electrochimica Acta*, 53(8), 3436-3441.
- [119] Vijayakumar, R., Koltypin, Y., Felner, I., & Gedanken, A. (2000). *Sonochemical synthesis and characterization of pure nanometer-sized Fe₃O₄ particles*. *Materials Science and Engineering: A*, 286(1), 101-105.
- [120] Levin, C. S., Hofmann, C., Ali, T. A., Kelly, A. T., Morosan, E., Nordlander, P., ... & Halas, N. J. (2009). *Magnetic-plasmonic core-shell nanoparticles*. *ACS nano*, 3(6), 1379-1388.

- [121] Wang, J., Wu, W., Zhao, F., & Zhao, G. M. (2011). Curie temperature reduction in SiO₂-coated ultrafine Fe₃O₄ nanoparticles: quantitative agreement with a finite-size scaling law. *Applied Physics Letters*, 98(8), 083107.
- [122] Liao, M. H., & Chen, D. H. (2002). Fast and efficient adsorption/desorption of protein by a novel magnetic nano-adsorbent. *Biotechnology letters*, 24(22), 1913-1917.
- [123] Schwaminger, S. P., Blank-Shim, S. A., Scheifele, I., Fraga-Garcia, P., & Berensmeier, S. (2017). Peptide binding to metal oxide nanoparticles. *Faraday discussions*, 204, 233-250.
- [124] Peng, Z. G., Hidajat, K., & Uddin, M. S. (2004). Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles. *Journal of colloid and interface science*, 271(2), 277-283.
- [125] Xiao, Y., Liang, H., & Wang, Z. (2013). MnFe₂O₄/chitosan nanocomposites as a recyclable adsorbent for the removal of hexavalent chromium. *Materials Research Bulletin*, 48(10), 3910-3915.
- [126] Khatoon, J., Shah, M. R., Malik, M. I., Khan, I. A. T., Khurshid, S., & Naz, R. (2019). Convenient pH-responsive removal of Acid Black 1 by green l-histidine/iron oxide magnetic nanoadsorbent from water: performance and mechanistic studies. *RSC advances*, 9(6), 2978-2996.
- [127] Hu, J., Lo, I. M., & Chen, G. (2007). Comparative study of various magnetic nanoparticles for Cr(VI) removal. *Separation and Purification Technology*, 56(3), 249-256.
- [128] Salimi, K., Usta, D. D., Koçer, İ., Çelik, E., & Tuncel, A. (2017). Highly selective magnetic affinity purification of histidine-tagged proteins by Ni²⁺ carrying monodisperse composite microspheres. *RSC Advances*, 7(14), 8718-8726.
- [129] Liu, C. H., Lai, H. Y., & Wu, W. C. (2017). Facile synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles for nattokinase isolation. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 260-267.
- [130] Fatima, H., & Kim, K. S. (2017). Magnetic nanoparticles for bioseparation. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 34(3), 589-599.
- [131] Rashid, Z., Ghahremanzadeh, R., Nejadmoghaddam, M. R., Nazari, M., Shokri, M. R., Naeimi, H., & Zarnani, A. H. (2017). Nickel-Salen supported paramagnetic nanoparticles for 6-His-target recombinant protein affinity purification. *Journal of Chromatography A*, 1490, 47-53.
- [132] Rashid, Z., Naeimi, H., Zarnani, A. H., Mohammadi, F., & Ghahremanzadeh, R. (2017). Facile fabrication of nickel immobilized on magnetic nanoparticles as an efficient affinity adsorbent for purification of his-tagged protein. *Materials Science and Engineering: C*, 80, 670-676.
- [133] Gädke, J., Kleinfeldt, L., Schubert, C., Rohde, M., Biedendieck, R., Garnweitner, G., & Krull, R. (2017). In situ affinity purification of his-tagged protein A from *Bacillus megaterium* cultivation using recyclable superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of biotechnology*, 242, 55-63.

- [134] Fernandes, C. S., Dos Santos, R., Ottengy, S., Viacinski, A. C., Béhar, G., Mouratou, B., ... & Roque, A. C. A. (2016). Affitins for protein purification by affinity magnetic fishing. *Journal of Chromatography A*, 1457, 50-58.
- [135] Guo, J., Filpponen, I., Johansson, L. S., Mohammadi, P., Latikka, M., Linder, M. B., ... & Rojas, O. J. (2017). Complexes of Magnetic Nanoparticles with Cellulose Nanocrystals as Regenerable, Highly Efficient, and Selective Platform for Protein Separation. *Biomacromolecules*, 18(3), 898-905.
- [136] Schwaminger, S. P., Fraga-García, P., Blank-Shim, S. A., Straub, T., Haslbeck, M., Muraca, F., ... & Berensmeier, S. (2019). Magnetic One-Step Purification of His-Tagged Protein by Bare Iron Oxide Nanoparticles. *ACS Omega*, 4(2), 3790-3799.
- [137] Pan, X., Xu, Z., Zheng, Y., Huang, T., Li, L., Chen, Z., ... & Guan, X. (2017). The adsorption features between insecticidal crystal protein and nano-Mg (OH) 2. *Royal Society open science*, 4(12), 170883.
- [138] Joshi, S., Ghosh, I., Pokhrel, S., Mädler, L., & Nau, W. M. (2012). Interactions of amino acids and polypeptides with metal oxide nanoparticles probed by fluorescent indicator adsorption and displacement. *ACS nano*, 6(6), 5668-5679.
- [139] Schwaminger, S. P., García, P. F., Merck, G. K., Bodensteiner, F. A., Heissler, S., Günther, S., & Berensmeier, S. (2015). Nature of interactions of amino acids with bare magnetite nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119(40), 23032-23041.
- [140] Swamy, M., Siegers, G. M., Minguet, S., Wollscheid, B., & Schamel, W. W. (2006). Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for the identification and analysis of multiprotein complexes. *Sci. STKE*, 2006(345), pl4-pl4.
- [141] Docter, D., Distler, U., Storck, W., Kuharev, J., Wünsch, D., Hahlbrock, A., ... & Stauber, R. H. (2014). Quantitative profiling of the protein coronas that form around nanoparticles. *Nature protocols*, 9(9), 2030.
- [142] Laemmli, U. K. (1970). Preparation of slab gels for one-or two-dimensional Polyacrylamide sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Nature*, 227, 680-685.
- [143] Mesu, J. G., Visser, T., Soulimani, F., & Weckhuysen, B. M. (2005). Infrared and Raman spectroscopic study of pH-induced structural changes of L-histidine in aqueous environment. *Vibrational spectroscopy*, 39(1), 114-125.
- [144] PAVIA, Donald L., et al. *Introduction to spectroscopy*. (p. 389) Cengage Learning, 2008.
- [145] Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis*. (p.373) Cengage learning..

- [146] Tombácz, E., Tóth, I. Y., Nesztor, D., Illés, E., Hajdú, A., Szekeres, M., & Vékás, L. (2013). Adsorption of organic acids on magnetite nanoparticles, pH-dependent colloidal stability and salt tolerance. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 435, 91-96.
- [147] Pal, N. K., & Kryschi, C. (2015). A facile UV-light mediated synthesis of l-histidine stabilized silver nanocluster for efficient photodegradation of methylene blue. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 404, 27-35.
- [148] Farzaneh, F. (2012). Immobilization of Cu (II)-histidine complex on Al-MCM-41 as catalyst for epoxidation of alkenes. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 23(1), 29-36.
- [149] Djurdjevic, P., Cvijovic, M., Pavelkic, V., & Zakrzewska, J. (2005). Spectrophotometric and 27-Al NMR Characterization of Aluminum (III) Complexes with l-Histidine. *Spectroscopy letters*, 38(4-5), 617-634.
- [150] Mesu, J. G., Visser, T., Soulimani, F., van Faassen, E. E., de Peinder, P., Beale, A. M., & Weckhuysen, B. M. (2006). New insights into the coordination chemistry and molecular structure of copper (II) histidine complexes in aqueous solutions. *Inorganic chemistry*, 45(5), 1960-1971.
- [151] Watly, J., Simonovsky, E., Wieczorek, R., Barbosa, N., Miller, Y., & Kozłowski, H. (2014). Insight into the Coordination and the Binding Sites of Cu²⁺ by the Histidyl-6-Tag using Experimental and Computational Tools. *Inorganic chemistry*, 53(13), 6675-6683.
- [152] Matusiak, A., Kuczer, M., Czarniewska, E., Rosiński, G., & Kowalik-Jankowska, T. (2014). Copper (II) complexes of alloferon 1 with point mutations (H1A) and (H9A) stability structure and biological activity. *Journal of inorganic biochemistry*, 138, 99-113.
- [153] Kumar, S., Rai, A. K., Rai, S. B., & Rai, D. K. (2010). Infrared and Raman spectra of Histidine: an ab initio DFT calculations of Histidine molecule and its different protonated forms. *Indian Journal of Physics*, 84(5), 563-573.
- [154] Van Hong Nguyen, B. J. L. (2017). Protein corona: a new approach for nanomedicine design. *International journal of nanomedicine*, 12, 3137.
- [155] Strojjan, K., Leonardi, A., Bregar, V. B., Križaj, I., Svete, J., & Pavlin, M. (2017). Dispersion of nanoparticles in different media importantly determines the composition of their protein corona. *PLoS one*, 12(1), e0169552.
- [156] Schwaminger, S. P., Anand, P., Borkowska-Panek, M., Blank-Shim, S. A., Fraga García, P., Fink, K., ... & Wenzel, W. (2019). Rational Design of Iron Oxide Binding Peptide Tags. *Langmuir*.
- [157] Schwaminger, S. P., Blank-Shim, S. A., Scheifele, I., Pipich, V., Fraga-García, P., & Berensmeier, S. (2019). Design of Interactions Between Nanomaterials and Proteins: A Highly Affine Peptide Tag to Bare Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Protein Separation. *Biotechnology journal*, 14(3), 1800055.

- [158] Casals, E., Pfaller, T., Duschl, A., Oostingh, G. J., & Puntès, V. (2010). Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS nano*, 4(7), 3623-3632.
- [159] Casals, E., Pfaller, T., Duschl, A., Oostingh, G. J., & Puntès, V. F. (2011). Hardening of the nanoparticle-protein corona in metal (Au, Ag) and oxide (Fe₃O₄, CoO, and CeO₂) nanoparticles. *Small*, 7(24), 3479-3486.
- [160] Blank-Shim, S. A., Schwaminger, S. P., Borkowska-Panek, M., Anand, P., Yamin, P., Fraga-García, P., ... & Berensmeier, S. (2017). Binding patterns of homo-peptides on bare magnetic nanoparticles: Insights into environmental dependence. *Scientific reports*, 7(1), 14047.
- [161] Del Pino, P., Pelaz, B., Zhang, Q., Maffre, P., Nienhaus, G. U., & Parak, W. J. (2014). Protein corona formation around nanoparticles—from the past to the future. *Materials Horizons*, 1(3), 301-313.
- [162] Xu, P., Zeng, G. M., Huang, D. L., Feng, C. L., Hu, S., Zhao, M. H., ... & Liu, Z. F. (2012). Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: a review. *Science of the Total Environment*, 424, 1-10.
- [163] AlSalka, Y., Granone, L. I., Ramadan, W., Hakki, A., Dillert, R., & Bahnemann, D. W. (2019). Iron-based photocatalytic and photoelectrocatalytic nano-structures: Facts, perspectives, and expectations. *Applied Catalysis B: Environmental*, 244, 1065-1095.
- [164] Goyal, A., Kapoor, S., Samuel, P., & Singhal, S. (2016). Magnetically Retrievable Modified Nickel Ferrite Nanoparticles: Efficient Catalytic Reduction of Nitroarenes and Photo-oxidation of Hazardous Dyes. *Analytical Chemistry Letters*, 6(2), 98-123.
- [165] Tung, W. S., & Daoud, W. A. (2009). New approach toward nanosized ferrous ferric oxide and Fe₃O₄-doped titanium dioxide photocatalysts. *ACS applied materials & interfaces*, 1(11), 2453-2461.
- [166] Mangrulkar, P. A., Polshettiwar, V., Labhsetwar, N. K., Varma, R. S., & Rayalu, S. S. (2012). Nanoferrites for water splitting: unprecedented high photocatalytic hydrogen production under visible light. *Nanoscale*, 4(16), 5202-5209.
- [167] Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., Debut, A., Galeas, S., & Guerrero, V. H. (2016). Phytosynthesis and photocatalytic activity of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles using the Andean blackberry leaf. *Materials Chemistry and Physics*, 179, 310-315.
- [168] Hu, X. D., Zhang, H. Q., & Cao, D. M. (2011). Synthesis of Fe₃O₄ nanocrystals and application in photocatalytic degradation of levofloxacin lactate. In *Materials Science Forum* (Vol. 688, pp. 376-382). *Trans Tech Publications*.
- [169] Rabbani, M., Rafiee, F., Ghafuri, H., & Rahimi, R. (2016). Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles via a fast and facile mechanochemical method: Modification of surface with porphyrin and photocatalytic study. *Materials Letters*, 166, 247-250.

- [170] Hosseinian, A., Rezaei, H., & Mahjoub, A. R. (2011). Preparation of nanosized iron oxide and their photocatalytic properties for congo red. *World Academy Sci Eng Technol*, 52, 736-739.
- [171] Reza, K. M., Kurny, A., & Gulshan, F. (2016). Photocatalytic degradation of methylene blue by magnetite+ H₂O₂+ UV Process. *International Journal of Environmental Science and Development*, 7(5), 325.
- [172] Giri, S. K., & Das, N. N. (2016). Visible light induced photocatalytic decolourisation of rhodamine B by magnetite nanoparticles synthesised using recovered iron from waste iron ore tailing. *Desalination and Water Treatment*, 57(2), 900-907.
- [173] Mishra, P. M., Naik, G. K., Nayak, A., & Parida, K. M. (2016). Facile synthesis of nano-structured magnetite in presence of natural surfactant for enhanced photocatalytic activity for water decomposition and Cr (VI) reduction. *Chemical Engineering Journal*, 299, 227-235.
- [174] Reynoso-Soto, E. A., Pérez-Sicairos, S., Reyes-Cruzaley, A. P., Castro-Riquelme, C. L., Félix-Navarro, R. M., Paraguay-Delgado, F., ... & Lin-Ho, S. W. (2013). Photocatalytic degradation of nitrobenzene using nanocrystalline TiO₂ photocatalyst doped with Zn ions. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 57(4), 298-305.
- [175] Pérez-Sicairos, S., Corrales-López, K. A., Hernández-Calderón, O. M., Salazar-Gastélum, M. I., & Félix-Navarro, R. M. (2016). Photochemical degradation of nitrobenzene by S₂O₈²⁻ ions and UV radiation, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 32(2), 227-236.
- [176] Cai, Z., Fu, J., Du, P., Zhao, X., Hao, X., Liu, W., & Zhao, D. (2018). Reduction of nitrobenzene in aqueous and soil phases using carboxymethyl cellulose stabilized zero-valent iron nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 332, 227-236.
- [177] Nezamzadeh-Ejhieh, A., & Shirzadi, A. (2014). Enhancement of the photocatalytic activity of ferrous oxide by doping onto the nano-clinoptilolite particles towards photodegradation of tetracycline. *Chemosphere*, 107, 136-144.
- [178] Khataee, A., Taseidifar, M., Sheydaei, M., Khorram, S., & Woo Joo, S. (2016). Sonocatalytic Degradation of Basic Blue 3 Using Plasma-treated Magnetite Nanostructures. *Current Nanoscience*, 12(1), 125-134.
- [179] ElMetwally, A. E., Eshaq, G., Al-Sabagh, A. M., Yehia, F. Z., Philip, C. A., Moussa, N. A., & ElShafei, G. M. (2019). Insight into heterogeneous Fenton-sonophotocatalytic degradation of nitrobenzene using metal oxychlorides, *Separation and Purification Technology*, 210, 452-462.
- [180] Nezamzadeh-Ejhieh, A., & Shirzadi, A. (2014). Enhancement of the photocatalytic activity of ferrous oxide by doping onto the nano-clinoptilolite particles towards photodegradation of tetracycline. *Chemosphere*, 107, 136-144.

- [181] C.F. Chee, B.F. Leo, C.W. Lai, *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery*, in: *Appl. Nanocomposite Mater. Drug Deliv.*, 2018: pp. 861–903. doi:10.1016/b978-0-12-813741-3.00038-8.
- [182] H. Okumura, S. Endo, S. Joonwichien, E. Yamasue, K.N. Ishihara, *Magnetic field effect on heterogeneous photocatalysis*, *Catal. Today*. 258 (2015) 634–647. doi:10.1016/j.cattod.2014.12.048.
- [183] Y.H. Wang, J.L. Zhao, Y. Liang, *Degradation kinetics of phenol by a titanium dioxide photocatalyst coupled with a magnetic field*, *React. Kinet. Mech. Catal.* 109 (2013) 273–283. doi:10.1007/s11144-012-0537-y.
- [184] T. Xie, L. Xu, C. Liu, J. Yang, M. Wang, *Magnetic composite BiOCl-SrFe₂O₉: A novel p-n type heterojunction with enhanced photocatalytic activity*, *Dalt. Trans.* 43 (2014) 2211–2220. doi:10.1039/c3dt52219a.
- [185] S. Feng, H. Du, T. Xie, L. Xu, Y. Wang, *Preparation and photocatalytic activity of BiOI/Mn_xZn_{1-x}Fe₂O₄ magnetic photocatalyst*, *Ceram. Int.* 45 (2019) 10468–10474. doi:10.1016/j.ceramint.2019.02.108.
- [186] Salaices, M., Serrano, B., & de Lasa, H. I. (2001). *Photocatalytic conversion of organic pollutants extinction coefficients and quantum efficiencies*. *Industrial & engineering chemistry research*, 40(23), 5455-5464.
- [187] Li, Y., Dong, X., & Li, J. (2011). *Synthesis and characterization of super paramagnetic composite photocatalyst—Titania/silica/nickel ferrite*. *Particuology*, 9(5), 475-479.
- [188] Modi, K. B., Natarajan, K., Kathad, C. R., Shah, S. J., Raval, P. Y., Pathak, T. K., ... & Tayade, R. J. (2016, May). *Synthesis and characterization of ferrite-semiconductor nano composite for photocatalytic degradation of aqueous nitrobenzene solution*. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1728, No. 1, p. 020395). AIP Publishing.
- [189] Ayati, A., Tanhaei, B., Bamoharram, F. F., Ahmadpour, A., Maydannik, P., & Sillanpää, M. (2016). *Photocatalytic degradation of nitrobenzene by gold nanoparticles decorated polyoxometalate immobilized TiO₂ nanotubes*. *Separation and Purification Technology*, 171, 62-68.
- [190] Yang, Y., Xia, G. Z., Liu, C., Zhang, J. H., & Wang, L. J. (2015). *Effect of Li (I) and TiO₂ on the upconversion luminance of Pr: Y₂SiO₅ and its photodegradation on nitrobenzene wastewater*. *Journal of Chemistry*, 2015.
- [191] Zhou, W., Pan, K., Qu, Y., Sun, F., Tian, C., Ren, Z. & Fu, H. (2010). *Photodegradation of organic contamination in wastewaters by bonding TiO₂/single-walled carbon nanotube composites with enhanced photocatalytic activity*. *Chemosphere*, 81(5), 555-561.

- [192] Crişan, M., Mardare, D., Ianculescu, A., Drăgan, N., Niţoi, I., Crişan, D., & Dobromir, M. (2018). Iron doped TiO₂ films and their photoactivity in nitrobenzene removal from water. *Applied Surface Science*, 455, 201-215.
- [193] Srilakshmi, C., Saraf, R., & Shivakumara, C. (2015). Effective degradation of aqueous nitrobenzene using the SrFeO₃- δ photocatalyst under UV illumination and its kinetics and mechanistic studies. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 54(32), 7800-7810.
- [194] Jo, W. K., Won, Y., Hwang, I., & Tayade, R. J. (2014). Enhanced photocatalytic degradation of aqueous nitrobenzene using graphitic carbon-TiO₂ composites. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(9), 3455-3461.
- [195] Nitoi, I., Oancea, P., Raileanu, M., Crisan, M., Constantin, L., & Cristea, I. (2015). UV-VIS photocatalytic degradation of nitrobenzene from water using heavy metal doped titania. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 677-682.
- [196] Whang, T. J., Hsieh, M. T., Shi, T. E., & Kuei, C. H. (2012). UV-Irradiated photocatalytic degradation of nitrobenzene by titania binding on quartz tube. *International Journal of Photoenergy*, 2012.
- [197] Jiang, Y., Wei, L., Yang, K., & Wang, H. (2019). Investigation of rapid granulation in SBRs treating aniline-rich wastewater with different aniline loading rates. *Science of The Total Environment*, 646, 841-849.
- [198] Gorski, C. A., & Scherer, M. M. (2009). Influence of magnetite stoichiometry on FeII uptake and nitrobenzene reduction. *Environmental science & technology*, 43(10), 3675-3680.
- [199] Yang, Z., Ma, X., Shan, C., Guan, X., Zhang, W., Lv, L., & Pan, B. (2019). Activation of zero-valent iron through ball-milling synthesis of hybrid Fe⁰/Fe₃O₄/FeCl₂ microcomposite for enhanced nitrobenzene reduction. *Journal of Hazardous Materials*.