

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE GENERAL SAN MARTIN
COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA
INSTITUTO DE TECNOLOGÍA
“Prof. Jorge A. Sabato”**

**Síntesis de nanocápsulas
liposoma@*am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O
como precursores de nanoesferas huecas de óxido de
cerio (*)**

Por Ing. César Rodrigo Perugachi Benalcázar

Director

**Dr. Alberto E. Regazzoni
Dr. Martin G. Bellino**

(*) Tesis para optar al título de Magister en Ciencia y Tecnología de Materiales

República de Argentina

2015

*Esta tesis se la dedico a mi esposa,
Priscilla,
y a mis hijos,
Alessia y Emiliano,
por su constante apoyo y por ser el motor
en la culminación de este trabajo.*

*También va dedicado a mis padres,
Tarquino y Guadalupe,
por haber estado siempre pendientes de
mi formación personal y profesional.*

RESUMEN

Se obtuvieron nanoesferas huecas de óxido de cerio a partir de la síntesis de nanocápsulas híbridas y su subsecuente tratamiento térmico. Las nanocápsulas híbridas resultaron de la formación de carbonato básico de cerio amorfo, $am\text{-Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, sobre liposomas de fosfatidilcolina; estos últimos utilizados como molde para proveer la forma esférica y estructura hueca.

La forma y el interior hueco de las nanoesferas de óxido de cerio fueron evidenciadas por microscopía electrónica de barrido y de transmisión. La determinación de tamaño de partículas por espectroscopia de correlación fotónica e imágenes de microscopía electrónica de barrido demostraron que el método de alcalinización homogénea por hidrólisis forzada de la urea posibilita, de forma simple y reproducible, bajo ciertos cuidados, la formación de recubrimiento de $am\text{-Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ sobre los liposomas, y que dicho espesor puede ser controlado variando la concentración de nitrato de cerio y la cantidad de liposomas.

Se determinó que para garantizar la preparación de nanocápsulas híbridas monodispersas es importante partir de un sistema de liposomas monodispersos, asegurar su estabilidad, antes y durante la formación del recubrimiento, y asegurar que la nucleación sea exclusivamente heterogénea. La estabilidad de los liposomas es posible mediante la adecuada selección de temperatura, concentración de nitrato de cerio y urea; así mismo, la temperatura y tiempos de síntesis deben seleccionarse de tal forma que la velocidad de hidrólisis de urea permita la precipitación total de $am\text{-Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ en tiempos que sean lo suficientemente cortos para evitar la transformación de los recubrimientos en $\text{Ce}_2\text{O}(\text{CO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ cristalino, para que el compuesto amorfo copie la morfología del molde sin producir tensiones sobre las membranas de los liposomas. Por otro lado, para asegurar que la nucleación del compuesto precipitado sea exclusivamente heterogénea, es necesario seleccionar las concentraciones iniciales de nitrato de cerio, urea y la temperatura de síntesis.

Palabras claves:

Óxido de cerio, carbonato básico de cerio, alcalinización homogénea, método de la urea, liposomas, partículas núcleo-cáscara, nanoesferas huecas, nanoestructuras.

ABSTRACT

Hollow nanospheres of cerium oxide were obtained after the thermal treatment of hybrid nanocapsules that were prepared by coating liposomes with amorphous cerium (III) basic carbonate, $am\text{-Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Liposomes made of phosphatidilcoline were used as template to provide the spherical shape and hollow structure of the liposome@ $am\text{-Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ nanocapsules.

The shape and hollow interior of the CeO_2 nanospheres were assessed by scanning and transmission electron microscopy. Nanocapsules particle size was as well determined by photon-counting correlation spectroscopy. Results obtained with both techniques demonstrate that homogeneous alkalization by urea hydrolysis is a suitable synthesis procedure to produce liposome@ $am\text{-Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ nanocapsules, once certain cares are adequately handled. Furthermore, they indicate that the thickness of their shells can be adjusted by varying the concentrations of cerium nitrate and the amount of liposome.

It was established that in order to obtain monodispersed hybrid nanocapsules it is instrumental to use monodispersed liposomes, to set conditions that warranty their stability throughout the entire synthesis, and to set conditions that would force nucleation of the shell to be heterogeneous, exclusively. Providing conditions for stable liposomes is possible by the adequate selection of temperature, and cerium nitrate and urea concentrations. Temperature and aging time must, as well, be set in such a way that the rate of urea hydrolysis allows complete precipitation of $am\text{-Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ prior its transformation into crystalline $\text{Ce}_2\text{O}(\text{CO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; in this way, the amorphous compound shall copy the spherical geometry of the template producing no significant stress on the phospholipid membrane. On the other hand, the initial concentrations of cerium nitrate and urea, and temperature, must be selected in order to achieve a single event of heterogeneous nucleation.

Keywords:

Cerium oxide; cerium basic carbonate; homogeneous alkalization; urea method; liposomes; core@shell particles; hollow nanospheres; nanostructures.

Parte de los resultados presentados en este trabajo de Tesis fueron presentados en los siguientes congresos:

First International Nanotechnology Congress *Rubén Orellana*, Quito, Ecuador, Junio 2010.

Hybrid Nanocapsules of Rare Earth Compounds

R. Perugachi, M.G. Bellino, L. Hermida y A.E. Regazzoni.

XVII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica, Córdoba, Mayo 2011.

Nanoesferas Huecas de Óxido de Cerio: Usando Moldes Blandos

A.M. Manzini, R. Perugachi, M.G. Bellino y A.E. Regazzoni.

Este trabajo de Tesis fue parte del proyecto *Materiales nanoestructurados con porosidad jerárquica. Propiedades dependientes de la escala de texturación y de la localización espacial de funciones*, PICT'08 1848 (ANPCyT), 2010-2012, desarrollado en la Gerencia Química, Centro Atómico Constituyentes, CNEA, bajo la dirección del Dr. Galo J.A.A. Soler-Illia.

Agradecimientos

A la hora de escribir esta tesis me siento satisfecho al tener la sensación de que se está cerrando una etapa en mi formación profesional y personal. Y no quisiera cerrar esta etapa sin mostrar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que han sido fundamentales para hacer esta tesis.

Principalmente a mis directores de tesis, Alberto Regazzoni y Martín Bellino, por confiar en mí y guiarme con su valiosa experiencia.

También quiero agradecer a la Gerencia de Química del CAC-CNEA y a todo su grupo que hicieron que mi estadía sea más placentera.

Al Dr. Alejandro Wolosiuk de Gerencia de Química, CAC-CNEA, por su valiosa colaboración en la caracterización de partículas por Espectroscopia de Correlación Fotónica.

A la Lic. Ayelen Manzini por su colaboración en ensayos de laboratorio.

A la Dra. Patricia Bozzano del Laboratorio de Microscopia Electrónica CAC-CNEA por su colaboración en los análisis de microscopía electrónica de transmisión.

A la Dra. Gabriela Leyva del Departamento de Física de la Materia Condensada, CAC-CNEA por su colaboración en análisis térmicos.

A la Dra. Laura Hermida del Laboratorio de Sistemas de Liberación Controlada de Instituto Nacional de Tecnología Industrial.

A la Dra. Claudia Marchi del Centro de Microscopías Avanzadas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por su colaboración en los análisis de microscopía electrónica de barrido

A la Secretaria Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) del Ecuador por otorgarme la beca parcial de postgrado en el exterior.

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) por su auspicio y apoyo durante todo el postgrado.

A la Dra. Cecilia Paredes, Vicerrectora Académica ESPOL, por la confianza y constante apoyo.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Antecedentes.	1
1.2 Objetivos.	2
1.3 Liposomas.	2
1.4 Óxidos de cerio y de otras tierras raras.	4
1.5 Precipitación en solución.	6
1.6 Precipitación homogénea de precursores de óxidos.	8
1.7 Método de la urea.	9
1.8 Planteamiento del problema.	11
CAPÍTULO II. PARTE EXPERIMENTAL.	13
2.1 Materiales de trabajo y cuidados experimentales.	13
2.2 Procedimiento experimental.	13
2.2.1 Preparación de soluciones de urea y nitrato de cerio (III).	14
2.2.2 Preparación de dispersión de liposomas (fosfatidilcolina).	14
2.2.3 Preparación de nanocápsulas híbridas liposoma@ <i>am</i> -Ce(OH)CO ₃ .xH ₂ O.	15
2.2.4 Obtención de partículas esféricas huecas de ceria.	16
2.3 Caracterización de muestras.	17
2.3.1 Espectroscopía de correlación fotónica (PCS).	17
2.3.2 Medición de pH.	20
2.3.3 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM).	20
2.3.4 Microscopía de transmisión de electrones (TEM) y Difracción de electrones por área selecta (SAED).	20
2.3.5 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).	20
2.3.6 Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA).	21
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	23
3.1 Caracterización de los liposomas.	23
3.2 Precipitación de <i>am</i> -Ce(OH)CO ₃ .xH ₂ O.	27
3.3 Recubrimiento de liposomas por <i>am</i> -Ce(OH)CO ₃ .xH ₂ O.	28
3.4 Variables de síntesis.	32
3.4.1 Efecto de la temperatura y de la velocidad de calentamiento.	32
3.4.2 Efecto de la relación de concentraciones de Ce(III) y fosfolípidos.	34
3.5 Escalado a mayores volúmenes (Scaling-up).	36
3.5.1 Efecto de la convección mecánica.	36
3.5.2 Escalado con convección natural.	38
3.6 Transformaciones de fase.	43
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES.	49
CAPÍTULO V. BIBLIOGRAFÍA	51

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN.

1.1 Antecedentes.

Las partículas esféricas huecas poseen prometedoras aplicaciones en el campo de la biomedicina, debido a que se visualizan como vehículo para almacenamiento y/o liberación controlada de medicamentos (Sun et al., 2002; Lou et al., 2008; Sasidharan et al., 2013; Wang et al., 2013). Otros campos con potenciales aplicaciones, son aquellos donde las propiedades relacionadas con la superficie son dominantes, tales como en sensores (Li et al., 2004; Wang et al., 2012) o en fotocatalizadores (Wang et al., 2007; Kartsonakis et al., 2008), debido a sus propiedades ópticas únicas y a su alta área superficial. Por ejemplo, Sun et al. (2006) demostraron que sensores de gases preparados con partículas esféricas huecas de SnO_2 reducen considerablemente el “tiempo de recuperación” del sensor (propiedad de sensibilidad) en comparación con un sensor a base de nanopulvos de SnO_2 . El estudio sugiere que este cambio de propiedad fue inducido por la estructura hueca de las partículas.

Las partículas esféricas huecas de óxido de cerio de tamaños nanométricos y micrométricos, pueden tener una amplia gama de aplicaciones en diversas áreas que van desde la catálisis (Sun et al., 2006; Wang et al., 2009; Strandwitz y Stucky, 2009; Deng et al., 2015) hasta la biomedicina. Por ejemplo, en el campo de la medicina, el uso de nanopartículas esféricas huecas de óxido de cerio permitió disminuir el tiempo de supervivencia de un cultivo de bacteria *Escherichia Coli*, bajo una reacción fotocatalítica (Kartsonakis et al., 2008).

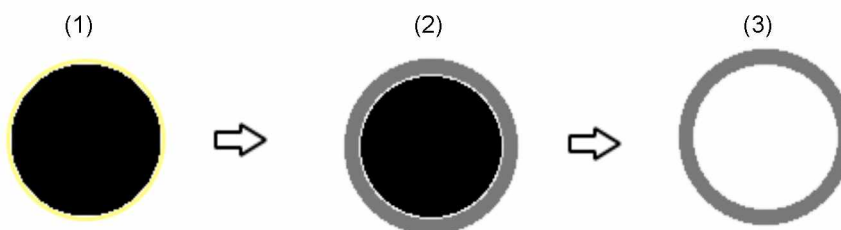


Figura 1.1 Esquema del proceso de formación de partículas esféricas huecas usando moldes duros.

Varios procedimientos han sido empleados para obtener nanoesferas y microesferas huecas de CeO_2 , con el fin de aprovechar las propiedades del óxido metálico junto a las propiedades que le podría aportar la estructura hueca. Los procedimientos encontrados en la bibliografía se basaron en la calcinación de moldes (núcleos) poliméricos (Kartsonakis et al., 2008; Deng et al., 2015) y de carbón (Titirici et al., 2006; Sun et al., 2006; Wang et al., 2009; Chen et al., 2011), y en la disolución selectiva del núcleo de SiO_2 (Strandwitz y Stucky, 2009; Guo et al., 2009) de sistemas núcleo-cáscara. De manera general, tal como se muestra en el esquema de la Figura 1.1, los

procedimientos descritos anteriormente implicaron al menos los siguientes tres pasos: (1) la preparación de los moldes esféricos duros (núcleos de sacrificio), y en algunos casos la funcionalización de su superficie; (2) el recubrimiento del molde con óxido de cerio o su precursor; y (3) la eliminación del molde esférico por calcinación o disolución selectiva.

A pesar de todos los esfuerzos citados, la utilización de moldes duros presenta desventajas intrínsecas. Por ejemplo, Lou et al. (2008) señalan que los moldes duros presentan dificultades para alcanzar altos rendimientos, y el recubrimiento tiene baja resistencia estructural en relación al molde, cuando éste es eliminado.

Por otro lado, la potencial aplicación para el almacenamiento y/o liberación controlada de alguna sustancia estaría restringida por el núcleo duro, debido a que dificulta el acceso hacia la cavidad. Estas dificultades han impulsado el interés en nuevos desarrollos de estructuras huecas, partiendo de moldes blandos que aumente las probabilidades de encapsulación, que no requieran el uso de agentes agresivos para disolver el núcleo, y que permitan su calcinación a menores temperaturas y tiempos.

Por esa razón, el presente trabajo estudia la posibilidad de utilizar liposomas como molde (blando) constituidos mayoritariamente de agua.

1.2 Objetivos.

Como objetivo general, el presente trabajo explora las posibilidades del uso del método de la urea para obtener nanocápsulas híbridas de carbonato básico de cerio amorfo como un paso intermedio a la obtención de partículas huecas de óxido de cerio.

Los objetivos específicos del trabajo son:

- Estudiar el efecto de los diferentes parámetros de síntesis, como temperatura, concentración y relación de reactivos, en el recubrimiento depositado sobre los liposomas.
- Estudiar la evolución del crecimiento de la capa depositada.
- Evaluar las transformaciones que ocurren durante la eliminación térmica del molde.

1.3 Liposomas.

Los liposomas son estructuras esféricas de fosfolípidos autoensamblados, con una cavidad central acuosa envuelta por una o más bicapas lipídicas, tal como se representa en la Figura 1.2. Sus dimensiones oscilan entre 20 nm y varias decenas de μm , mientras que el espesor de la membrana tiene aproximadamente 4 nm (Sabín et al., 2005).

Las potenciales aplicaciones de los liposomas en el campo de la biomedicina se deben a su biodegradabilidad, su ausencia de toxicidad e irritabilidad, y a su capacidad de incorporar una gran variedad de fármacos, tanto de naturaleza hidrófila (dentro de su interior acuoso) como hidrófoba (en medio de la membrana) (Sabín et al., 2005).

Por lo general, los liposomas se obtienen a partir de la extrusión de dispersiones acuosas de fosfolípidos a través de filtros con microporos de tamaños determinados, y sus propiedades dependen fuertemente de los fosfolípidos que lo conforman (Sabín, 2007). En el apartado 2.2.2 del próximo Capítulo se detalla el procedimiento que se

utilizó en este trabajo para obtener liposomas con una distribución de tamaños angosta, cercana a los 200 nm.

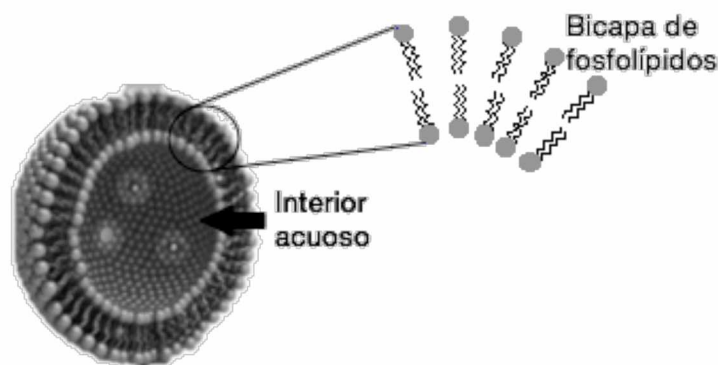


Figura 1.2 Representación de la sección transversal de un liposoma que contiene 3 elementos en su interior.

Los fosfolípidos están constituidos por: (a) una parte liófila, que suele estar formada por una cabeza polar que confiere la carga; y (b) una parte liófila, que suele estar constituida por una, dos o tres cadenas hidrocarbonadas, conformadas normalmente por un número de carbonos que oscila entre 12 y 18. En la Figura 1.3 se representa la estructura de un fosfolípido.

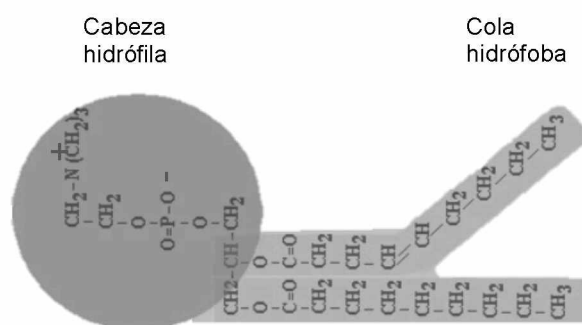


Figura 1.3. Representación de la estructura de un fosfolípido (fosfatidilcolina).

Entre las características de los liposomas se tiene:

- El **empaquetamiento**, que depende del volumen de la cabeza polar, de la longitud y del número de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos elegidos. Dependiendo del grado de empaquetamiento, la asociación de fosfolípidos conduce a estructuras en forma de lamelas, micelas esféricas, tubulares, y con forma de discos.
- La **carga superficial** de los liposomas depende de la naturaleza de los fosfolípidos, puede ser aniónica, catiónica, o zwitteriónica, y su importancia reside en que los procesos de agregación y fusión de liposomas están controlados, en gran parte, por la repulsión o atracción de las superficies lipídicas.

- La **transición de fase** se observa a una temperatura característica por debajo de la cual los fosfolípidos que componen las membranas de los liposomas presentan movilidad restringida. Por encima de esta temperatura, se producen ondulaciones en la superficie de los liposomas debido al aumento de la movilidad rotacional de las cabezas lipídicas y al menor grado de interdigitación de las cadenas hidrocarbonadas, tal como se presenta en la Figura 1.4.
- La **permeabilidad** es una característica del liposoma que lo hace especial para su aplicación como transportadores y liberación controlada de fármacos; el transporte ocurre a través de su membrana lipídica semipermeable (Sabín, 2007).

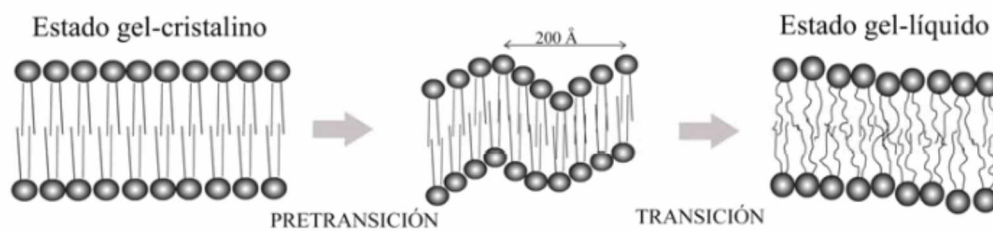


Figura 1.4 Representación de la transición de la fase gel-cristalina a la fase gel-líquida donde aumenta la fluidez de la membrana. (Sabín, 2007)

Desde el punto de vista termodinámico los liposomas son inestables y tienden de forma natural a agregarse o fusionarse para disminuir su energía superficial, tal como se representa en la Figura 1.5. Si los liposomas permanecen estables en un medio acuoso, es como consecuencia de la existencia de un mecanismo estabilizador (repulsión electrostática, impedimentos estéricos, fuerzas de hidratación). Por ello, los liposomas pueden agregarse o fusionarse o incluso destruirse, si llegasen a existir agentes externos que los desestabilicen, como por ejemplo alcohol, o la presencia de iones mono, bi y trivalentes en altas concentraciones.

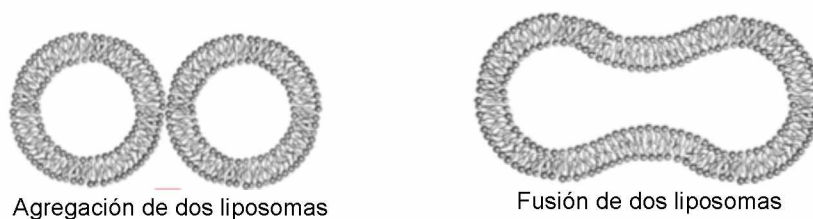


Figura 1.5 Representación de la agregación y fusión de dos liposomas. (Sabin, 2007)

1.4 Óxidos de cerio y de otras tierras raras.

Las tierras raras incluyen al itrio, al lantano y a los 14 elementos de la serie de los lantánidos (cerio, praseodimio, neodimio, promecio, samario, europio, gadolinio, etc.). Los compuestos de tierras raras forman una amplia familia de materiales funcionales con varias aplicaciones en el campo eléctrico, magnético, óptico y de la catálisis, debido a sus electrones 4f (Yan y Yan, 2008).

Las importantes aplicaciones de los óxidos de tierras raras se deben a las interesantes propiedades que estos poseen, tales como, fotoluminiscencia (Hosokawa et al., 2008; Li et al., 2010), buena estabilidad química (Leskelä et al., 2006), alta permitividad dieléctrica (Leskelä et al., 2006), y alta capacidad de almacenamiento de oxígeno (Jin et al., 2010). Por ejemplo, en el campo de la óptica, las tierras raras tienen aplicaciones como tubo de rayos catódicos y fósforos tricolor (Sun et al., 2000), en el campo de la electrónica como compuertas dieléctricas en microelectrónica (Lucovsky et al., 2004; Leskelä et al., 2006), y en el campo de la catálisis, como catalizadores para los gases de combustión de automotores (Kaspar et al., 1999) y para la transesterificación de triglicéridos con metanol para obtener biodiesel y glicerol puro (Russsbueldt y Hoelderich, 2010).

El cerio es el elemento de las tierras raras químicamente reconocido por tener dos estados de valencia estables, Ce^{+4} y Ce^{+3} . El óxido más estable del elemento es el dióxido de cerio (CeO_2), con cerio tetravalente Ce(IV) , también llamado *ceria*. Se forma cuando las sales de cerio son calcinadas en aire, o en ambientes que contengan oxígeno. El sesquióxido de cerio (Ce_2O_3), con cerio trivalente Ce(III) , puede ser preparado bajo fuertes condiciones de reducción pero es inestable en aire y agua, convirtiéndose fácilmente en dióxido. El CeO_2 , en estado puro tiene un color amarillo muy pálido, y posee una estructura cristalina tipo fluorita de grupo espacial $\text{Fm}\bar{3}\text{m}$. Su celda unitaria contiene 4 cationes y 8 aniones, y se puede visualizar como un arreglo cúbico centrado en las caras de cationes, con los aniones oxo llenando los espacios intersticiales tetraédricos.

El óxido de cerio despierta gran interés por la variedad de aplicaciones. Por ejemplo, se lo utiliza en el campo de la catálisis, para reducir la emisión de gases tóxicos de combustión automotriz en los sistemas catalizadores de tres vías debido a su alta capacidad de almacenamiento de oxígeno (Jin et al., 2010), alta densidad de defectos (vacancias de O^{2-}) (Sinha y Suzuki, 2005; Shen et al., 2005), bajo potencial redox entre Ce^{+3} y Ce^{+4} (Sinha y Suzuki, 2005) y a la alta conductividad del ión oxígeno (alta movilidad) (Kaspar et al., 1999; Mai et al., 2005; Sinha y Suzuki, 2005; Tana et al., 2009). La actividad catalítica del óxido de cerio también depende de la distorsión de la estructura (Shen et al., 2005), del tamaño de partícula (Tana et al., 2009), y de su morfología (Tana et al., 2009). En el campo de las celdas de combustible de óxido sólido, la ceria tiene potenciales aplicaciones como material de electrodo y como electrolito en celdas de combustibles de óxido sólido de temperatura intermedia, debido a su alta capacidad de transferencia de cargas, alta conductividad del ión oxígeno, baja energía de activación para la conducción y baja temperatura de trabajo (Mai et al., 2005; Jin et al., 2010; Dong et al., 2010; Zhao y Virkar, 2010).

Además, este compuesto tiene prometedoras aplicaciones en el campo de la medicina. Por ejemplo, el CeO_2 se puede utilizar como partículas terapéuticas contra el glaucoma y la ceguera (Silva, 2006), como agentes radioprotectores para evitar daños por radiación (Tarnuzzer et al., 2005; Schubert et al., 2006), como agente antibacterial (Kartsonakis et al., 2008), y como agente de transfección (transferencia de material genético externo en células) para terapias genética (Kuchma et al., 2010), debido a su alta absorbancia óptica, capacidad de captación de radicales libres, baja toxicidad, y debido a que no hidroliza el ácido desoxirribonucleico.

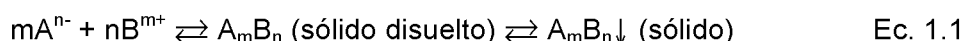
Muchas estrategias han sido utilizadas para obtener partículas de óxido de cerio con diferentes formas y tamaños a través de síntesis de un solo paso o mediante la obtención de una especie intermedia precursora del óxido. Entre las estrategias más utilizadas existen las síntesis controladas vía soluciones tales como el método hidrotérmico o solvotérmico o glicoltérmico a través del control de las condiciones experimentales típicas de una solución (concentración de reactivos, temperatura, tiempo, etc.) (Matijevic, 1986; Matijevic y Hsu, 1987; Hsu et al., 1988; Matijevic, 1993; Aiken et al., 1998; Mai et al., 2005; Jobbágy et al., 2006; Hosokawa et al., 2008; Tana et al., 2009; Shih et al., 2012; Thakur y Patil, 2014). Por ejemplo, se puede citar la precipitación de partículas precursoras cristalinas de óxido de cerio en forma esférica y en forma de barras a partir de alcalinización homogénea (Aiken et al., 1998) e hidrólisis forzada (Hsu et al., 1988), polvos de óxido de cerio por método de combustión asistida (Dong et al., 2010); obtención directa de nanopoliedros, nanobarras y nanocubos cristalinos de óxido de cerio por proceso hidrotérmico (Mai et al., 2005); y nanopartículas de óxido cerio vía microemulsión (Kuchma et al., 2010).

1.5 Precipitación en solución.

La precipitación es el proceso de aparición de una fase sólida a partir de una solución que esta sobresaturada con respecto a alguno de sus componentes (solute). El producto sólido que se forma se denomina precipitado y la fuerza impulsora que la origina es la sobresaturación.

La síntesis de partículas con características predeterminadas a través de la precipitación no es un proceso trivial, debido a la cantidad de parámetros que influyen en la misma. Así lo demuestra la bibliografía que profundiza en los mecanismos de este tipo de reacciones (Matijevic, 1986; Candal et al., 1993; Matijevic, 1993; Soler-Illia et al., 1998; Soler-Illia et al., 1999; Jobbágy et al., 2006). En este apartado, se pretende hacer una revisión de los fundamentos en los cuales se basa el proceso de precipitación, de manera resumida, pero haciendo énfasis en aquellos aspectos que se han considerado más relevante para el entendimiento de los objetivos del presente trabajo.

En el proceso de precipitación intervienen equilibrios químicos que tienen lugar entre la fase sólida y la fase líquida, tal como se describe en la Ecuación 1.1.



Estudiando el equilibrio químico de una reacción es posible determinar si una reacción de precipitación ocurre o no, por ello es importante considerar los conceptos de solubilidad y producto de solubilidad. La solubilidad “s” es la máxima cantidad de soluto que puede estar disuelta en la solución, y en general, para la mayoría de las sustancias hay un aumento de solubilidad con la temperatura. El producto de solubilidad “K_s” es el producto de las actividades de los iones que constituyen el sólido poco soluble en la solución saturada. Al tratarse de soluciones diluidas, las actividades pueden sustituirse por concentraciones, por lo tanto, el producto de solubilidad será igual al producto de las concentraciones de los iones del sólido disuelto según la Ecuación 1.2.

$$K_s = [A^{n-}]^m [B^{m+}]^n \quad \text{Ec. 1.2}$$

Según la Ecuación 1.2, si este equilibrio se rompe por disminución de las concentraciones de los iones, entonces, el sólido se disolverá hasta recuperar el equilibrio, dado que el producto de solubilidad rige el equilibrio que se establece en una

disolución saturada. Por otro lado, si las concentraciones iónicas aumentan en la solución, la parte disuelta precipitará hasta alcanzar nuevamente el equilibrio.

Haciendo uso de la Ecuación 1.2 y asumiendo que un ión A^{n-} puede combinarse con el ión B^{m+} para formar el precipitado A_mB_n , entonces, al añadir progresivamente el ión B^{m+} a la disolución que contiene A^{n-} , se producirá precipitado del compuesto A_mB_n cuando B^{m+} exceda la concentración correspondiente al límite de solubilidad, expresada en función del producto de solubilidad en la Ecuación 1.3.

$$[B^{m+}] > \left(\frac{K_s}{[A^{n-}]^m} \right)^{1/n} \quad \text{Ec. 1.3}$$

La fuerza impulsora de la precipitación está dada por la Ecuación 1.4

$$\Delta G = -RT \ln(I_p/K_s) < 0 \quad \text{Ec.1.4}$$

Donde ΔG es el cambio de energía libre de Gibbs que acompaña la formación de un mol de precipitado (A_mB_n), e I_p es el producto iónico. La evaluación de factor I_p/K_s , denominado grado de saturación, permite determinar si la precipitación es posible, tal como se presenta en la Tabla 1.1

Tabla 1.1 Evaluación de la constante K_s vs I_p

$I_p/K_s = 1$	La disolución está saturada.	<u>Hay equilibrio de solubilidad.</u> Se disuelve el sólido en la misma extensión en que los iones disueltos pasan al precipitado.
$I_p/K_s > 1$	La disolución está sobresaturada.	<u>Se formará precipitado.</u> Precipita hasta que la concentración de sus iones en solución sea la que permita su K_s
$I_p/K_s < 1$	La disolución está subsaturada.	<u>El sólido se disuelve.</u>

El proceso de precipitación de sólidos en una solución comprende dos etapas. La primera etapa se denomina *nucleación* (o formación de núcleos estables), y la segunda *crecimiento*. La etapa de nucleación se inicia con la formación de embriones que alcanzan el carácter de núcleo estable cuando el tamaño de la partícula supera un cierto tamaño crítico. Este tamaño crítico está relacionado con el requisito de la teoría clásica de precipitación que exige que el sistema sobrepase una determinada barrera energética para poder precipitar; en otras palabras, que se alcance un cierto grado de sobresaturación, llamado crítico. La altura de esta barrera está dada por:

$$\Delta G^* = -RT \ln(I_p^*/K_s) \quad \text{Ec. 1.5}$$

Cuando ΔG es menor que ΔG^* , la nucleación esta cinéticamente impedida y la precipitación no ocurre, al menos dentro de una escala temporal práctica.

La nucleación puede ser homogénea o heterogénea. La homogénea tiene lugar, de forma espontánea, en todo el volumen de la solución (siempre que se sobrepase la sobresaturación crítica), mientras que la heterogénea tiene lugar en sitios preferenciales (catalizada por una superficie) a un grado de sobresaturación menor que el necesario para que tenga lugar la nucleación homogénea.

En la etapa de crecimiento los núcleos crecen y se convierten en partículas. El crecimiento de las partículas se puede seguir experimentalmente con facilidad, razón por la cual este proceso es conocido con más detalle que la nucleación. Aparentemente, esta sería la última etapa del proceso, pero los sólidos pueden cambiar de forma, composición y estructura durante el envejecimiento de la solución. Por ejemplo, Jobbágy et al. (2006) demostró que una solución con urea y nitrato de cerio precipita partículas esféricas monodispersas de $\text{Ce}(\text{OH})\text{CO}_3$ en una hora de envejecimiento, y luego de 5 horas las partículas evolucionan a partículas elipsoidales cristalinas de $\text{Ce}_2\text{O}(\text{CO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

1.6 Precipitación homogénea de precursores de óxidos.

Una de las formas más sencillas de obtener precursores de óxidos por precipitación, consiste en agregar un agente precipitante básico (generalmente NaOH , KOH o NaHCO_3) a una solución medianamente concentrada de sales metálicas (entre 0,1 y 1 mol dm^{-3}), seguido del envejecimiento del precipitado entre 80 y 100°C (Soler-Illia, 1998). La *precipitación común* consiste en distribuir el agente precipitante en la solución, sin alcanzar homogeneidad de la mezcla. Los gradientes de concentración del agente precipitante evitan que la precipitación sea uniforme en toda la solución, tal como se ilustra en la Figura 1.6. Por otro lado, si la velocidad de agregado de la base se realiza de forma gradual para mantener el control del grado de sobresaturación, con respecto a las fases insolubles, en toda la solución, y si se tienen cuidados con la rápida distribución de la base para evitar gradientes bruscos de concentración, se puede alcanzar la denominada *precipitación homogénea*, tal como se ilustra en la Figura 1.7.



Figura 1.6. Precipitación común.



Figura 1.7. Precipitación homogénea.

Si el interés es obtener precipitados con control de tamaños (monodispersos), es necesario lograr que la precipitación tenga lugar uniformemente en todo el volumen del sistema, y tener condiciones donde las etapas de nucleación y crecimiento ocurran de forma separada. De acuerdo al modelo de LaMer y Dinegar (LaMer y Dinegar, 1950), el esquema de la Figura 1.8, permite entender los fenómenos esenciales que ocurren en dichas etapas durante la precipitación homogénea.

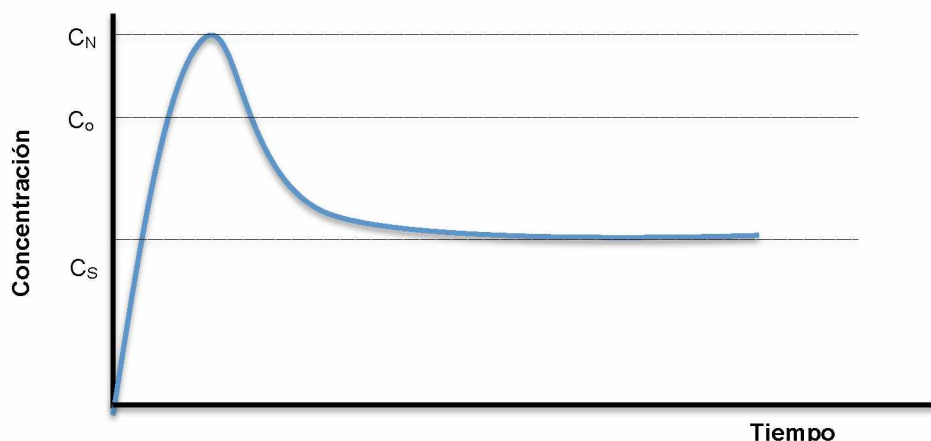


Figura 1.8. Esquema del Modelo de LaMer y Dinegar para nucleación homogénea. C_N , concentración de sobresaturación crítica; C_S , concentración de saturación; y C_O , concentración por debajo de la cual la nucleación no sería cinéticamente posible.

Mientras la concentración de la solución se encuentre subsaturada, la precipitación no va a ser posible termodinámicamente, de acuerdo a lo indicado en el apartado anterior. Siguiendo la trayectoria de la curva de la Figura 1.8, el aumento de la concentración de una especie precipitante en una solución puede ir incrementando hasta llegar a un cierto valor de sobresaturación crítica (C_N), valor donde la nucleación ocurre abruptamente. Dicha nucleación reduce la sobresaturación por debajo de un cierto valor, C_O , en el que la nucleación se convierte en un proceso extremadamente lento en comparación con el crecimiento. El crecimiento de los núcleos generados en la primera etapa transcurre, así, sin que ocurran otros episodios de nucleación, y dicho crecimiento es posible debido a la difusión de las especies iónicas en la solución. Con el tiempo, se alcanza la concentración de saturación, C_S , donde la partícula dejará de crecer.

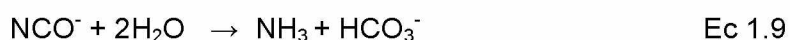
Una salida viable para controlar las etapas de nucleación y crecimiento, consiste en utilizar moléculas orgánicas, como la formamida, la acetamida o la urea, cuya hidrólisis libera agentes precipitantes (OH^- o CO_3^{2-}) que incrementan gradual y homogéneamente el pH de la solución (alcalinización homogénea) y conducen de manera general a la precipitación de hidróxidos o carbonatos básicos metálicos. Este es el caso general de la precipitación de los lantánidos, cuyos hidroxycarbonatos amorfos uniformes se transforman en Ln_2O_3 a 600°C (Matijevic y Hsu, 1987).

1.7 Método de la urea.

El método de la urea es uno de los métodos *suaves* de síntesis de hidróxidos o carbonatos básicos metálicos que se basa en la alcalinización controlada y homogénea del medio, aprovechando los iones de HCO_3^- y HO^- (agentes precipitantes o nucleófilos) producidos por la hidrólisis de la urea, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$. La producción de HCO_3^- y HO^- por hidrólisis de la urea, puede regularse eficazmente variando la temperatura de reacción, y de esta forma puede controlarse el grado de sobresaturación. La producción de iones es muy lenta por debajo de los 70°C , pero demasiado rápida por encima de los 100°C ,

dificultando el control del grado de sobresaturación (Soler-Illia et al., 1998; Matijevic y Hsu, 1987).

La reacción completa de hidrólisis de la urea en solución acuosa puede describirse según la ecuación 1.6, aunque es más compleja, ya que involucra la formación de cianato de amonio como compuesto intermediario (reversible) según la ecuación 1.7. El cianato posteriormente se descompone irreversiblemente en iones amonio y bicarbonato según las ecuaciones 1.8 y 1.9. En el primer caso (Ec. 1.8), la velocidad de hidrólisis del cianato disminuye con el incremento del pH, y en el segundo caso (Ec. 1.9), la velocidad de hidrólisis es independiente de pH.



En exceso de urea, a medida que ésta hidroliza, el pH del medio va aumentando hasta un valor no mayor a 9.2 debido a los equilibrios ácido-base de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ y $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ que actúan como buffers, según la ecuaciones 1.10 y 1.11.

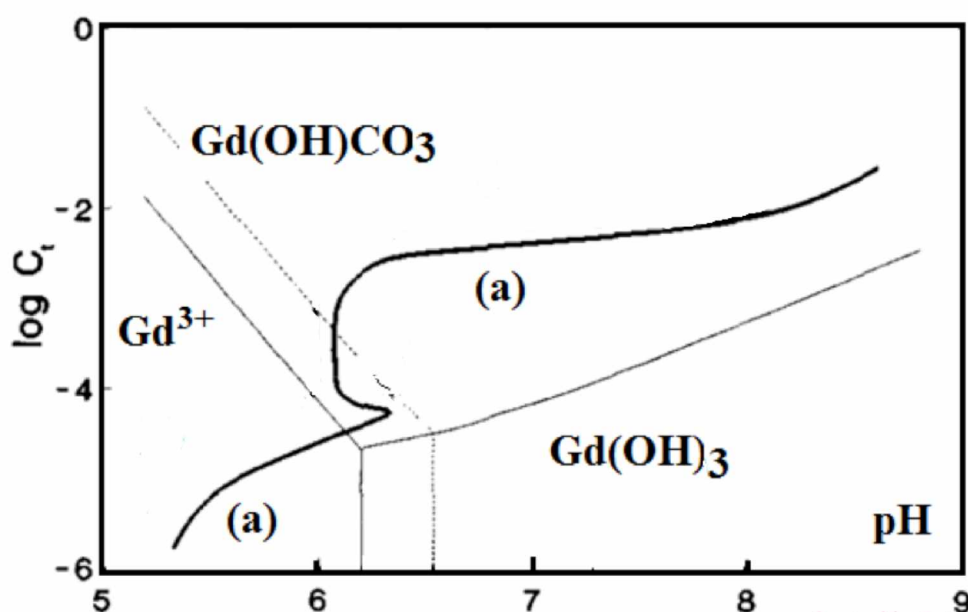


Figura 1.9 Trayectoria de una solución con $5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ de $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3$, con 0.5 mol dm^{-3} de urea y a 75°C (a) en el diagrama de fases $\text{Gd(III)-H}_2\text{O-CO}_2$. La líneas que separan la fase acuosa Gd^{3+} y la fase sólida corresponden a $5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ de $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3$ (línea continua) y $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ de $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3$ (línea segmentada). Adaptada de Candal et al. (1993).

En resumen, el método de la urea permite obtener partículas de forma controlada. Pese a que se conoce que es necesario manipular las variables típicas de la solución, tales

como el pH inicial, la presencia y concentraciones de contraiones, la temperatura y el tiempo de envejecimiento, el camino de la solución al sólido sigue siendo una incógnita en muchos casos. Por ejemplo, Candal et al. (1993) usaron el diagrama de fase Gd(III)-H₂O-CO₂ de la Figura 1.9 para conocer la trayectoria de la formación del sólido usando el método de la urea. En el trabajo se establece que los valores de sobresaturación para precipitar de Gd(OH)₃ y Gd(OH)CO₃ son similares, por lo que la precipitación de ambos sólidos debería ocurrir simultáneamente. Sin embargo, luego de la nucleación, el sistema se mueve dentro del dominio de estabilidad del Gd(OH)CO₃ y el sólido que se obtiene es el carbonato básico de gadolinio.

Jobbágy et al. (2006), partiendo de una solución 0,5 mol dm⁻³ de urea y 5 x 10⁻² mol dm⁻³ de Ce(NO₃)₃·6H₂O, obtuvieron al cabo de 1 hora de envejecimiento a 90°C, precipitados esféricos de carbonato básico de cerio (III) amorfo, con una distribución monodispersa de tamaño de 200 nm. Y mostraron que después de 5 horas de envejecimiento, estas partículas evolucionaron a elipsoides cristalinos de Ce₂O(CO₃)₂·H₂O.

1.8 Planteamiento del problema.

Las aproximaciones para obtener partículas esféricas huecas de óxido de cerio presentadas en el apartado 1.1 involucran el uso de agentes agresivos, o de tratamientos térmicos a altas temperaturas para eliminar el molde. En contexto con esta discusión, en el presente trabajo se plantea utilizar liposomas como molde de sacrificio, ya que su destrucción requiere sólo de tratamientos cortos a menores temperaturas, por estar constituidos mayoritariamente de agua. Además, el uso de liposomas podría brindar la posibilidad de encapsulamiento.

El método a utilizar para recubrir liposomas con carbonato básico de cerio (III) debe permitir un control estricto del grado de sobresaturación, de modo de precipitar una capa uniforme sobre los moldes. Debe basarse en el empleo de reactivos que eviten la agregación y/o fusión y/o destrucción de los liposomas, y debe conducir a la precipitación de sólidos amorfos con el fin de que el sólido copie con mayor facilidad la morfología del molde sin producir tensiones sobre las membranas de los liposomas.

Entre las síntesis presentadas en el apartado 1.4, el método de la urea (Matijevic y Hsu, 1987) y el de hidrólisis forzada (Hsu et al., 1988) producen partículas monodispersas, por ello, ambos métodos son previstos como los posibles métodos para controlar el tamaño del recubrimiento de los liposomas. Sin embargo, la alta acidez de los reactivos en el método de hidrólisis forzada prevén el método de la urea como la mejor opción. Adicionalmente, todos los datos reportados en el apartado 1.4, a excepción del método de la urea reportado por Jobbágy et al. (2006), obtuvieron partículas con estructura cristalina.

Los únicos trabajos reportados en la bibliografía que han utilizado liposomas como molde, se refieren a los recubrimientos con sílice (Hubert et al., 2000; Bégu et al., 2003), fosfato de calcio (Schmidt et al., 2004; Schmidt y Ostafin, 2002) y carbonato básico de itrio (Bellino y Regazzoni, 2009). El primero fue obtenido vía hidrólisis-condensación de tetraetilortosilicato, el segundo por precipitación sobre el liposoma a partir de una solución sobresaturada, y el tercero por precipitación sobre el liposoma por el método de la urea. La alta reactividad de los alcóxidos metálicos, la inestabilidad de los liposomas en medios no acuosos y la inherente dificultad en la control del grado

de sobresaturación de soluciones acuosas, hacen que el método de la urea, entre los reportes encontrados, sea el más idóneo para recubrir liposomas.

Bellino y Regazzoni (2009) demostraron que es posible recubrir liposomas a través de la alcalinización homogénea por el método de la urea sin necesidad de funcionalizar la superficie, argumentando que las cabezas polares de los fosfolípidos que conforman la superficie de los liposomas son sitios de alojamiento de iones $Y(III)$ parcialmente hidrolizados, que conducen a una nucleación heterogénea. Por otro lado, Jobbágy et al. (2006) demostró que la alcalinización homogénea por el método de la urea permite obtener partículas esféricas sólidas monodispersas de carbonato básico de cerio amorfo, $am-Ce(OH)CO_3 \cdot xH_2O$, de manera simple y reproducible, partículas que fueron transformadas en óxido de cerio a través de un tratamiento térmico. Teniendo presente la conocida similitud entre el comportamiento hidrolítico del ion ltrio y los iones lantánidos (Baes y Mesmer, 1976), es posible utilizar los resultados de los dos trabajos descritos anteriormente para poder obtener nanocápsulas híbridas de carbonato básico de cerio, $liposoma@am-Ce(OH)CO_3 \cdot xH_2O$, utilizando liposomas como molde, como un paso intermedio para finalmente obtener nanoesferas huecas de óxido de cerio por tratamiento térmico.

En relación a la selección de los liposomas, reportes de Prieto et al. (2005) y de Bellino y Regazzoni (2009) indican que es factible emplear liposomas unilaminares a partir de fosfatidilcolina natural con tamaños mayores a 50 nm, debido a que la superficie de estos liposomas podrían absorber iones Ce^{+3} y a que su estabilidad aumenta con el decrecimiento del radio de curvatura del liposomas. En conclusión, el uso de variables de síntesis muy similares a las establecidas por Bellino y Regazzoni (2009) debe mantener estable el sistema de liposomas (constituidos por fosfatidilcolina natural), y debe permitir el control del avance del grado de sobresaturación de la solución para alcanzar un único evento de nucleación (heterogénea), así como controlar el espesor de recubrimiento, aplicando los conceptos introducidos en esta sección.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL.

En este capítulo se presentan los materiales y procedimientos experimentales utilizados para la obtención de liposomas, de nanocápsulas híbridas, liposoma@*am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O, y de partículas esféricas huecas de ceria. Adicionalmente, se presentan los métodos y técnicas empleadas en su caracterización. Se han incluido breves fundamentos teóricos de cada técnica, así como las características de los equipos empleados y su aplicación dentro de este trabajo.

2.1. Materiales de trabajo y cuidados experimentales.

Para el desarrollo del trabajo se utilizaron los reactivos enlistados en la Tabla 2.1. Las soluciones de trabajo se prepararon por la dilución de soluciones más concentradas.

Tabla 2.1. Reactivos utilizados.

<i>Reactivos</i>	<i>Composición</i>
Nitrato de Cerio (III)	Ce(NO ₃) ₃ .6H ₂ O (grado analítico, marca Sigma-Aldrich).
Urea	(NH ₂) ₂ CO (grado analítico, marca Merck).
Fosfatidilcolina	Fosfatidilcolina de yema de huevo (80% pureza, Lipoid E80 de Lipoid AG).

Los recipientes utilizados para realizar las reacciones fueron frascos de vidrio de 10 ml y 550 ml con tapa rosca.

Se tuvo especial cuidado con la manipulación de los reactivos y con la limpieza de los materiales utilizados, para evitar cualquier tipo de contaminación (cationes, aniones, materia orgánica, etc.) que pudiera interferir en las síntesis. Por ello, los recipientes fueron previamente lavados con una solución alcohólica alcalina y agua bidestilada, y las soluciones de nitrato de cerio y de urea fueron previamente filtradas.

Para controlar la temperatura de reacción durante la síntesis, a menos que se indique lo contrario, se utilizó un termostato con cuba de vidrio para baño, en el cual se sumergieron los reactores.

2.2. Procedimiento experimental.

El procedimiento seguido para obtener partículas esféricas huecas de ceria se realizó en varias etapas, tal como se muestra de forma esquemática en la Figura 2.1. En la etapa 3, adicionalmente a manera de prueba, se sintetizaron partículas sólidas de *am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O; esto es, se realizaron ensayos de precipitación sin liposomas. La descripción de cada una de las etapas se detalla a continuación.

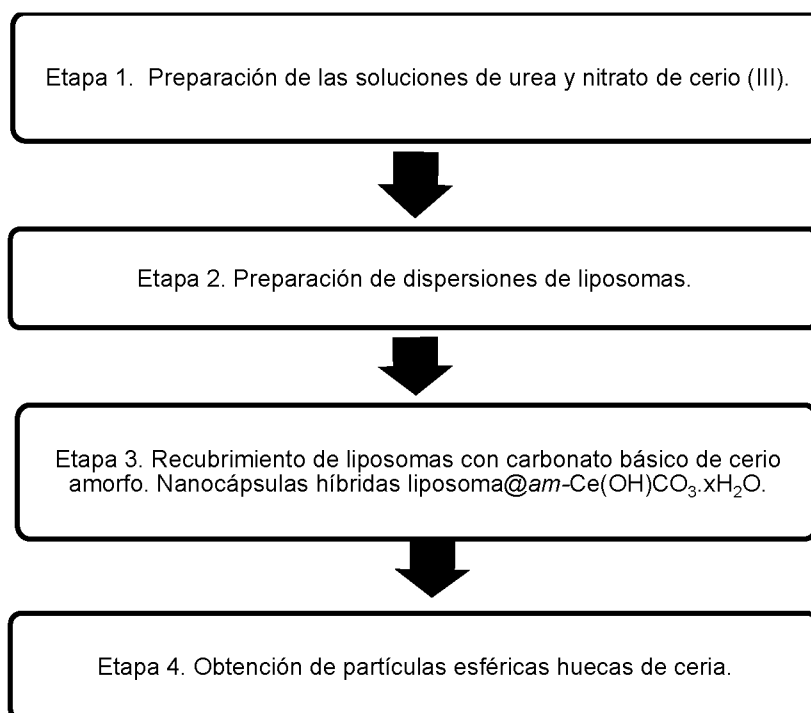


Figura 2.1 Etapas del proceso de obtención de partículas huecas de ceria.

2.2.1. Preparación de soluciones de urea y nitrato de cerio (III).

Por facilidad, el nitrato de cerio (III) y la urea fueron manejados en forma de soluciones. Con este propósito, se prepararon soluciones acuosas de nitrato de cerio (III) con agua bidestilada, a dos diferentes concentraciones, denominadas solución madre y de trabajo. La primera se preparó con una concentración de $0,8030 \text{ mol dm}^{-3}$, y la segunda, con una concentración de $0,079 \text{ mol dm}^{-3}$. Ambas soluciones fueron almacenadas a temperatura ambiente para su posterior uso. Por otro lado, se prepararon soluciones acuosas de urea con agua bidestilada, con concentraciones de $0,5$ y 2 mol dm^{-3} ; en este caso, ambas fueron concentraciones de trabajo, y realizadas en el momento en que se las iba a utilizar.

En todos los casos, las soluciones finales fueron filtradas a través de membranas con poros de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ para evitar alguna partícula que pueda interferir en la síntesis.

2.2.2. Preparación de dispersión de liposomas (fosfatidilcolina).

Para obtener una cantidad de liposomas correspondientes a 50 mg de fosfatidilcolina por ml de solución, se dispersaron 150 mg de fosfatidilcolina en 30 ml de agua bidestilada y filtrada. Esta dispersión fue agitada a 40°C (tapada con papel aluminio) durante 30 minutos aproximadamente, hasta alcanzar una dispersión homogénea de fosfolípidos; para este propósito, se empleó un agitador magnético con placa calefactora y controlador de temperatura. Posteriormente, con la finalidad de obtener una dispersión de liposomas con una distribución angosta de tamaños, cercanos a 200 nm , la dispersión fue extruida sucesivamente a través de membranas filtrantes con poros de 800 , 400 y 200 nm , tal como se ilustra en el esquema de la Figura 2.2; cada paso de extrusión se repitió al menos cuatro veces. Este procedimiento es válido para

dispersiones de fosfolípidos que contengan una concentración máxima de 400 mg lípidos/ml (Sabín, 2007).

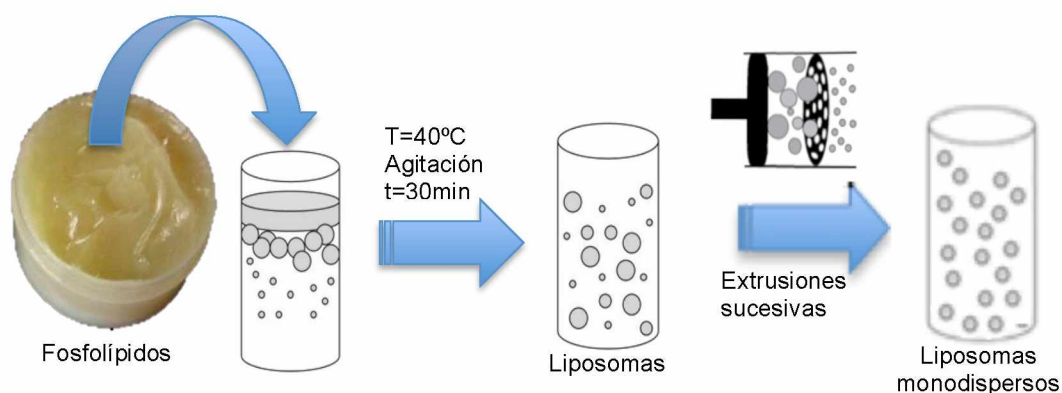


Figura 2.2 Esquema del proceso para obtener dispersiones de liposomas con tamaño cercano a 200 nm.

La dispersión final de liposomas correspondiente a 50 mg de fosfatidilcolina/ml, con tamaños cercanos a los 200 nm, se denominó dispersión madre. A partir de esta dispersión, se prepararon dispersiones de trabajo, con concentraciones de 2 y 0,5 mg de fosfatidilcolina/ml. Las dispersiones de liposomas fueron envasadas en un frasco de vidrio color ámbar y almacenadas bajo refrigeración.

En el transcurso del trabajo experimental, siguiendo este procedimiento, se obtuvieron 5 lotes de liposomas, denominados LOTE I, II, III, IV y V.

2.2.3. Preparación de nanocápsulas híbridas liposoma@*am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O.

Para explorar la formación de recubrimientos de *am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O sobre los liposomas, se realizaron cuatro conjuntos de experimentos, en reactores de 10 ml de capacidad. En estos ensayos, el volumen total de solución fue de 4 ml, concentración de urea constante de 0,5 mol dm⁻³, temperatura entre 70 y 90°C, y envejecidas entre 2 y 4 horas.

Los dos primeros conjuntos de experimentos utilizaron una concentración de nitrato de cerio de $0,5 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³, y la cantidad de liposomas correspondiente a 0,125 mg de fosfatidilcolina por ml de solución. El tercer conjunto utilizó una cantidad de liposomas constante, correspondiente a 1,5 mg de fosfatidilcolina/ml, mientras que la concentración de cerio varió entre $1,45 \times 10^{-4}$ y $2,48 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³. Y el cuarto conjunto utilizó una concentración constante de cerio de $0,5 \times 10^{-3}$ mol dm⁻³, mientras la cantidad de liposomas variaba entre 0,06 y 1,49 mg de fosfatidilcolina/ml.

Estas condiciones experimentales fueron adoptadas siguiendo aquellas establecidas en un trabajo previo (Bellino y Regazzoni, 2009).

En todos los casos descritos anteriormente, las soluciones fueron inmediatamente mezcladas en un vortex e ingresadas al baño térmico. Finalmente, con el objetivo de

detener la reacción de síntesis a un tiempo preestablecido, los reactores se sumergieron inmediatamente en agua helada (templado).

Para obtener mayor cantidad de nanocápsulas híbridas liposoma@*am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O, se utilizaron reactores de 550 ml de capacidad. En estos ensayos el volumen total de solución fue de 500 ml, y la solución tuvo una concentración de urea de 0,5 mol dm⁻³, de nitrato de cerio de 0,5 x 10⁻³ mol dm⁻³, y una cantidad de liposomas correspondiente a 0,125 mg de fosfatidilcolina/ml. La solución fue calentada a 70°C y envejecida por 4 horas. En este caso se siguieron los siguientes pasos:

1. Una solución con dispersión de liposomas y nitrato de cerio (III) fue precalentada a 70°C.
2. El reactor con la solución de liposomas y cerio (III) se retiró del baño térmico para agregar una solución de urea, de modo que la solución alcance concentraciones preestablecidas de urea, cerio y liposomas.
3. Se sumergió el reactor en el baño térmico y la solución se dejó envejecer por 4 horas.
4. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se las templó inmediatamente para detener la reacción de síntesis, con el propósito de evaluar su evolución (pH de la solución y tamaños de las partículas).
5. Al final del tiempo de envejecimiento preestablecido, la solución remanente del reactor fue también templada inmediatamente.
6. Los sólidos fueron separados del líquido sobrenadante por centrifugación y lavados repetidas veces con agua bidestilada.
7. Finalmente, éstos se almacenaron en suspensión acuosa para su inmediata caracterización.

Adicionalmente, se presenta un experimento con resultados adversos, en el que se trató de homogenizar la temperatura de 500 ml de solución a través de agitación magnética. En este experimento se utilizó una solución con concentración de urea de 0,5 mol dm⁻³, concentración de cerio (III) 4,8 x 10⁻³ mol dm⁻³, temperatura de 90°C, y la cantidad de liposomas correspondiente a 0,607 mg de fosfatidilcolina por ml de solución.

2.2.4. Obtención de partículas esféricas huecas de ceria.

Para obtener partículas esféricas huecas de CeO₂, las cápsulas híbridas liposoma@*am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O fueron sometidas a un tratamiento térmico escalonado en aire, desde temperatura ambiente hasta 600°C con escalones de 100°C, tal como se muestra en la Figura 2.3. La velocidad de calentamiento (17°C/min) y el tiempo de calentamiento (2 horas) fueron igual para todos los escalones, excepto para el primer escalón, cuya velocidad de calentamiento fue de 5°C/min y 1 hora de calentamiento.

Esta rutina de calentamiento se empleó a efectos de caracterizar la evolución de las “cápsulas” por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier en el modo Reflexión Difusa (DRIFT).

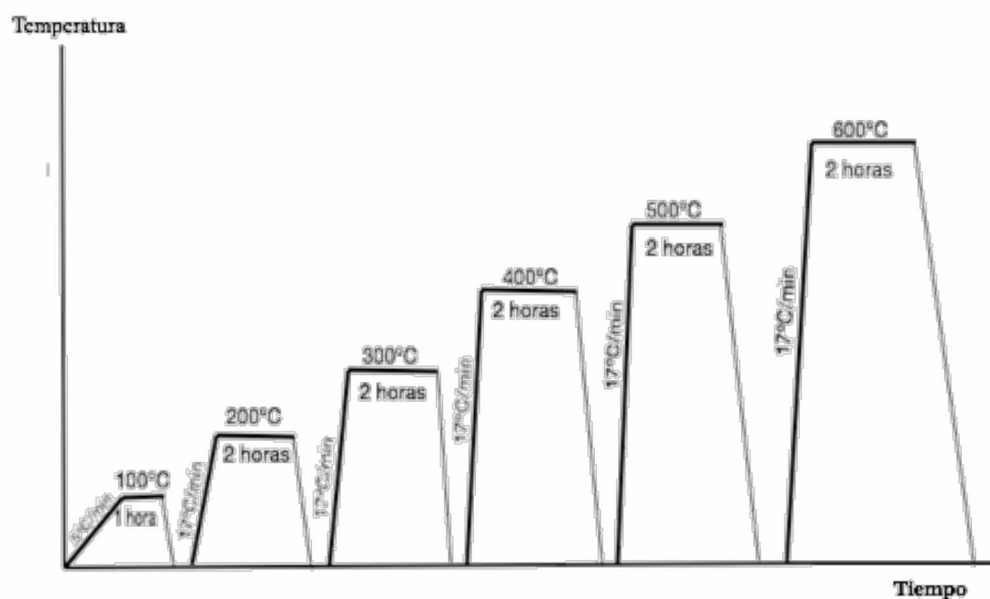


Figura 2.3 Tratamiento térmico de las nanocápsulas híbridas liposoma@am-Ce(OH)CO₃.xH₂O

2.3. Caracterización de muestras.

Las principales técnicas usadas fueron: Espectroscopia de Correlación Fotónica (PCS), Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FE-SEM), pHmetro, Microscopía de Transmisión de Electrones (TEM), Difracción de Electrones de Área Selecta (SAED) y Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) en modos Reflexión Difusa (DRIFT) y Reflectancia Total Atenuada (ATR).

Dentro de este trabajo tanto las soluciones, suspensiones y sólidos que formaron parte del estudio se caracterizaron según la técnica correspondiente, las cuales son descritas a continuación.

2.3.1. Espectroscopia de correlación fotónica (PCS).

Para la caracterización de la distribución de tamaños de partículas en suspensión, existen dos parámetros principales: el primero es el diámetro hidrodinámico promedio (diámetro efectivo) de las partículas en suspensión y el segundo es el ancho de la distribución de tamaños de partícula (polidispersidad).

El diámetro hidrodinámico que se obtiene a partir de PCS incluye el diámetro de la partícula “seca” más “algo” que está permanentemente unido a su superficie y se mueve con ella, por lo que hay que tener en consideración el tamaño de lo adherido a la partícula “seca”. Por ejemplo, partículas esféricas rígidas de 100 nm con algún surfactante de cadena corta de 2 nm adherido para otorgarle estabilidad; en este caso, la diferencia entre la partícula “seca” y el diámetro hidrodinámico es usualmente insignificante. Sin embargo, cuando la partícula es mucho más pequeña y/o las especies adheridas a la superficie son mucho más grandes (en el caso de aditivos poliméricos), entonces ahí sí puede ser significativa dicha diferencia.

La polidispersidad es una medida del ancho de la distribución de los tamaños de las partículas. Cuando la polidispersidad es igual cero, se dice que la muestra es

monodispersa, y si la polidispersidad aumenta, aumenta también el ancho de la distribución. Este parámetro aplica tanto a distribuciones monomodales como a multimodales, aunque no indica la forma de la distribución, sólo la magnitud del ancho.

La espectroscopia de correlación fotónica analiza la fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada por las partículas en disolución de bajo movimiento browniano. Las partículas grandes son más lentas y su intensidad dispersada fluctuará más, pero con una frecuencia menor que las partículas pequeñas, tal como se describe en la Figura 2.4. A partir del análisis de estas fluctuaciones se puede calcular el coeficiente de difusión, D_o , que está relacionado con el radio hidrodinámico (R_h) de las partículas a través de la ecuación Stokes-Einstein (Ec. 2.1).

$$D_o = k_B T / 3 \pi \eta d_h \quad \text{Ec. 2.1}$$

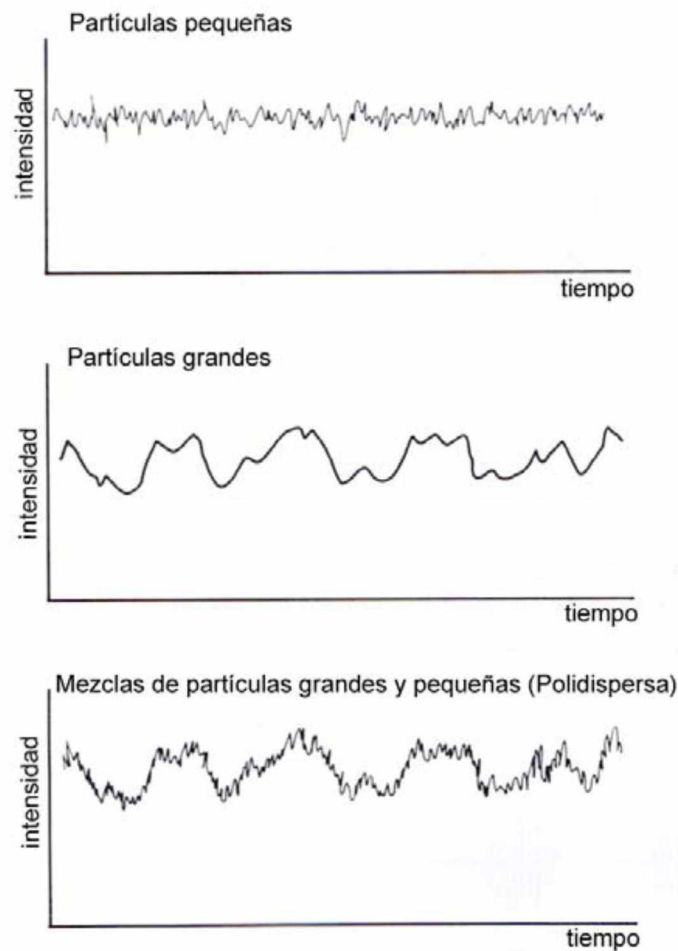


Figura 2.4 Fluctuaciones de la intensidad dispersada por las partículas pequeñas (arriba), partículas grandes (medio) y por una mezcla polidispersa de partículas grandes y pequeñas (abajo).

En la Ecuación 2.1, d_h es el diámetro hidrodinámico de las partículas, k_B es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta, y η es la viscosidad del líquido donde se mueve la partícula.

Ajuste de modelos: El algoritmo de ajuste que se utilizó en las mediciones por PCS es el algoritmo “*monomodal*” o “*cumulantes*”, el cual ajusta el algoritmo de la función de correlación a un polinomio. Este método es útil cuando las muestras son monodispersas, y no permite determinar si la muestra posee distribución bimodal o multimodal.

El primer momento del algoritmo *Cumulantes* es el promedio de la intensidad ponderada del coeficiente de difusión, es decir, no es ni la masa, ni el volumen, ni el número ponderado de diámetros de partículas. Asumiendo que la función de correlación puede ser interpretada en términos de autodifusión, entonces la medición de tamaños de partículas (diámetro efectivo) es función del promedio de la intensidad ponderada del coeficiente de difusión. Usando la ecuación Stokes-Einstein (2.1) se tiene que:

$$\text{Diámetro efectivo} = \left(\frac{1}{\overline{d_h}} \right)^{-1} \quad \text{Ec. 2.2}$$

El diámetro efectivo medido por PCS es un promedio de más de 10^5 o 10^6 datos, y es sensible a pequeñas cantidades de polvo o partículas no deseadas presentes en la solución.

El segundo momento del algoritmo *Cumulantes* es la intensidad ponderada de la varianza de la distribución del coeficiente de difusión. La varianza relativa, que llamamos polidispersidad, es una medida del ancho de la tasa de distribución de decaimiento. Cuando la polidispersidad es igual a cero, la muestra es monodispersa, y si la polidispersidad aumenta entonces hace aumentar el ancho de la distribución. Esto aplica a distribuciones monomodales y multimodales; por ello, la polidispersidad no indica la forma de la distribución, sólo su magnitud. Como una generalidad, es posible decir mediante el análisis de la distribución de tamaños por medio del algoritmo *Cumulantes* que una muestra es aceptablemente monodispersa cuando su polidispersidad es aproximadamente menor que 0,3 (Brookhaven Instruments Corporation, 1998).

Equipo empleado. La medida de diámetro efectivo y polidispersidad (p) de las partículas en suspensión fueron realizadas en un equipo Brookhaven BI-200SM que posee un láser de HeNe (de 10 mW, con una longitud de onda de 637 nm) como fuente de luz, configurado para realizar mediciones a un ángulo de 90° . El autocorrelacionador utilizado fue el digital BI-9000AT.

Con la finalidad de evitar scattering múltiple (exceso de señal al detector), las dispersiones de liposomas, liposoma@*am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O y de *am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O fueron diluidas apropiadamente. Toda las medidas se hicieron minutos después de templar los sistemas, para evitar la posible floculación de las partículas; los agregados de partículas se detectan como si estos fueran una única partícula, alterando los valores reales del diámetro efectivo y de la polidispersidad.

Los resultados de diámetro promedio y polidispersidad aquí presentados corresponden al promedio de 5 mediciones.

2.3.2. Medición de pH.

Las medidas de pH de las suspensiones fueron realizadas en un pHmetro Metrohm, usando un microelectrodo combinado y calibrado contra buffers estándares. En todos los casos el pH fue medido a temperatura ambiente.

2.3.3. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM).

Con el fin de obtener microfotografías por FE-SEM, se depositó con una micropipeta una suspensión acuosa de la muestra de interés sobre una placa de silicio del portamuestra. En el caso de muestras no conductoras, se deben conseguir depósitos muy delgados o monocapa con el fin de evitar que la muestra se cargue eléctricamente y se reduzca la calidad de la imagen.

Esta caracterización morfológica se realizó en un FE-SEM marca Cairl Zeiss, modelo DSM 982 GEMINI, del Centro de Microscopías Avanzadas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

2.3.4. Microscopía de transmisión de electrones (TEM) y Difracción de Electrones por área selecta (SAED).

Para evidenciar si los sólidos son huecos, o para determinar si las cápsulas son amorfas o cristalinas se usó microscopía electrónica de transmisión. Las muestras se colocaron sobre una rejilla de cobre.

Esta caracterización se la realizó en un TEM marca Philips, modelo EM 301, del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Centro Atómico Constituyentes, Comisión Nacional de Energía Atómica.

2.3.5. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).

Las muestras obtenidas, al igual que los liposomas, fueron caracterizados por FTIR usando un espectrofotómetro Nicolet 8700, provisto de una fuente dual IR/NIR, un detector criogénico MCT-A con ventana de CdTe, y un separador de haz de KBr, que en su conjunto permite trabajar en el intervalo $9.600 - 650 \text{ cm}^{-1}$. Los espectros se obtuvieron en los modos reflectancia total atenuada (ATR) y reflexión difusa (DRIFT), según el propósito de cada experimento.

Para ATR se usó una celda tipo bote, provista de un cristal de ZnSe de 12 reflexiones (ángulo de incidencia 45°). En este caso, se colocó un volumen determinado de las dispersiones concentradas directamente sobre el cristal de ATR y se las dejó evaporar a temperatura ambiente. Los espectros se tomaron luego de secar las películas, con una resolución de 1 cm^{-1} ; cada espectro es el promedio de 256 barridos.

Para DRIFT, se preparó una película uniforme y gruesa de nanocápsulas híbridas, depositando reiteradas veces alícuotas de una dispersión concentrada de las cápsulas sobre una placa de silicio policristalino. Esta placa se colocó luego en el portamuestra del equipo, y se tomaron los espectros con una resolución de 4 cm^{-1} , usando como referencia KBr; cada espectro es el promedio de 128 barridos.

Este procedimiento es inusual para DRIFT, donde la muestra se diluye en KBr, pero fue adoptado para explorar la evolución térmica de las cápsulas usando la menor cantidad de muestra posible.

2.3.6. Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA).

La evolución térmica de las cápsulas también fue seguida por TGA y DTA usando un equipo Shimadzu DTG-50. Las corridas fueron realizadas en aire, a tasas de calentamiento de 5°C/min desde temperatura ambiente hasta 200°C, y de 10°C/min a partir de 200°C.

Esta caracterización se la realizó en el Departamento de Física de la Materia Condensada del Centro Atómico Constituyentes, Comisión Nacional de Energía Atómica.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Caracterización de los liposomas.

La dispersión de fosfolípidos en solución acuosa conduce a la formación de liposomas, cuya distribución de tamaños depende del tamaño del poro del filtro usado en la extrusión, y en menor medida, de la cantidad de extrusiones realizadas. Los moldes (liposomas) influyen de manera directa en la distribución de tamaños de las partículas huecas de CeO_2 sintetizadas.

A continuación se presentan los resultados de distribución de tamaños de los liposomas del primer lote obtenido (Lote I), medidos por PCS, usando el algoritmo monomodal *Cumulantes*, descrita en el Capítulo II.

Los resultados correspondientes a los liposomas del Lote I, presentados en la Figura 3.1, muestran una distribución de diámetro de tipo monomodal, oscilando entre 90 y 350 nm, una moda de 190 nm, y una polidispersidad de 0,07. La distribución de tamaños obtenida es angosta, cercana al ancho de distribución de materiales de referencia (menor a 0,025) (Brookhaven Instruments Corporation, 1998).

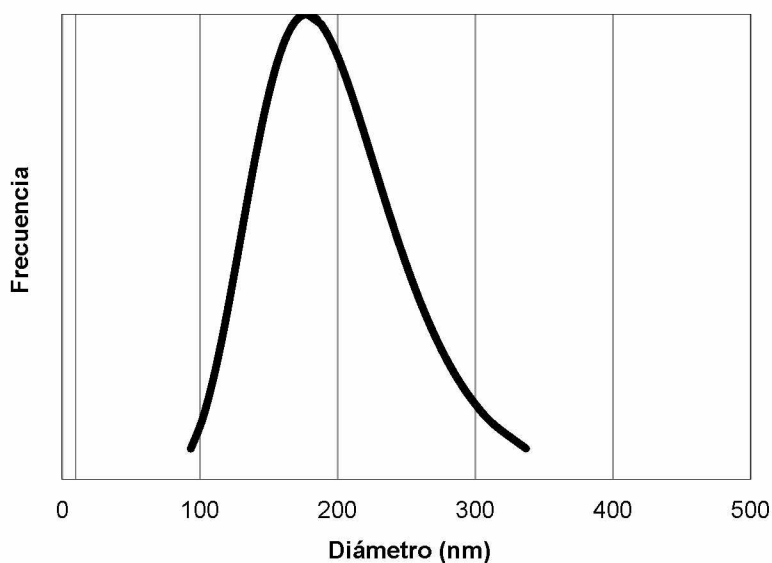


Figura 3.1. Distribución de tamaños de dispersión de liposomas (Lote I) medido por PCS.

El tamaño hidrodinámico medio y la polidispersidad de los lotes de liposomas usados en los diferentes experimentos se presentan en la Tabla 3.1. Los valores corresponden al promedio de 5 mediciones y muestran la reproducibilidad del procedimiento seguido. La desviación estándar de las 5 mediciones fue de aproximadamente ± 4 nm para el tamaño hidrodinámico medio y $\pm 0,02$ para la polidispersidad.

Tabla 3.1. Tamaño y polidispersidad de lotes de liposomas.

Lotes	Tamaño medio	Polidispersidad
I	190	0,07
II	183	0,07
III	178	0,07
IV	180	----
V	185	0,05

En la Figura 3.2 se presenta la influencia del tiempo de almacenamiento sobre el tamaño de los liposomas. Los resultados muestran que el tamaño hidrodinámico medio de los liposomas y su polidispersidad no cambian significativamente en el período evaluado.

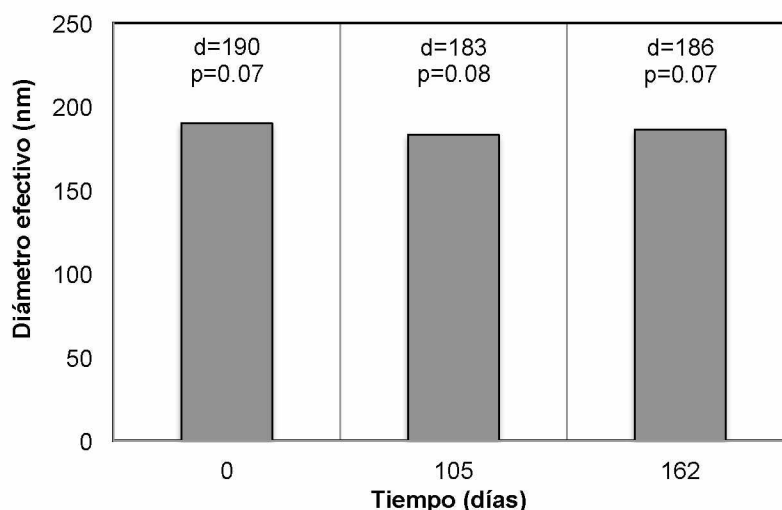


Figura 3.2. Diámetros efectivos (d) y polidispersidad (p) de la dispersión de liposomas (Lote I) durante el almacenamiento.

Desde el punto de vista termodinámico, las dispersiones de liposomas son inestables, y tienden de forma natural a agregarse o fusionarse con el fin de disminuir su energía libre superficial. La agregación se produce cuando los liposomas se adhieren unos a otros. La fusión es un posible paso posterior a la agregación, de modo que al entrar los liposomas en contacto, sus membranas se mezclan para formar una sola vesícula de mayor tamaño.

Tanto la agregación como la fusión de liposomas se reflejan como un aumento del diámetro hidrodinámico medio y su polidispersidad. De acuerdo a los resultados de la Figura 3.2 estos eventos no se evidencian de manera significativa durante el tiempo de almacenamiento evaluado.

En el proceso de recubrimiento con ceria, los liposomas son expuestos a soluciones que se encuentran a las temperaturas requeridas para lograr la hidrólisis de la urea a velocidades apreciables. La diferencia de concentraciones entre el interior y el exterior

de la membrana del liposoma podría alterar el tamaño de los liposomas por efectos de la presión osmótica, dependiendo de la permeabilidad de las membranas, propiedad que también puede verse afectada por la temperatura (Sabin, 2007).

La Figura 3.3 muestra el grado de estabilidad de los liposomas (evaluada en función de la variación de su tamaño hidrodinámico medio y polidispersidad) en presencia de urea $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, mantenida a temperatura ambiente (Condición A), y envejecida a 80°C durante 2 horas (Condición B). Los liposomas en las condiciones A y B muestran tamaños hidrodinámicos medios coincidentes con los observados en agua mientras que la polidispersidad se incrementó alrededor de dos y tres veces, en la condición A y B, respectivamente. Sin embargo, estos valores de polidispersidad aún se consideran pequeños. La constancia del tamaño hidrodinámico medio del sistema de liposomas bajo las condiciones experimentales A y B, descartan efectos significativos debido a los fenómenos de agregación y fusión, y de presión osmótica.

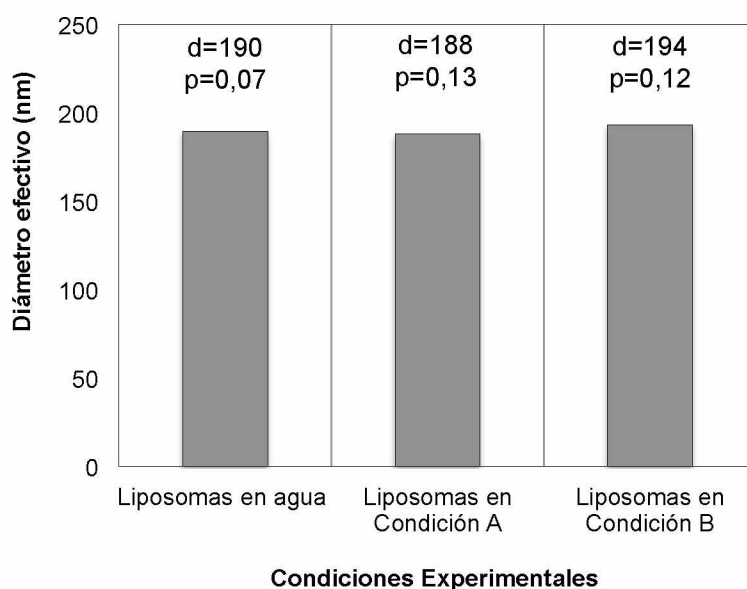


Figura 3.3. Diámetro efectivo (d) y polidispersidad (p) de liposomas (Lote I), comparado con liposomas dispersados en una solución de urea con concentración inicial de $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, bajo 2 diferentes condiciones. Condición A: temperatura ambiente. Condición B: Calentada a 80°C por 2 horas.

Sabin et al. (2005) reportó que los liposomas aumentan de tamaño cuando entran en contacto con una solución de $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ de $\text{La}(\text{NO}_3)_3$; por debajo de ese valor de concentración no se reportaron cambios sustanciales de tamaño. Teniendo en cuenta este reporte, y los resultados obtenidos bajo la condición B, es posible suponer que el tamaño de los liposomas no se verá modificado durante las condiciones de síntesis del recubrimiento, y que estos liposomas podrán ser empleados como moldes para la obtención de partículas huecas de CeO_2 .

En la Figura 3.4 se presenta el espectro infrarrojo obtenido por ATR-FTIR de los fosfolípidos utilizados para la formación de los liposomas. En concordancia con la

bibliografía, las bandas del espectro infrarrojo corresponden a la fosfatidilcolina proveniente de la yema de huevo (Frigenli, 1977; Chen y Tripp, 2008); la posición y asignación de las principales bandas infrarrojas se presentan en la Tabla 3.2.

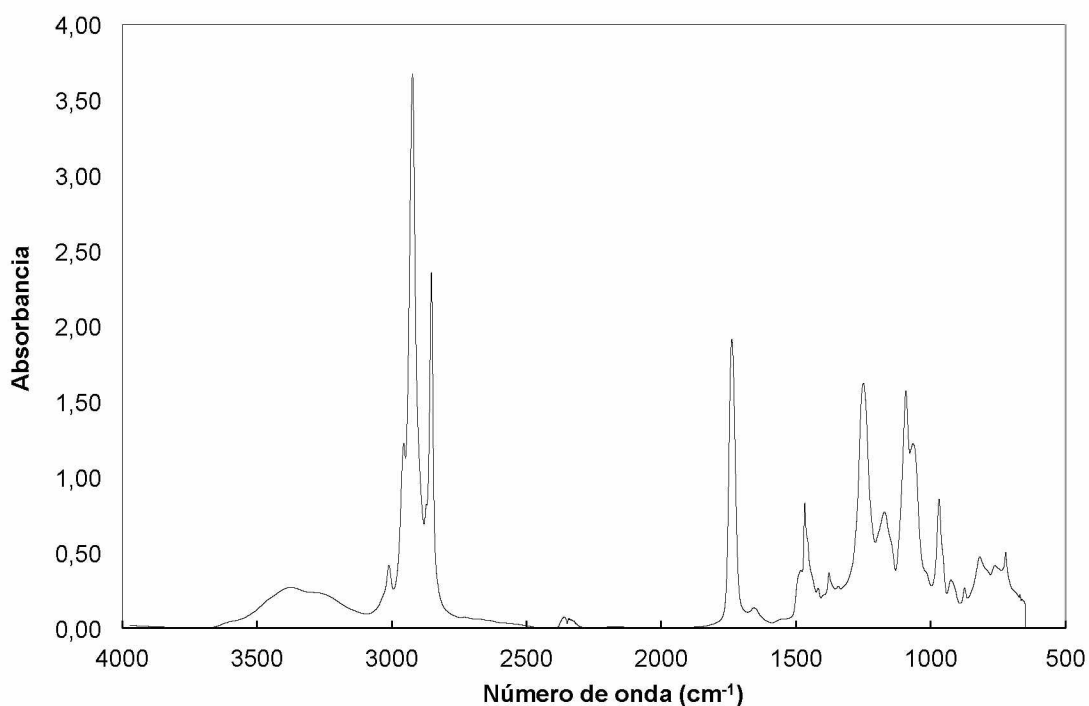


Figura 3.4. Espectro ATR-FTIR de la fosfatidilcolina utilizada para formar los moldes (liposomas).

Tabla 3.2. Asignación de las bandas IR de la fosfatidilcolina usada para formar los moldes (liposomas).

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación	Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación
3010	$\nu_{as}(CH)$	1169	$\nu_{as}(C-O-C)$
2955	$\nu_{as}(CH_3)$	1090	$\nu_s(PO_2^-)$
2920	$\nu_{as}(-CH_2-)$	1058	$\nu_s(C-O-C)$
2852	$\nu_s(-CH_2-)$	968	$\nu_{as}(^+N-CH_3)$
1735	$\nu(C=O)$	924	$\nu_s(N(CH_3)_3)$
1467	$\delta(CH_2)$	874	$\gamma_r(CH_2)$
1418	$\delta(\alpha-CH_2)$	816	$\nu_s(P(OR)_2)$
1378	$\delta_s(CH_3)$	759	$\nu_s(P(OR)_2)$
1244	$\nu_{as}(PO_2^-)$	721	$\gamma_r(CH_2)$

El estiramiento simétrico del grupo $^+N-CH_3$, que debería aparecer en 1396 cm⁻¹ (Chen y Tripp, 2008) no se incluye en la Tabla 3.2 porque éste no se observa en el espectro.

3.2 Precipitación de $am\text{-Ce}(\text{OH})\text{CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$.

La alcalinización homogénea de soluciones de nitrato de cerio por el método de la urea conduce a la formación de $am\text{-Ce}(\text{OH})\text{CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ cuya morfología de partícula, tamaño y distribución de tamaños, depende de las concentraciones de nitrato de cerio y urea, de la temperatura (Matijevic y Hsu, 1987) y del tiempo de envejecimiento (Jobbágy et al., 2006).

Como referencia, previo a la síntesis de los precursores de las partículas huecas de CeO_2 , también se investigó la reacción de precipitación de $am\text{-Ce}(\text{OH})\text{CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ en ausencia de liposomas. La Figura 3.5, presenta la evolución de la reacción de precipitación (pH de la solución y tamaños de partícula) de una solución calentada a 70°C , de concentración inicial de nitrato de cerio de $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ y de urea de $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$. Estas condiciones experimentales corresponden a las condiciones usualmente empleadas en los procedimientos de síntesis por alcalinización homogénea por hidrólisis de la urea.

La solución inició completamente transparente, y a partir de los 40 minutos se tornó abruptamente turbia. El inicio de la precipitación se pone de manifiesto por la aparición de un ligero efecto Tyndall, que va aumentando en intensidad a medida que transcurre el tiempo. Después de 6 horas de calentamiento, se observó una suspensión estable de color blanco.

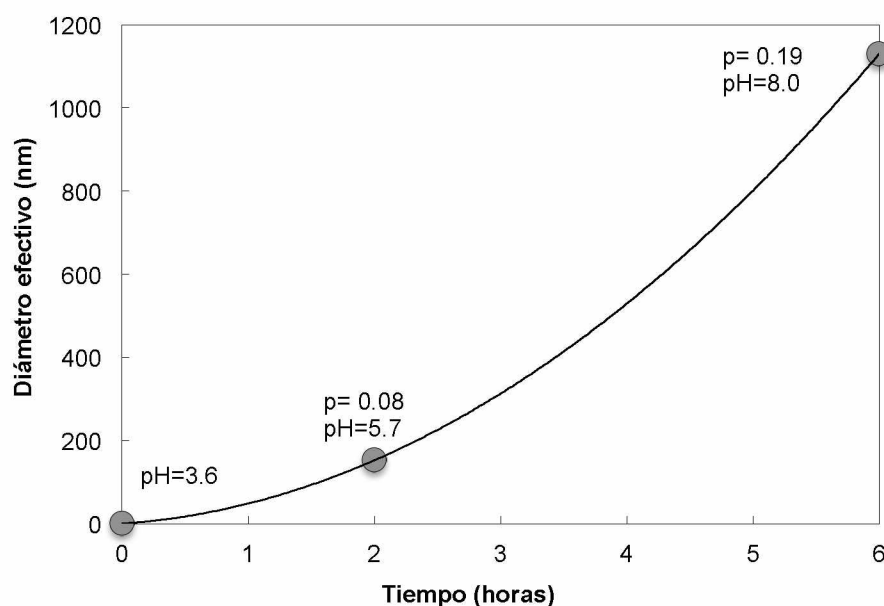


Figura 3.5. Evolución del diámetro efectivo y de la polidispersidad (p) de las partículas, junto a la evolución del de la solución. Condiciones experimentales: $[\text{Ce(III)}]_0 = 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Urea}]_0 = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, y $T = 70^\circ\text{C}$. La línea de tendencia es una guía para la vista.

En la Figura 3.5 se observa que durante las dos primeras horas el proceso de precipitación consume la base liberada por la descomposición de la urea, alcanzando un pH igual a 5,7. Después de 6 horas, la solución se torna alcalina (pH=8,0). Los

resultados de diámetro efectivo (d) y polidispersidad (p) presentados indican que las partículas alcanzaron un tamaño hidrodinámico medio de 152 nm y 1130 nm, luego de 2 y 6 horas de envejecimiento, respectivamente. Estos resultados confirman que las partículas precipitadas es función del tiempo de envejecimiento (notar el crecimiento de las partículas), y que el sistema evoluciona para dar partículas monodispersas. Esto último indica que las condiciones de síntesis fueron las apropiadas para lograr un único evento de nucleación homogénea.

3.3 Recubrimiento de liposomas por $am\text{-Ce}(\text{OH})\text{CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$.

Las cabezas polares de los fosfolípidos que se ubican en la superficie del liposoma deberían actuar como sitios de adsorción de cationes $\text{Ce}(\text{III})$, y favorecer la nucleación heterogénea durante la alcalinización homogénea de las soluciones de nitrato de cerio por el método de la urea (Bellino y Regazzoni, 2009). La elección de la temperatura y de las concentraciones de los reactivos tienen un rol importante durante el recubrimiento de liposomas, ya que debe evitarse un proceso de nucleación homogéneo paralelo, que conduciría a la formación de partículas sólidas.

Para estos experimentos se preparó un nuevo lote de liposomas (Lote II). Las soluciones tuvieron concentraciones iniciales de nitrato de cerio de $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, de urea de $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, y la cantidad de liposomas, con tamaño hidrodinámico medio de 183 nm, correspondiente a una concentración de 0,125 mg de fosfatidilcolina por ml de solución. Los reactores fueron introducidos en el baño térmico a 90°C ; este proceso fue denominado “Sin Rampa”.

En este caso, las soluciones fueron inicialmente turbias, por lo que la aparición del efecto Tyndall, que denota la precipitación de carbonato básico de cerio, no fue evidente.

La Figura 3.6 ilustra dos resultados relevantes. El primero es la reproducibilidad de los datos obtenidos; nótese que las nanocápsulas presentan diámetros hidrodinámicos que difieren en menos de 10 nm (los dos conjunto de experimentos fueron sintetizados en diferentes días, y cada resultado es un experimento independiente). El segundo es el aparente “crecimiento” del diámetro de los liposomas, en aproximadamente 100 nm, por el pretendido recubrimiento de $am\text{-Ce}(\text{OH})\text{CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$.

Los diámetros efectivos de las partículas sintetizadas en presencia de liposomas (Figura 3.6), tienen una notable diferencia con el diámetro efectivo de las partículas sintetizadas en ausencia de ellos (Figura 3.5), aproximadamente 4 veces menor. Si bien estos experimentos fueron realizados a diferentes temperaturas y tiempos de envejecimiento, la diferencia de tamaños alcanzada al final de la precipitación sugiere que estos sistemas han evolucionado por caminos diferentes.

Es conocido que para sintetizar partículas monodispersas deben alcanzarse condiciones tales que permitan un único evento de nucleación, separado del crecimiento, y que el tamaño final de dichas partículas dependerá del número de núcleos que se formen bajo una determinada condición experimental. En el caso de la precipitación homogénea por hidrólisis de la urea, es muy probable que el número de núcleos formados sea independiente de la temperatura de síntesis, ya que la nucleación tiene lugar a un determinado valor de sobresaturación crítica, que es independiente de la velocidad con que éste alcanza (Soler-Illia et al., 1999). Con esto en mente, las marcadas diferencias de los tamaños encontrados en ausencia y presencia de liposomas no deben atribuirse

a las diferentes temperaturas y tiempos de los experimentos, sino a la presencia de los liposomas dispersos en la solución que deben actuar como sitios de nucleación heterogénea.

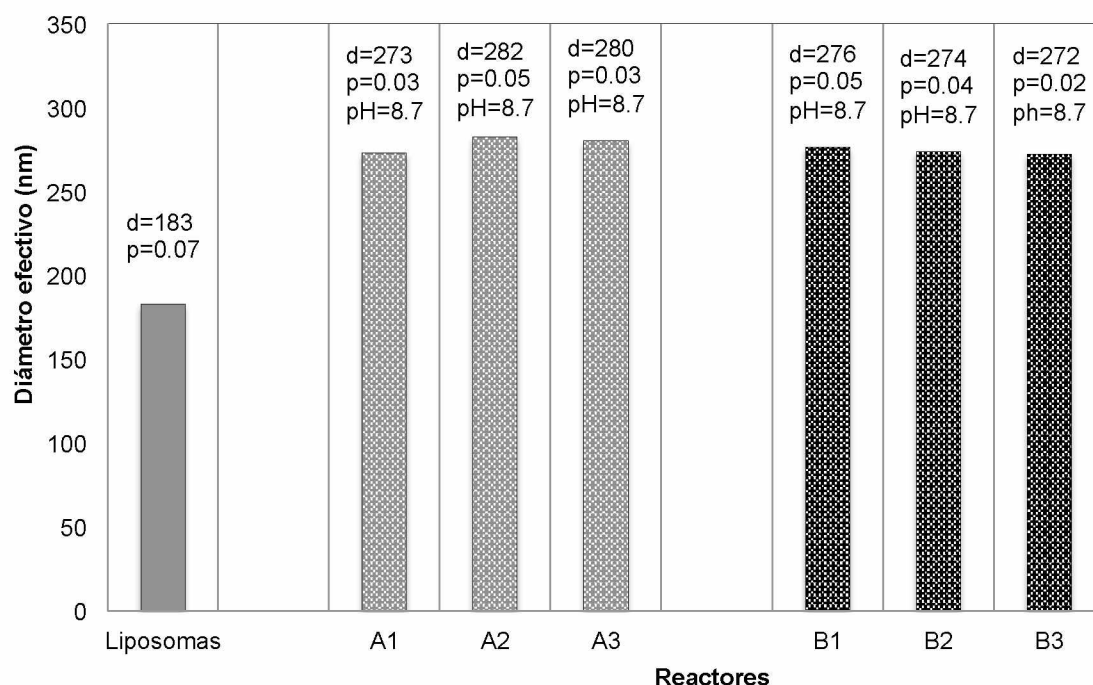


Figura 3.6. Diámetros efectivos (d) y polidispersidad (p) de liposomas y nanocápsulas híbridas (A1, A2, A3, B1, B2, B3, B4). Condiciones de síntesis: $[Ce(III)]_0 = 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[Urea]_0 = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $[Fosf] = 0,125 \text{ mg/ml}$ (Lote II), $T = 90^\circ\text{C}$ y $t = 2 \text{ h}$. Los conjuntos de experimentos, A y B, fueron sintetizados en las mismas condiciones, pero en diferentes días, y cada barra corresponde a un experimento independiente.

Ciertamente, a mayor temperatura, la urea se descompone más rápido, lo que a su vez hace que, a un determinado tiempo, la cantidad de $Ce(III)$ precipitado sea mayor; naturalmente, si la reacción se completa, la cantidad de $Ce(III)$ precipitado está definida por su concentración inicial. En estos casos, los valores del pH final de los experimentos (Figura 3.5 y Figura 3.6) fueron 8 y 8.7, respectivamente, lo que indica que la precipitación ha sido prácticamente completa (Soller-Illia, 1999). Por ello, de haber operado el mismo mecanismo de nucleación deberían esperarse tamaños de partículas similares, en el orden de los 1000 nm. Indudablemente, la presencia de los liposomas afecta el mecanismo de nucleación y/o el crecimiento de partículas de carbonato básico de cerio.

La obtención de partículas monodispersas (Figura 3.6) hace suponer dos posibles caminos o comportamientos en la síntesis: (a) que los liposomas se hayan destruido y que las cabezas polares de los fosfolípidos hayan interrumpido el crecimiento de las partículas, o (b) que los liposomas efectivamente intervinieron como sitios de adsorción de cationes de $Ce(III)$, favoreciendo la nucleación heterogénea de carbonato básico de cerio amorfo. En principio, la inspección de las partículas por microscopía electrónica permitiría distinguir entre estas dos posibilidades. Ante la carencia de esta información,

a continuación se presentan resultados que corresponden a nanocápsulas híbridas preparadas bajo condiciones experimentales similares a las aquí utilizadas, y que permiten descartar la primera posibilidad.

La Figura 3.7 (izquierda) presenta una microfotografía por microscopía electrónica de transmisión de las nanocápsulas obtenidas al calentar a 70°C una solución $0,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} de nitrato de cerio, $0,5$ mol dm^{-3} de urea y $0,125$ mg/ml de fosfatidilcolina, por un período de 4 horas. La Figura 3.7 (derecha) muestra el patrón de difracción de electrones del recubrimiento formado, y la Figura 3.8 muestra una microfotografía por microscopía electrónica de barrido de las nanocápsulas calcinadas a 600°C.

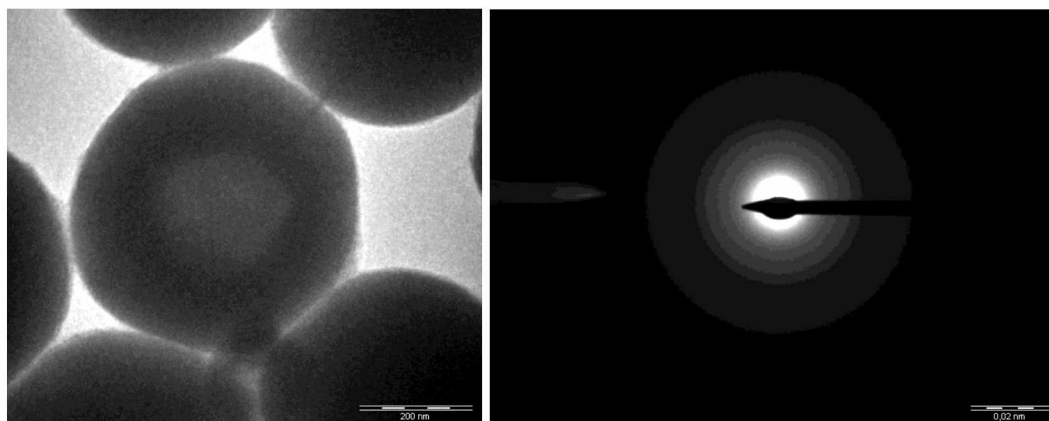


Figura 3.7. Microfotografía de nanocápsulas híbridas, tomada por microscopía electrónica de transmisión (izquierda), y el correspondiente patrón de difracción de electrones (derecha). Condiciones experimentales: $[\text{Ce(III)}]_0 = 0,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} , $[\text{Urea}]_0 = 0,5$ mol dm^{-3} , $[\text{Fosf}] = 0,125$ mg/ml (Lote V), $T = 70^\circ\text{C}$ y $t = 4$ h. Las microfotografías corresponden a las nanocápsulas finales de la Figura 3.19.

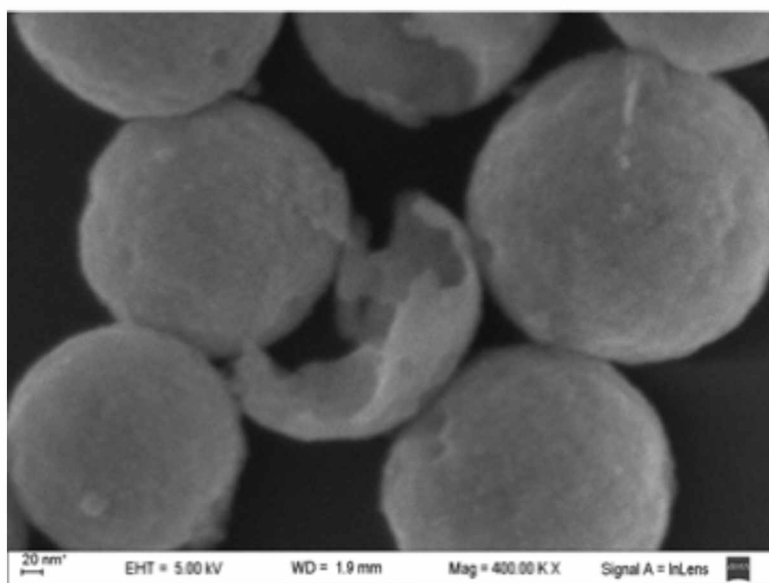


Figura 3.8. Microfotografía de nanoesferas huecas de CeO_2 , tomada por microscopía electrónica de barrido. Las nanoesferas huecas de ceria resultaron de la calcinación, a 600°C y en aire, de las nanocápsulas híbridas presentadas en la Figura 3.7.

La microfotografía de la Figura 3.7 (izquierda) permite apreciar una aureola de tono oscuro en los bordes de las partículas. Esta es la típica apariencia de las partículas huecas cuando se las observa por microscopía electrónica de transmisión; si los espesores de los recubrimientos hubiesen sido lo suficientemente delgados (parcialmente transparente al haz de electrones), la aureola hubiese sido mucho más evidente. El patrón de difracción de la Figura 3.7 (derecha) evidencia claramente que la síntesis empleada conduce a la formación de una cáscara. La microfotografía de la Figura 3.8, permite apreciar dos partículas huecas rotas, demostrando que las cáscaras de las partículas copiaron la forma esférica de los liposomas.

En resumen, el aumento de diámetro que se evidencia en la Figura 3.6 es el resultado de la formación de un recubrimiento alrededor de los liposomas, tal como se ilustra en el esquema de la Figura 3.9. En otras palabras, este aumento de tamaño debería ser la formación de nanocápsulas híbridas liposoma@*am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O perseguida. Así, la presencia de los liposomas en la síntesis de *am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O direcciona el sistema hacia la nucleación heterogénea, requiriéndose un grado de sobresaturación menor que el necesario para que ocurra la nucleación homogénea. En consecuencia, el tamaño final de las nanocápsulas y consecuentemente el espesor del recubrimiento, debe depender del número de liposomas presente en el sistema.

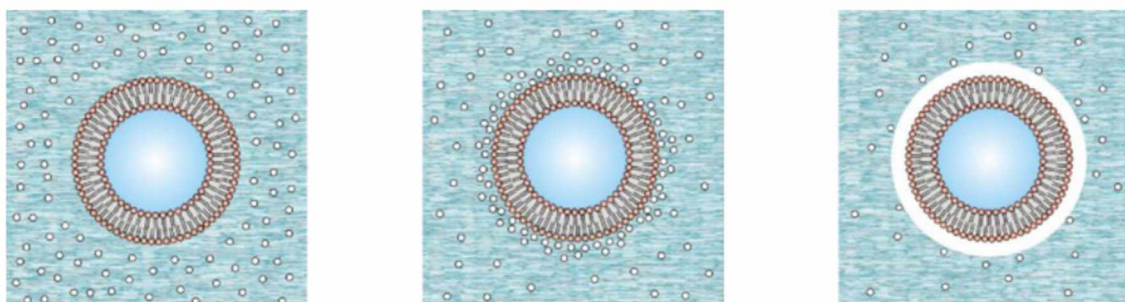


Figura 3.9. Esquema de la formación del recubrimiento de los liposomas durante la alcalinización de una solución de nitrato de cerio por el método de la urea. El producto final son nanocápsulas híbridas liposoma@*am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O (Bellino y Regazzoni, 2009).

Si se compara el tamaño de las nanocápsulas híbridas mostradas en las Figuras 3.6 y 3.7 (izquierda), se verá que las últimas son mucho más grandes. Sin embargo, cabría haber esperado lo contrario, habida cuenta de las diferentes condiciones de síntesis bajo las que se realizaron estos experimentos; la relación de concentraciones Ce(III) a fosfolípidos fue el doble en el primer caso. Esta evidente inconsistencia puede ser comprendida si se la atribuye al diferente número de moldes presentes en uno y otro sistema (ver sección 3.4.2); nótese que los lotes de liposomas empleados en estos casos fueron diferentes. De ninguna manera esta diferencia puede adjudicarse a la falta de reproducibilidad del procedimiento, más bien, debe imputarse a la falta de cuidados en la preparación de moldes.

El espectro ATR-FTIR de los liposomas recubiertos por Ce(OH)CO₃.xH₂O se muestra en la Figura 3.10. Este presenta información que sustenta la discusión de los párrafos precedentes. De hecho, el espectro muestra fundamentalmente bandas que son atribuibles al recubrimiento según la asignación ofrecida por Jobbágy et al. (2006); éstas corresponden a $\nu(\text{OCO}_2)$ (1477 cm⁻¹), $\nu(\text{CO}_3)$ (1410 cm⁻¹), $\nu(\text{CO})$ (1075 cm⁻¹).

Estas bandas enmascaran las bandas de los fosfolípidos, y sólo se observan las más intensas a 2922, 2852, 1735, 759 y 724 cm^{-1} .

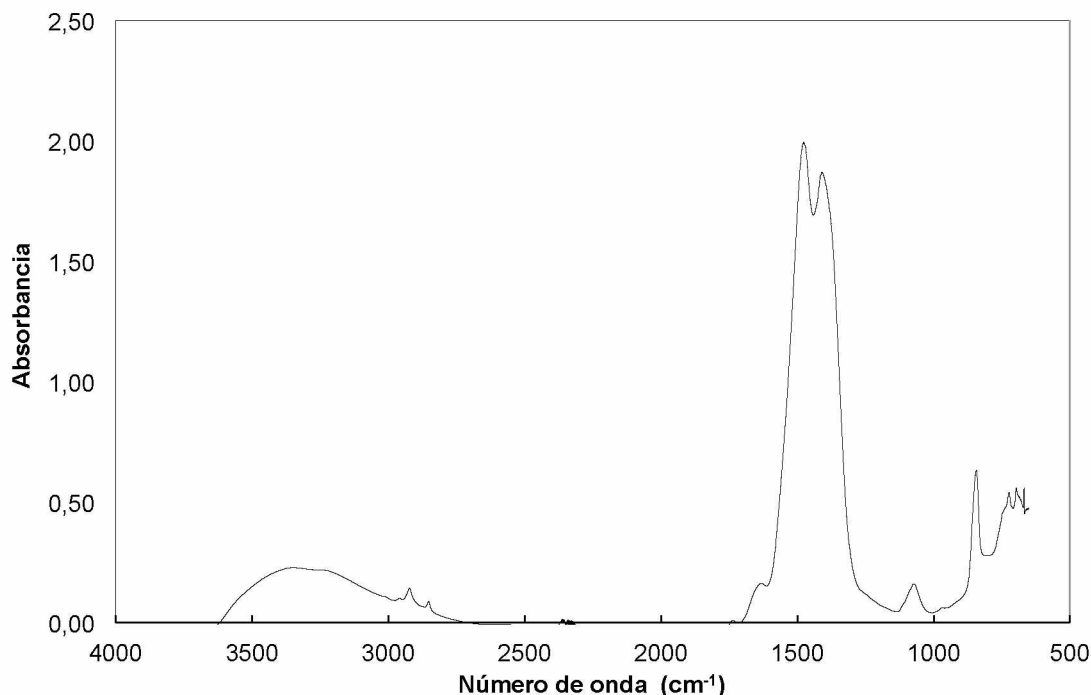


Figura 3.10. Espectro ATR-FTIR de las nanocápsulas híbridas liposomas@*am*- $\text{Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Condiciones de síntesis: $[\text{Ce(III)}]_0 = 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Urea}]_0 = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Fosf}] = 0,125 \text{ mg/ml}$ (Lote V), $T = 70^\circ\text{C}$ y $t = 4 \text{ h}$.

3.4 Variables de síntesis.

3.4.1 Efecto de la temperatura y de la velocidad de calentamiento.

La Figura 3.11 presenta los tamaños de nanocápsulas híbridas obtenidas a dos diferentes temperaturas (70 y 90°C), usando las mismas concentraciones de reactivos que en el caso de los resultados presentados en la Figura 3.6. Las diferencias en este caso son dos. La primera es que los reactores fueron introducidos en el baño térmico a temperatura ambiente, para luego ser llevados a la temperatura de trabajo; estos experimentos se denominan “Con Rampa”. La segunda diferencia es que se empleó un lote de liposomas distinto (Lote III).

La diferencia de tamaños que se observa en la Figura 3.11 muestra que, a igual tiempo de envejecimiento, los espesores de los recubrimientos (diámetro de partícula) aumentan con el incremento de la temperatura. Obviamente, es la reacción de precipitación del compuesto de Ce(III) la que define el espesor del recubrimiento, la que a su vez depende de la cantidad de urea descompuesta a un determinado tiempo; cuanto mayor sea la velocidad de hidrólisis de urea, mayor será la fracción de Ce(III) precipitado. En otras palabras, la cantidad de sólido precipitado a 70°C es menor que a 90°C .

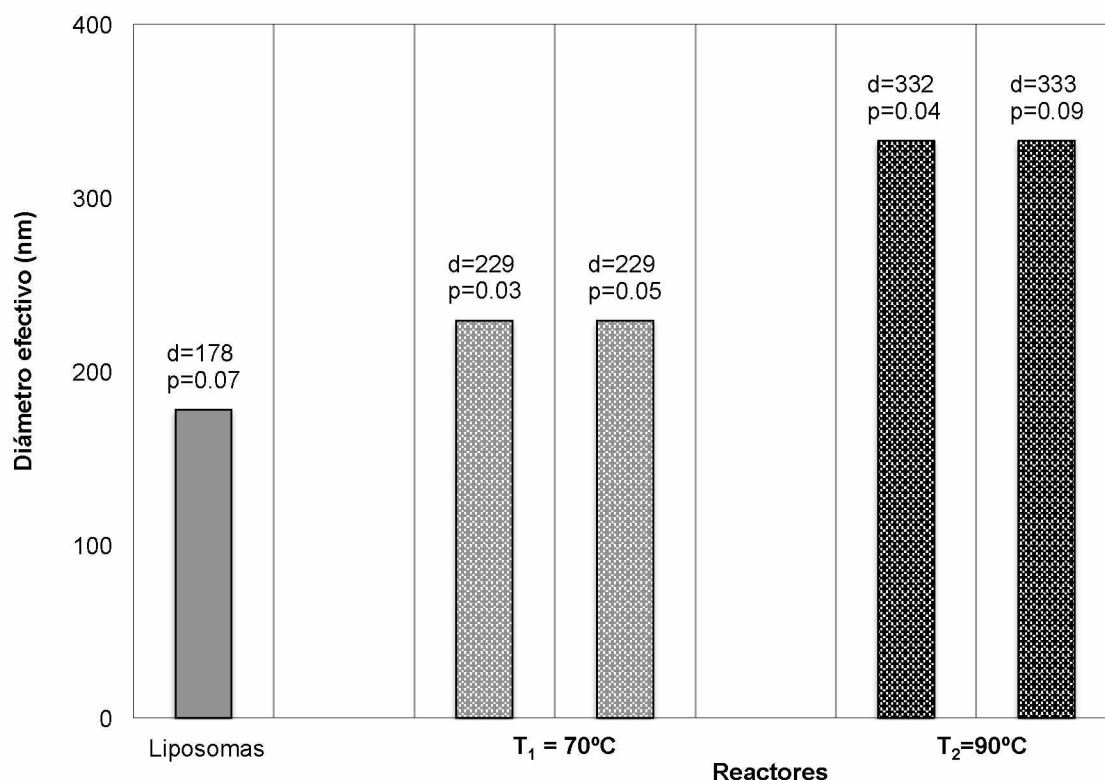


Figura 3.11. Diámetros efectivos (d) y polidispersidad (p) de liposomas y nanocápsulas híbridas. Condiciones de síntesis: $[\text{Ce(III)}]_0 = 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Urea}]_0 = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Fosf}] = 0,125 \text{ mg/ml}$ (Lote III), $T_1 = 70$ y $T_2 = 90^\circ\text{C}$ (Con Rampa), y $t = 2 \text{ h}$. Cada barra corresponde a un experimento independiente.

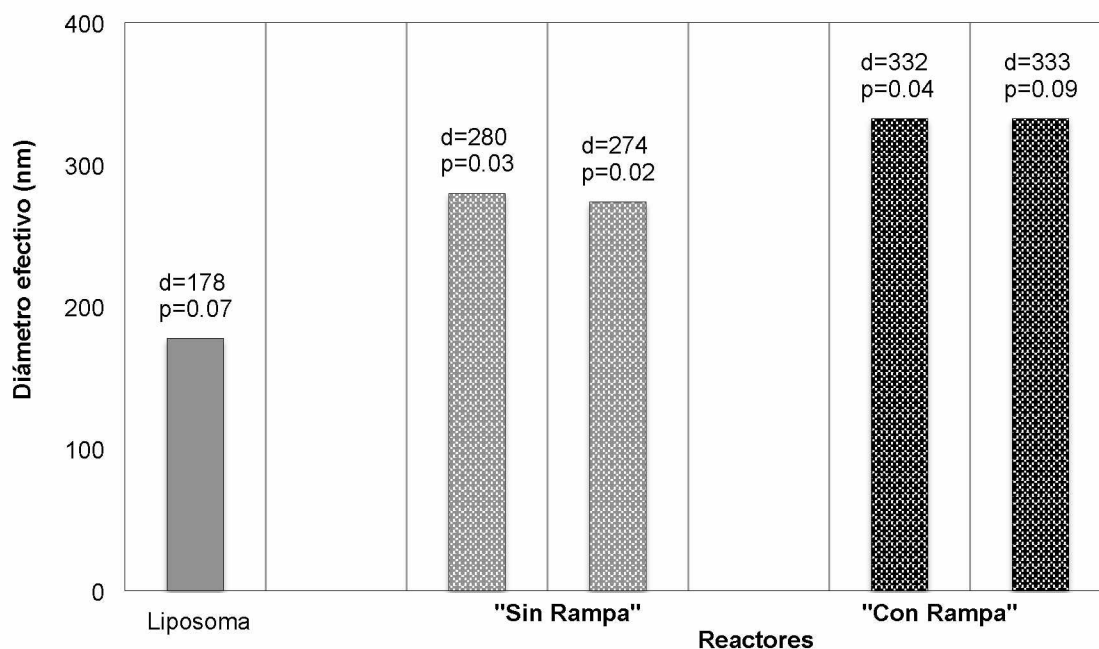


Figura 3.12. Diámetros efectivos (d) y polidispersidad (p) de liposomas y nanocápsulas híbridas. Condiciones de síntesis: $[\text{Ce(III)}]_0 = 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Urea}]_0 = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Fosf}] = 0,125 \text{ mg/ml}$ (Lote III), $T = 90^\circ\text{C}$ (Con Rampa y Sin Rampa), y $t = 2 \text{ h}$. Cada barra corresponde a un experimento independiente.

La evidente disparidad entre los resultados presentados en la Figura 3.6 y la Figura 3.11 para 90°C puede atribuirse a dos efectos: a las diferentes maneras empleadas para alcanzar la temperatura de trabajo, y/o a la diferente cantidad de moldes presentes en los distintos lotes de liposomas que se emplearon. Para evaluar cuál de estos efectos era la causa de la disparidad observada, se repitió el experimento “Sin Rampa” a 90°C, usando el mismo lote de liposomas. El resultado de este experimento se compara en la Figura 3.12 con el del experimento “Con Rampa”.

En primer lugar debe resaltarse la muy buena coincidencia de los resultados de los experimentos “Sin Rampa” realizados con los lotes de liposomas II (Figura 3.6) y III (Figura 3.12); tanto los valores del diámetro hidrodinámico como de la polidispersidad son coincidentes. Esta observación indica que en ambos casos el número de moldes fue el mismo.

En segundo lugar, es evidente que la síntesis realizada “Con Rampa” conduce a un mayor tamaño de partícula que la síntesis realizada “Sin Rampa”; la diferencia de tamaños debe atribuirse al tiempo efectivo de envejecimiento.

El tiempo de envejecimiento de la síntesis “Sin Rampa” fue precisamente de 2 horas, debido a que el reactor alcanzó prácticamente de manera inmediata la temperatura del baño térmico. En el caso de la síntesis “Con Rampa”, los reactores tardan aproximadamente 30 minutos para alcanzar los 90°C, superando los 60°C a los 15 minutos. A esta temperatura, la hidrólisis de urea ocurre a velocidad apreciable (Soler-Illia et al., 1998), por lo que la cantidad de urea descompuesta al cabo de las 2 horas de envejecimiento a 90°C será mayor en el caso “Con Rampa”, y consecuentemente la cantidad de Ce(III) precipitado.

Si bien tanto la síntesis “Con Rampa” como la “Sin Rampa” presentan velocidades de aporte del agente precipitante ($\text{OH}^-/\text{HCO}_3^-$) que garantizan el recubrimiento uniforme de los liposomas, es evidente que la síntesis “Sin Rampa” permite controlar con mayor precisión el tiempo efectivo de envejecimiento.

3.4.2 Efecto de la relación de concentraciones de Ce(III) y fosfolípidos.

Como se mencionó previamente, la formación de los recubrimientos de los liposomas procede por un mecanismo de nucleación heterogénea, y consecuentemente el tamaño final de partícula (espesor de recubrimiento inorgánico) debe depender fuertemente de la cantidad de liposomas presentes en la síntesis. Para demostrar esta premisa se realizó una serie de ensayos “Sin Rampa”, cuyos resultados son presentados en la Figura 3.13; en estos experimentos se varió sistemáticamente la relación de concentraciones de Ce(III) a fosfolípido usando un mismo lote de liposomas (Lote IV).

La Figura 3.13 (izquierda) muestra el cambio del tamaño de las nanocápsulas cuando se mantiene constante el número de liposomas en el sistema, y la concentración de Ce(III) aumenta progresivamente. La Figura 3.13 (derecha) muestra la misma dependencia cuando se varía el número de liposomas y la concentración de Ce(III) se mantiene constante.

El aumento de tamaños de las nanocápsulas mostrado en la Figura 3.13 (izquierda) indica que el diámetro de las partículas aumenta con el incremento de la concentración de partida de Ce(III). Obviamente, cuanto mayor es la concentración inicial de cerio (III),

mayor es la cantidad de compuesto de Ce(III) precipitado, lo que a su vez define un mayor espesor de recubrimiento.

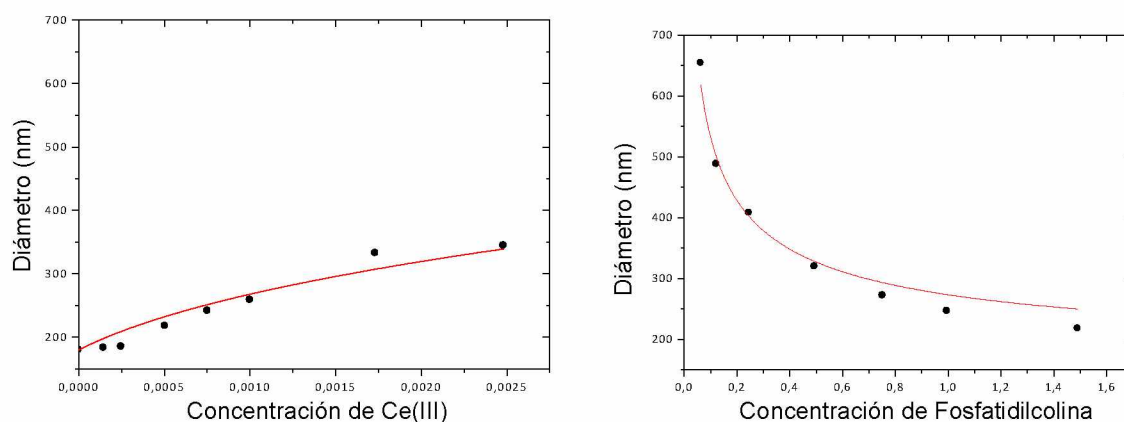


Figura 3.13. Diámetros efectivos de nanocápsulas híbridas. Condiciones de síntesis: $[Urea]_0 = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $T = 70^\circ\text{C}$, $t = 4 \text{ h}$, (Izquierda) $[Fosf] = 1,5 \text{ mg/ml}$ (Lipo IV) variando $[Ce(III)]_0$, y (derecha) $[Ce(III)]_0 = 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ variando $[Fosf]$ (Lipo IV). Las líneas de tendencia fueron calculadas con la ecuación 3.1

A medida que se incrementa la concentración de partida de Ce(III), ésta tiene un menor impacto en el tamaño de las nanocápsulas; a mayor tamaño, mayor área superficial, por lo tanto, a medida que se incrementa el tamaño de las partículas, se necesita una mayor cantidad de cerio (III) precipitado para que ésta se refleje efectivamente sobre el tamaño. Por ello, la tasa de incremento del diámetro de las nanocápsulas se reduce a las mayores concentraciones de partida.

La disminución del tamaño de las nanocápsulas mostrado en la Figura 3.13 (derecha) revela que los espesores de recubrimiento decrecen con el incremento de la concentración de fosfolípidos, incluso demuestra que esta variable es altamente sensible. La disminución del tamaño de nanocápsulas resulta del aumento de la cantidad de moldes.

Nótese que los cambios del diámetro de las nanocápsulas son menos sensibles a las mayores concentraciones, lo que facilitaría el control de los espesores. De todos modos, téngase en cuenta que la variable relevante es la relación de concentraciones, y no las concentraciones individuales.

Los datos experimentales de la Figura 3.13 pueden presentarse con las líneas de tendencia obtenidas según la siguiente función, que resulta de aplicar un modelo geométrico simple.

$$d = 2 \sqrt[3]{\frac{3 F_w}{4 \pi \rho} \frac{1}{\alpha} \frac{[Ce(III)]_0}{[Fosf]} + r_0^3} \quad \text{Ec. 3.1}$$

con

$$\frac{3 F_w}{4 \pi \rho} = 3.07 \times 10^9 \quad \text{Ec. 3.1a}$$

y

$$r_0^3 = 7.29 \times 10^5 \text{ mm}^3$$

Ec. 3.1b

En la ecuación 3.1, $[\text{Ce(III)}]_0$ es la concentración inicial de nitrato de cerio, $[\text{Fosf}]$ es la concentración de fosfatidilcolina, que está directamente relacionada con el número de liposomas por unidad de volumen a través de una constante α . r_0 es el radio de los liposomas, y F_w es el peso fórmula de $\text{Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ y ρ su densidad.

Los resultados presentados en estas figuras muestran que es posible ajustar los espesores de las nanocápsulas seleccionando con mucho cuidado las concentraciones de partida de nitrato de cerio y de liposomas, además de la correcta elección del tiempo de envejecimiento y de la temperatura de síntesis.

Estos resultados, por otra parte, permiten conciliar la inconsistencia de los tamaños de las nanocápsulas presentadas en las Figuras 3.6 y 3.7, la que debe atribuirse, sin lugar a dudas, a diferencias en la concentración de moldes. Además, resaltan la importancia de los cuidados que deben tomarse al momento de extruir los fosfolípidos para producir los liposomas; pequeñas pérdidas de materia pueden conducir a un cambio significativo en el número de liposomas, que luego se reflejará en el tamaño de las nanocápsulas. Por tal motivo, para poder alcanzar muy buena reproducibilidad es necesario hacer énfasis no sólo en los cuidados que se deben tener durante la síntesis, sino que también en los cuidados que se deben tener durante la preparación de la dispersión de liposomas, evitando la pérdida de fosfolípidos; la pérdida de fosfolípidos en el proceso de extrusión puede ser de alrededor del 10% (Sabín, 2007).

Los resultados aquí presentados demuestran que cuando todos estos cuidados son tenidos en cuenta, la síntesis de nanocápsulas liposomas@*am*- $\text{Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ es reproducible (compárese los resultados de los experimentos “Sin Rampa” mostrados en las Figuras 3.6 y 3.12).

3.5 Escalado a mayores volúmenes (Scaling-up).

Los sistemas descritos hasta el momento corresponden a volúmenes de reacción de 4 ml. Si a esto se suma la baja concentración de Ce(III) necesaria para lograr la preparación de estas nanocápsulas híbridas, resulta evidente que los rendimientos son realmente bajos. Por tales motivos, es importante escalar el procedimiento para obtener rendimientos significativos. Los experimentos, cuyos resultados se presentan a continuación, fueron realizados utilizando reactores de 550 ml y el volumen total de los sistemas fue 500 ml.

3.5.1 Efecto de la convección mecánica.

La transferencia de calor gobernada por la convección natural es suficiente para mantener gradientes térmicos bajos cuando los volúmenes de reacción son 4 ml. Sin embargo, es posible que la convección natural no sea suficiente en sistemas de mayor volumen. Por este motivo se exploró el efecto de la convección mecánica.

La Figura 3.14 muestra la evolución de pH durante el calentamiento de una solución que contenía una concentración inicial de urea igual a $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, nitrato de cerio (III) igual a $4,85 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, y una cantidad de liposomas (con tamaño hidrodinámico medio de 185 nm) correspondiente a una concentración de 0,607 mg de fosfatidilcolina por ml

de solución; la tasa de calentamiento (Rampa) a la que fue sometido el sistema también se muestra en la Figura. Las concentraciones de Ce(III) y fosfatidilcolina fueron elegidas de forma tal de mantener la misma relación empleada en experimentos anteriores (ver Figura 3.6), y de obtener una mayor cantidad de nanocápsulas, más allá del mero incremento de volumen. Para calentar y homogeneizar el sistema se usó un agitador magnético con placa calefactora, provisto de un controlador de temperatura.

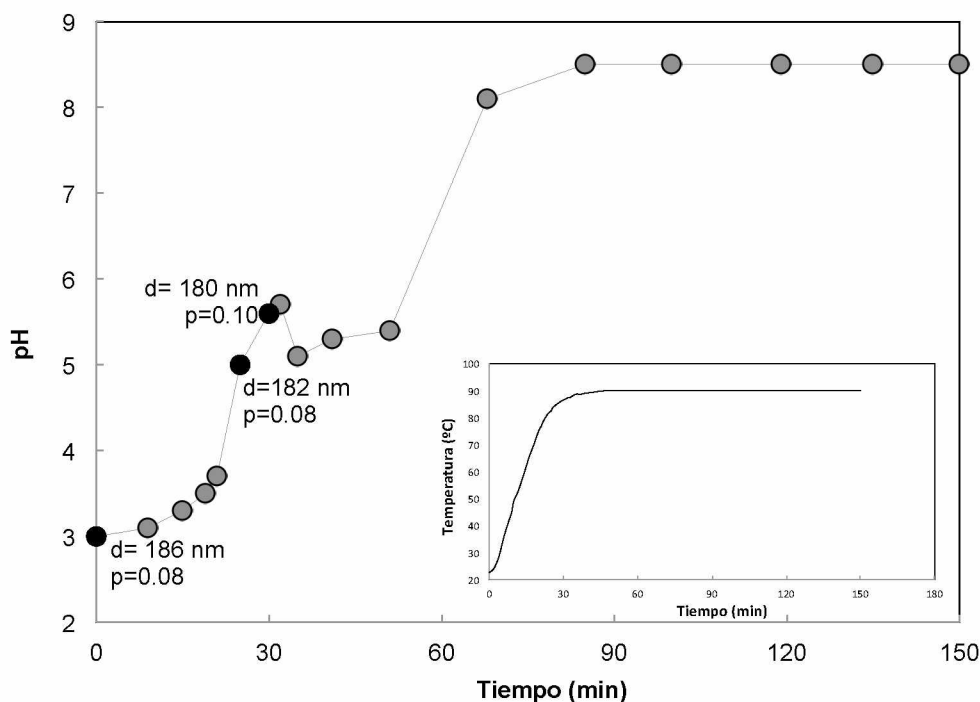


Figura 3.14. Evolución temporal del pH de la solución y algunos diámetros de partícula. Condiciones de síntesis: $[Ce(III)]_0 = 4,85 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[Urea]_0 = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $[Fosf] = 0,607 \text{ mg/ml}$, $T = 90^\circ\text{C}$ y $t = 2,5 \text{ h}$. La línea de tendencia es una guía para la vista.

La Figura 3.14 muestra que el pH aumenta gradualmente hasta alcanzar un valor de 5,7 a los 32 minutos para luego disminuir abruptamente. Este pico de pH evidencia que en ese momento se dispara el consumo de base por la formación de $Ce(OH)CO_3 \cdot xH_2O$, e indica que el consumo de OH^- y CO_3^{2-} es más rápido que la velocidad con que se producen. Un pico de pH similar al de la Figura 3.14 también fue observado en sistemas libres de liposomas, durante la precipitación de $Gd(OH)CO_3 \cdot xH_2O$ (Candal et al., 1993) y de $\alpha-Ni(OH)_2$ (Soler-Illia et al., 1999). En estos casos, el pico coincide con el inicio de la precipitación. Así, el pico de pH observado en la Figura 3.14 puede ser interpretado como un claro inicio de la ocurrencia de un evento de nucleación.

Durante el inicio del calentamiento, hasta momentos antes de alcanzar el pico de pH, los valores medidos del diámetro efectivo de las partículas no cambian significativamente y corresponden a los liposomas (estos valores se presentan en la Figura 3.14). En el instante mismo en que se alcanzó el pico de pH, se observó que el sistema desarrolla un abrupto e intenso aumento de turbidez. A partir de ese momento, la determinación de los tamaños de partícula resultó imposible, aun cuando las muestras fueron diluidas para evitar “scattering” múltiple. La forma y el tamaño de las partículas obtenidas al final

del envejecimiento puede verse en las microfotografías de microscopía electrónica de barrido que se presentan en la Figura 3.15.

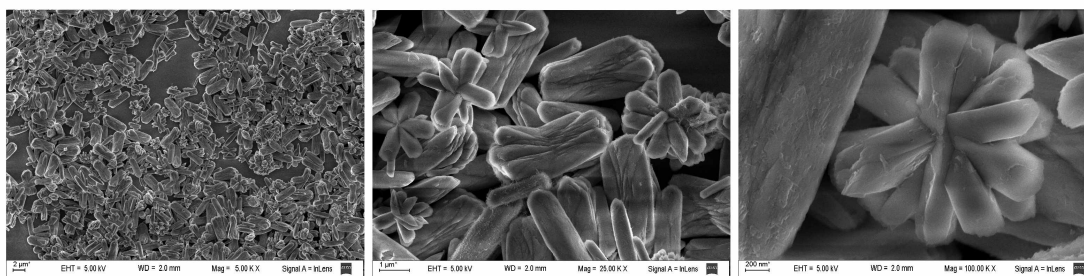


Figura 3.15. Microfotografías de partículas tomada por microscopía electrónica de barrido. Las partículas fueron sintetizadas usando agitador magnético con placa calefactora y control de temperatura. Condiciones de síntesis: $[Ce(III)]_0 = 4,85 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[Urea]_0 = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $[Fosf] = 0,607 \text{ mg/ml}$, $T = 90^\circ\text{C}$ y $t = 2,5 \text{ h}$.

Las partículas que se observan en la Figura 3.15 distan de ser nanocápsulas híbridas esféricas, como las ilustradas en la Figura 3.7 (izquierda). De hecho, no se observa siquiera la presencia de partículas esféricas, ni aún a menores magnificaciones, donde el campo visual es más amplio. Este resultado adverso podría ser atribuido a los efectos de la agitación mecánica, que condujo a una sucesión de eventos que desencadenaron la ruptura de los liposomas en el momento en que se disparaba la formación del recubrimiento.

Es probable que la relativamente elevada concentración de $Ce(III)$ empleada en este experimento haya favorecido condiciones en las que la nucleación homogénea también pudiera haber tenido lugar, pero si este hubiese sido el caso, el sistema debería haber evolucionado para dar una mezcla de nanocápsulas y de partículas macizas. Por un lado, los resultados presentados en la sección anterior demuestran que los liposomas son estables a 90°C , al menos en condiciones estancas. Por el otro lado, es sabido que la nucleación heterogénea está cinéticamente favorecida frente a la nucleación homogénea, por lo que, de haber ocurrido ambos eventos de nucleación, el sistema debería haber evolucionado por dos caminos paralelos. Es evidente que la suma de las tensiones producidas por la agitación mecánica y la formación del recubrimiento condujo a la ruptura de la membrana lipídica de los liposomas.

Estos resultados negativos ilustran lo complejo y sensible que es el manejo de estos sistemas.

3.5.2 Escalado con convección natural.

El experimento se hizo utilizando una cantidad de liposomas de 185 nm, equivalente a 0,125 mg de fosfatidilcolina/ml, y concentraciones iniciales de nitrato de cerio de $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ y de urea de $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$. Para la obtención de nanocápsulas híbridas, primero se precalentó a 70°C la dispersión de liposomas que contenía $Ce(III)$, luego se agregó urea y se homogenizó suavemente. Finalmente, el reactor se sumergió en el baño y se dejó envejecer. Por consiguiente, este experimento corresponde a uno sin rampa, de convección natural.

La Figura 3.16 muestra que el pH aumenta desde un valor inicial de 4,6 hasta alcanzar el valor 5,8, a los 49 minutos de envejecimiento. A partir de ese momento, la pendiente disminuye notablemente. Este cambio de pendiente debe indicar el inicio de la formación del recubrimiento de los liposomas, que presumiblemente ocurre a través de un mecanismo de nucleación heterogénea. La disminución de la pendiente dpH/dt se debe al consumo de base durante la precipitación (Candal et al., 1993). Cuando la cantidad de Ce(III) en solución se agota, la velocidad de hidrólisis de la urea sobrepasa a la velocidad de consumo de base, y el pH vuelve a aumentar con mayor pendiente hasta que el efecto buffer de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ y $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ domina la forma de la curva pH vs t. En este experimento, el pico de pH observado en la Figura 3.14 no es visible, por lo que se puede descartar algún otro evento de nucleación.

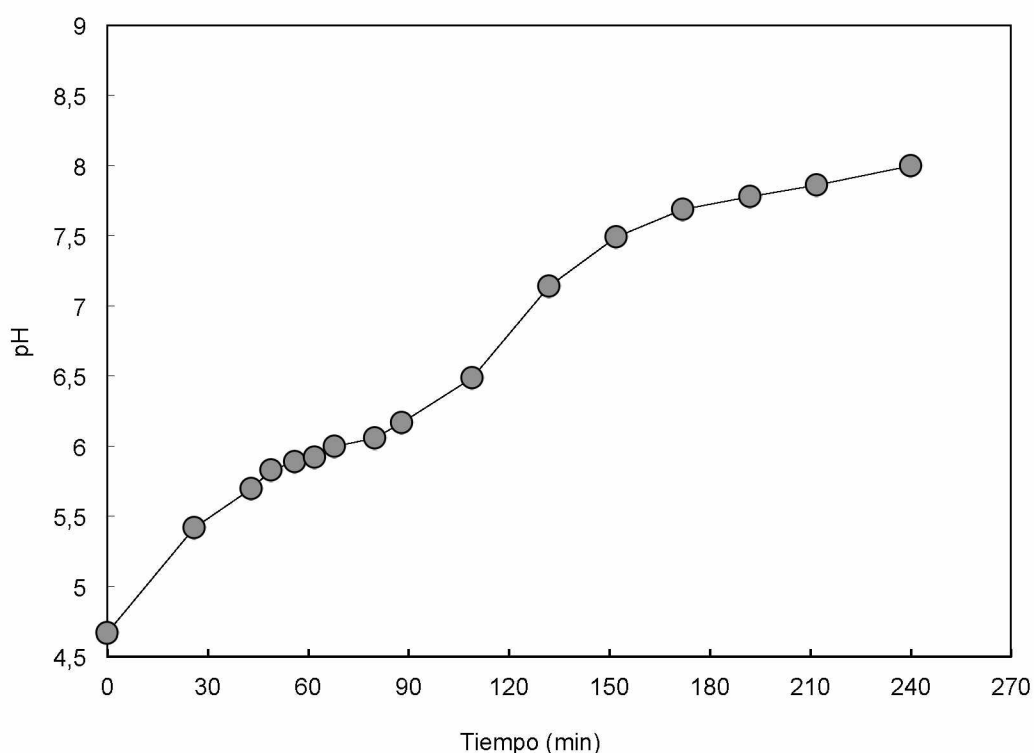


Figura 3.16. Evolución temporal del pH de la solución, durante el recubrimiento de liposomas. Condiciones experimentales: $[\text{Ce(III)}]_0 = 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Urea}]_0 = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Fosf}] = 0,125 \text{ mg/ml}$ (Lote V), $T = 70^\circ\text{C}$, y $t = 4 \text{ h}$. La línea de tendencia es una guía para la vista.

La Figura 3.17 presenta la distribución de tamaños medidos por PCS de alícuotas tomadas durante el envejecimiento. La distribución de tamaños inicia con una moda de 185 nm, que va aumentando a medida que la solución envejece hasta llegar a un diámetro modal final de 406 nm.

El continuo desplazamiento del valor monomodal de la distribución de tamaños de las nanocápsulas híbridas durante el envejecimiento (Figura 3.17), la ausencia del pico de pH, y la conservación de la esfericidad observadas por SEM (Figura 3.18), nos indica que hubo un único evento de nucleación heterogénea y que el sólido precipitado va

formándose sobre los liposomas de forma progresiva. La Tabla 3.4 resume lo presentado en las Figuras 3.17 y 3.18.

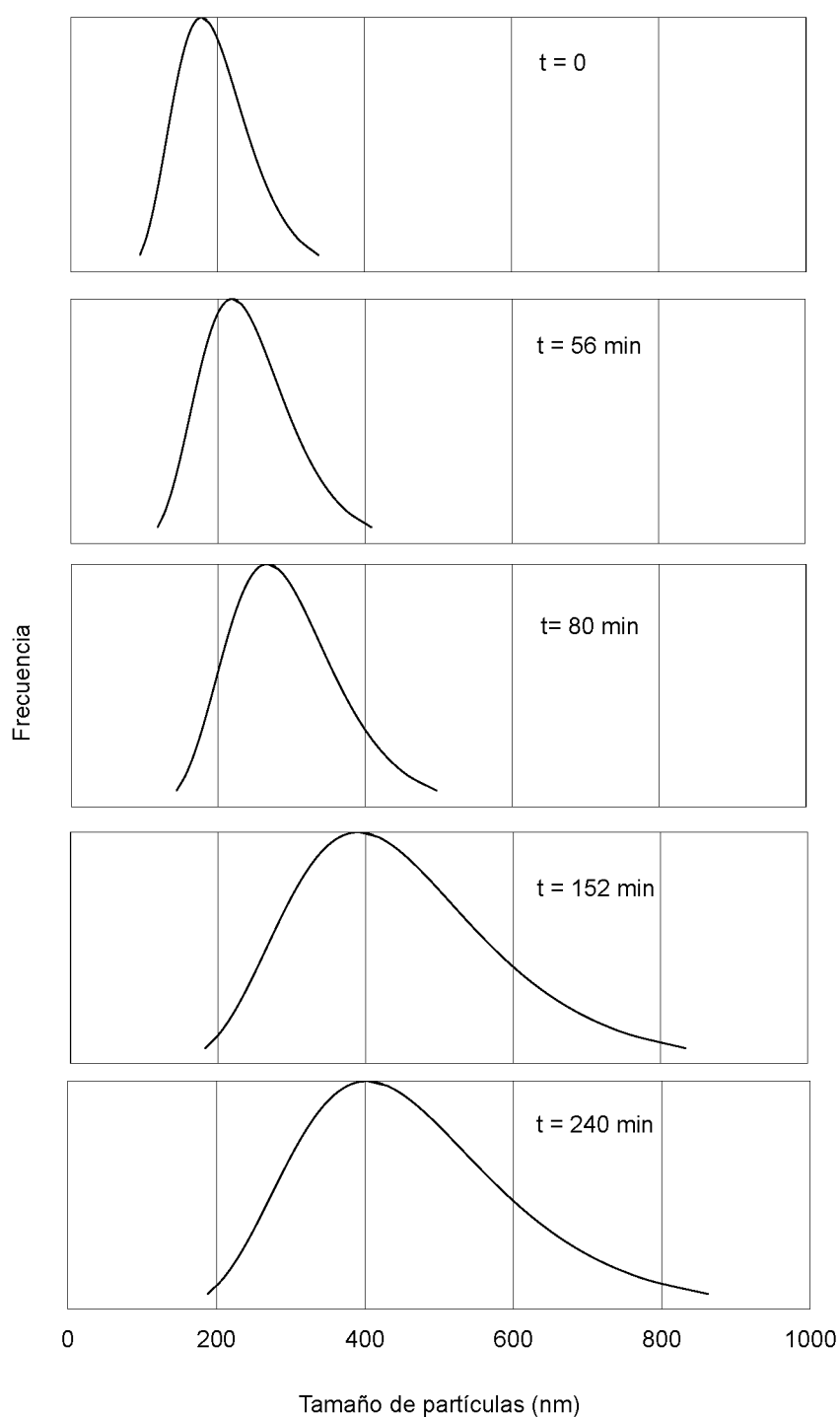


Figura 3.17. Evolución temporal de la distribución de tamaños de partícula durante el recubrimiento de liposomas. Condiciones experimentales: $[\text{Ce(III)}]_0 = 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Urea}]_0 = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Fosf}] = 0,125 \text{ mg/ml}$ (Lote V), $T = 70^\circ\text{C}$, y $t = 4 \text{ h}$.

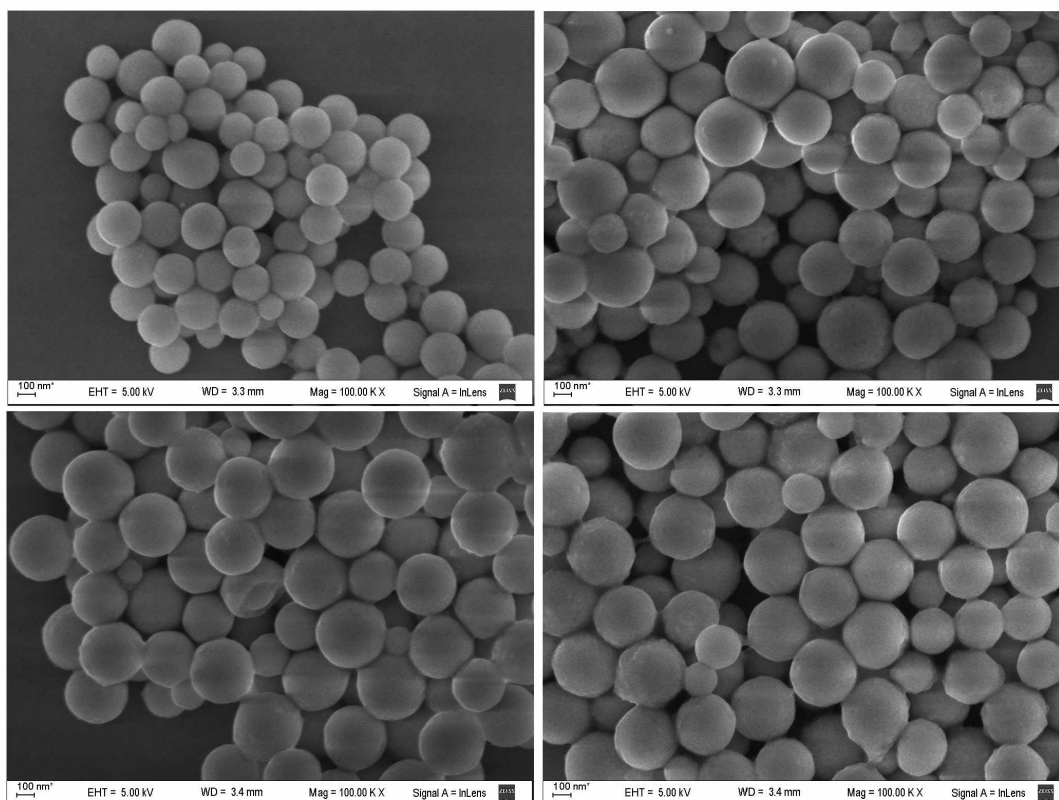


Figura 3.18. Microfotografías de microscopio electrónico de barrido de las nanocápsulas (100.000 aumentos) a diferentes tiempos de envejecimiento: $t = 56$ min (arriba-izquierda), $t = 80$ min (arriba-derecha), $t = 152$ min (abajo-izquierda), y $t = 240$ min (izquierda-abajo) Condiciones experimentales: $[\text{Ce(III)}]_0 = 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Urea}]_0 = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Fosf}] = 0,125 \text{ mg/ml}$ (Lote V), $T = 70^\circ\text{C}$, y $t = 4 \text{ h}$.

Tabla 3.3. Diámetros de nanocápsulas híbridas obtenidos por PCS y SEM.

$t = 56\text{min}$	$t = 80\text{min}$	$t = 152\text{min}$	$t = 240\text{min}$
Diámetros (nm)	Diámetros (nm)	Diámetros (nm)	Diámetros (nm)
$D_{\text{PCS}} = 221$	$D_{\text{PCS}} = 266$	$D_{\text{PCS}} = 395$	$D_{\text{PCS}} = 406$
$D_{\text{SEM}} = 200\text{-}225$	$D_{\text{SEM}} = 250\text{-}300$	$D_{\text{SEM}} = 350\text{-}400$	$D_{\text{SEM}} = 350\text{-}400$

Como puede observarse, los tamaños medidos con las dos técnicas coinciden razonablemente bien. Debe tenerse en cuenta que el tamaño determinado por PCS es una medida del diámetro hidrodinámico de las partículas, mientras el tamaño medido por SEM corresponde a partículas “secas”, razón por la cual los valores determinados por PCS suelen ser mayores que los medidos por SEM. Por el otro lado, debe mencionarse que la estadística que permite la técnica SEM es limitada, si se la compara con la población que “prueba” PCS (en nuestro caso, el diámetro efectivo determinado por PCS corresponde a una estadística de 10^5 o 10^6 datos). Por este motivo, en la Figura 3.19 se presenta la evolución de los tamaños de las nanocápsulas híbridas liposoma@*am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O medidos por PCS.

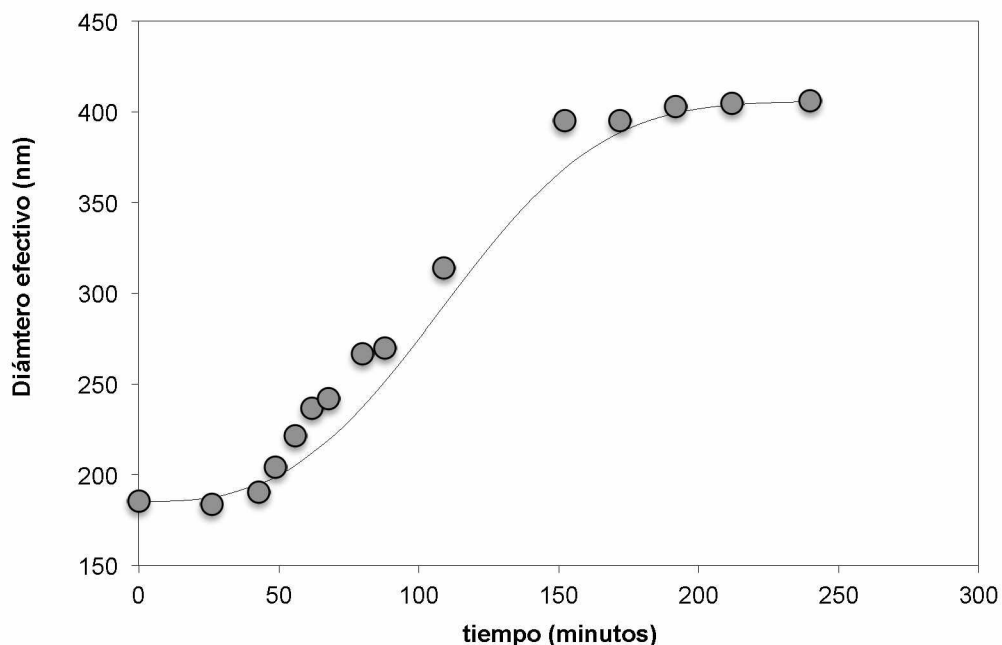


Figura 3.19. Evolución temporal del diámetro efectivo, medido por PCS, durante el recubrimiento de liposomas. (o) representa los datos experimentales, y la línea continua representa los datos teóricos obtenidos por la Ecuación de Avrami. Estos datos corresponden a la síntesis descrita en la Figura 3.16.

La Figura 3.19 muestra claramente que la formación del recubrimiento de $am\text{-Ce}(\text{OH})\text{CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ comienza entre los 43 y 49 minutos, en coincidencia con el cambio de la pendiente dpH/dt que se observa en la Figura 3.16. En ese instante, el sistema alcanza el grado de sobresaturación necesario para que tenga lugar la nucleación heterogénea y las partículas comienzan a crecer; por debajo de ese tiempo, el tamaño de los liposomas permanece constante. Entre los minutos 49 y 150 ocurre un crecimiento lento, alcanzando un plateau donde el tamaño de las nanocápsulas permanece cercano a 400 nm.

En principio, la forma del crecimiento de las partículas puede interpretarse en términos de la ley de Avrami (Ecuación 3.2).

$$\alpha = 1 - \exp(-kt)^n \quad \text{Ec. 3.2}$$

En esta ecuación, α es la fracción del espesor del recubrimiento alcanzado a un cierto tiempo, que se calcula a partir de $(d_t - d_0)/(d_\infty - d_0)$; donde d_t es el diámetro de las nanocápsulas, d_∞ es su diámetro a tiempo infinito, y d_0 es el diámetro de los liposomas. k es la constante de velocidad, y n el exponente de Avrami, cuyos valores se obtienen usando la ecuación linealizada.

$$\ln \ln [1/(1-\alpha)] = n \ln(t) + n \ln(k) \quad \text{Ec. 3.3}$$

La Figura 3.20 presenta los respectivos valores de $\ln \ln [1/(1-\alpha)]$ y $\ln(t)$, de la que, descartando los dos primeros puntos, se obtiene $n = 2,93$ y $k = 0,008 \text{ min}^{-1}$; las desviaciones de la linealidad a tiempos cortos no son inusuales.

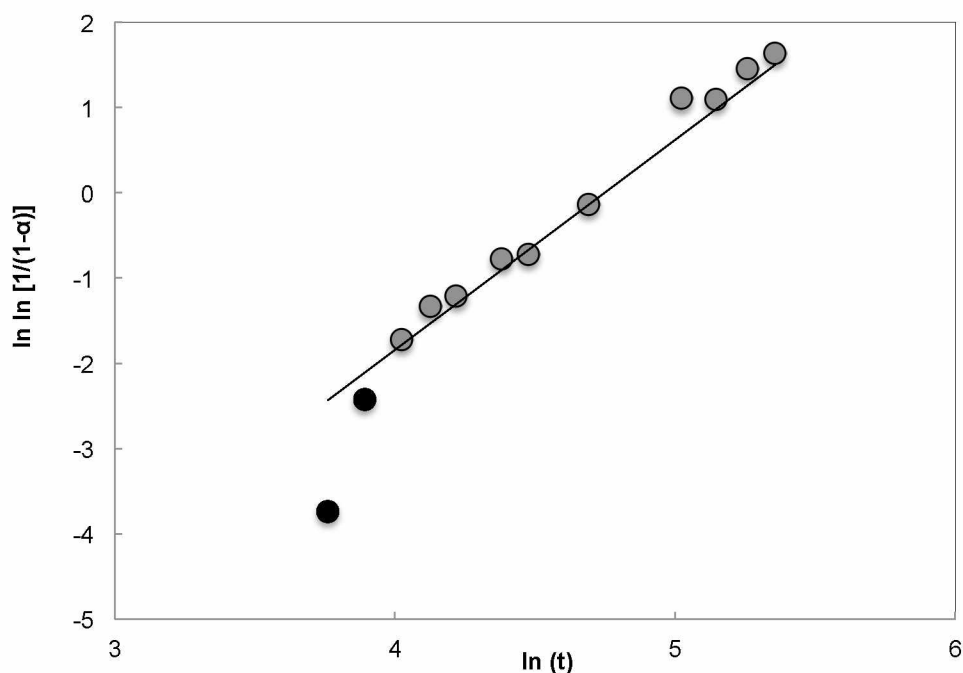


Figura 3.20. Representación de la curva $\ln \ln$ vs $\ln$ que describe el crecimiento de las nanocápsulas liposoma@*am*-Ce(OH)CO₃.

En la Figura 3.19 se compara la evolución de tamaño que resulta de la Ecuación 3.2 con la observada experimentalmente. Como se aprecia, la ecuación de Avrami reproduce muy bien el crecimiento del espesor de las capas de *am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O que recubren los liposomas, excepto durante las primeras etapas del desarrollo del recubrimiento. De todas maneras, la concordancia observada debe tomarse con cuidado. En primer lugar, los espesores de los recubrimientos fueron estimados en base a la diferencia $d_t - d_0$, suponiendo que los liposomas son moldes rígidos, cuando, en realidad, éstos pueden contraerse durante la formación de la cubierta de *am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O. Por otro lado, la ecuación de Avrami no es estrictamente válida para tiempos cortos, ya que la reacción de precipitación es solo termodinámicamente posible cuando se supera la saturación con respecto al sólido.

3.6 Transformaciones de fase.

El tratamiento térmico de las nanocápsulas híbridas liposoma@*am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O en aire da lugar a la formación de las partículas huecas de CeO₂ mostradas en la Figura 3.8. Para seguir la evolución de las nanocápsulas, éstas fueron tratadas térmicamente de manera secuencial (ver sección 2.2.4). Las Figuras 3.21 y 3.22 muestran los espectros DRIFT-FTIR obtenidos a las diferentes temperaturas de tratamiento; por claridad, el espectro de las nanocápsulas de partida se presenta por separado.

El espectro DRIFT-FTIR de las nanocápsulas híbridas liposoma@*am*-Ce(OH)CO₃.xH₂O obtenidas siguiendo el procedimiento escalado por convección natural muestra características que son diferentes a las del espectro ATR-FTIR presentado en la Figura 3.10. La diferencia fundamental es la presencia de una banda intensa centrada en 1582 cm⁻¹ que enmascara las bandas debidas al carbonato de la cubierta. Esta banda debe atribuirse al estiramiento C=O de la urea (Stewart, 1957; Grdadolnik y Maréchal, 2002).

La presencia de esta banda es inesperada, y es consecuencia de un relativamente elevado remanente de urea que no fue eliminado durante el lavado de las nanocápsulas. Dada la intensidad de esta banda, el pico a 1477 cm^{-1} debe asignarse al estiramiento C-N, y no necesariamente a carbonato. De todas maneras, las bandas a 1075 y 850 cm^{-1} identifican al carbonato de los recubrimientos. Las bandas a 2926 , 2852 , 1733 y 758 cm^{-1} corresponden a los fosfolípidos encapsulados. El espectro de las nanocápsulas calentadas a 100°C por 2 horas muestra las mismas características de aquel mostrado en la Figura 3.21.

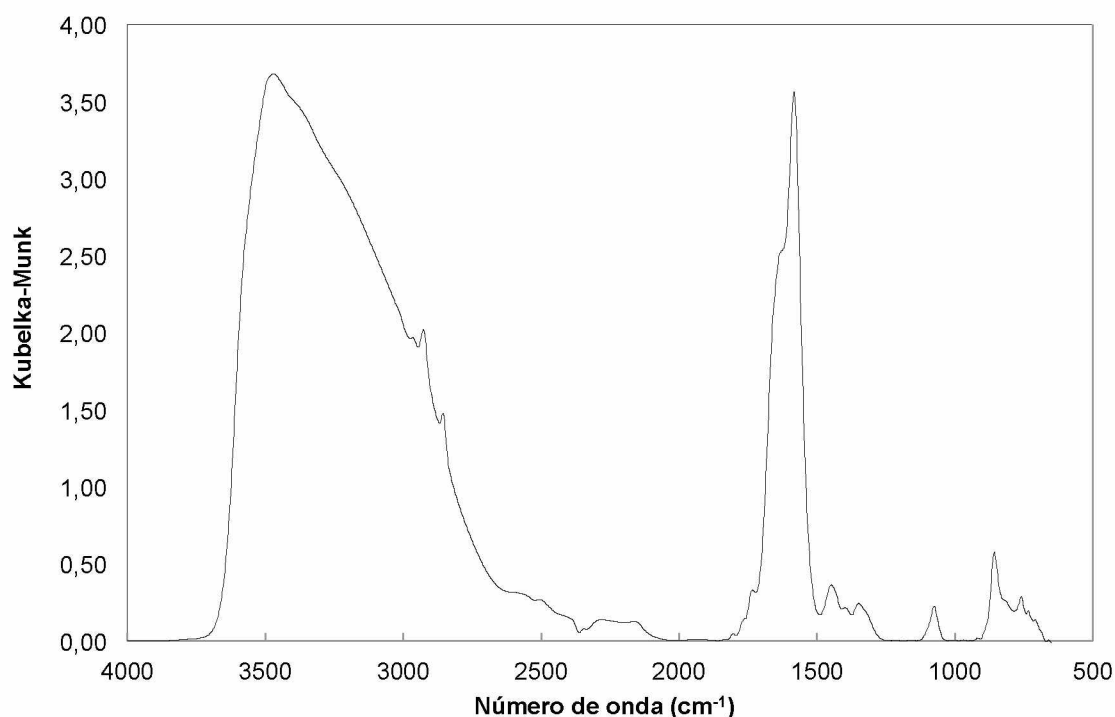


Figura 3.21. Espectros DRIFT-FTIR de nanocápsulas híbridas de partida.

Las bandas más intensas debidas a carbonato son mucho más evidentes cuando la muestra es tratada a 200°C (Figura 3.22). A esa temperatura desaparece la banda debida a la urea; también desaparecen las bandas debidas a las cadenas de los fosfolípidos. Las bandas debidas al carbonato del recubrimiento de $am\text{-Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ aparecen a 200°C en las posiciones 1505 y 1365 cm^{-1} , algo desplazadas de las posiciones observadas en el espectro ART-FTIR. Este desplazamiento puede atribuirse a cambios del modo de coordinación de los aniones carbonato, causados durante el tratamiento térmico; estas bandas se separan a medida que el carbonato pasa de mono-coordinado a di-coordinado (Nakamoto, 1986).

A medida que el tratamiento térmico progresa, la separación de estas bandas aumenta levemente, y en concordancia con la descarbonatación de Ce(OH)CO_3 , su intensidad decrece progresivamente, hasta alcanzar los 600°C donde las bandas se extinguen por completo. De la misma manera, la banda ancha a $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, debida al agua, disminuye con el correr del calentamiento.

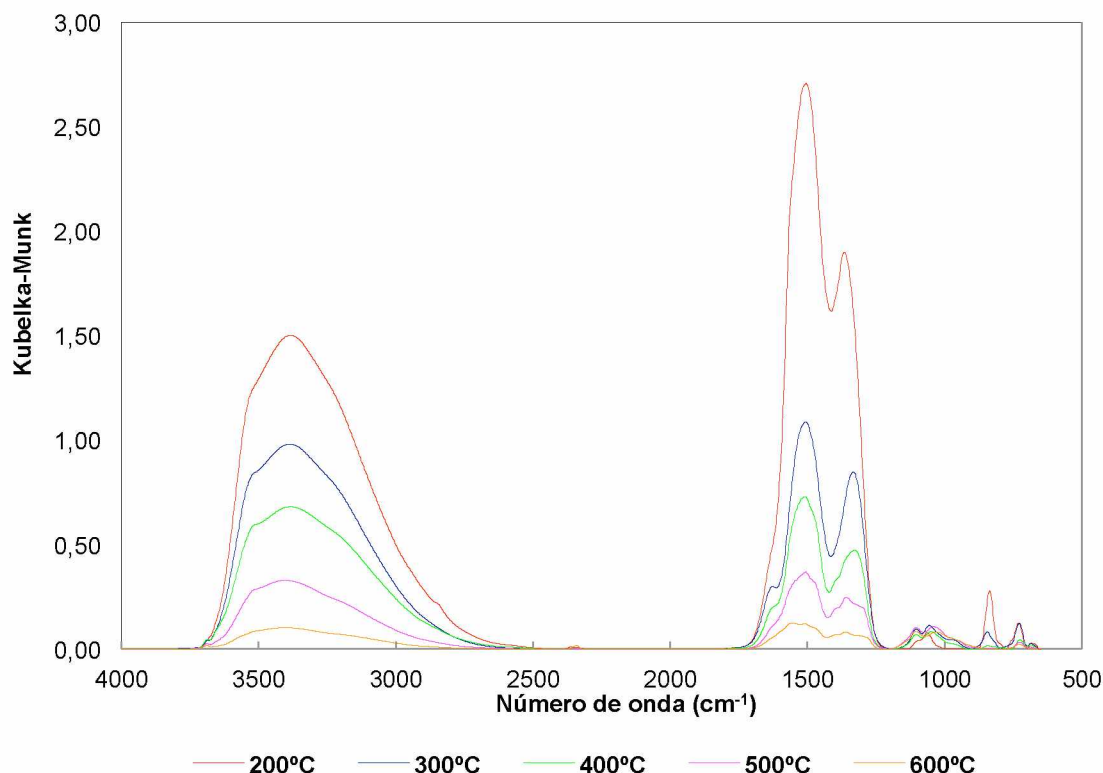


Figura 3.22. Espectros DRIFT-FTIR de nanocápsulas híbridas tratadas térmicamente desde 200 a 600°C.

Es interesante destacar que en los espectros de las muestras calcinadas a 500 y 600°C se distinguen, aunque muy levemente, bandas a 1105 y 1032 cm^{-1} que son atribuibles al fosfato de cerio (Fowler et al., 1993) formado en la reacción entre los grupos fosfonato de los fosfolípidos y las cubiertas de $\text{Ce}(\text{OH})\text{CO}_3$.

El comportamiento térmico de las nanocápsulas liposoma@*am*- $\text{Ce}(\text{OH})\text{CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ se presenta en la Figura 3.23. La Figura 3.23 (arriba) muestra la pérdida de masa de las nanocápsulas, (medio) la derivada dm/dT en función de la temperatura, y (abajo) el análisis térmico diferencial. El análisis termogravimétrico de las nanocápsulas muestra que éstas pierden el 4.3% de su masa cuando la temperatura alcanza 180°C. Esta caída de peso debe atribuirse principalmente a la pérdida del agua de cristalización de las cubiertas inorgánicas. Este proceso es endotérmico (Aiken et al., 1998). Sin embargo, la Figura 3.23 (abajo) muestra un evidente pico exotérmico, centrado a 130°C, que denota la combustión del remanente de urea, o a 190°C, donde se aprecia otro leve proceso exotérmico. En concordancia, las bandas IR debidas a la urea y a las cadenas del fosfolípido desaparecen luego del tratamiento a 200°C (Figura 3.22).

Luego, a medida que el tratamiento térmico avanza, la pérdida de masa de las nanocápsulas ocurre en tres etapas, más o menos diferenciadas, ubicadas entre 210-295°C, 295-365°C y 365-430°C, respectivamente (Figura 3.23, arriba, y medio). La primera de estas etapas representa uno o dos procesos que son netamente endotérmicos; la Figura 3.23 (abajo) presenta un hombro ancho entre 210-270°C y un pico negativo centrado en 283°C.

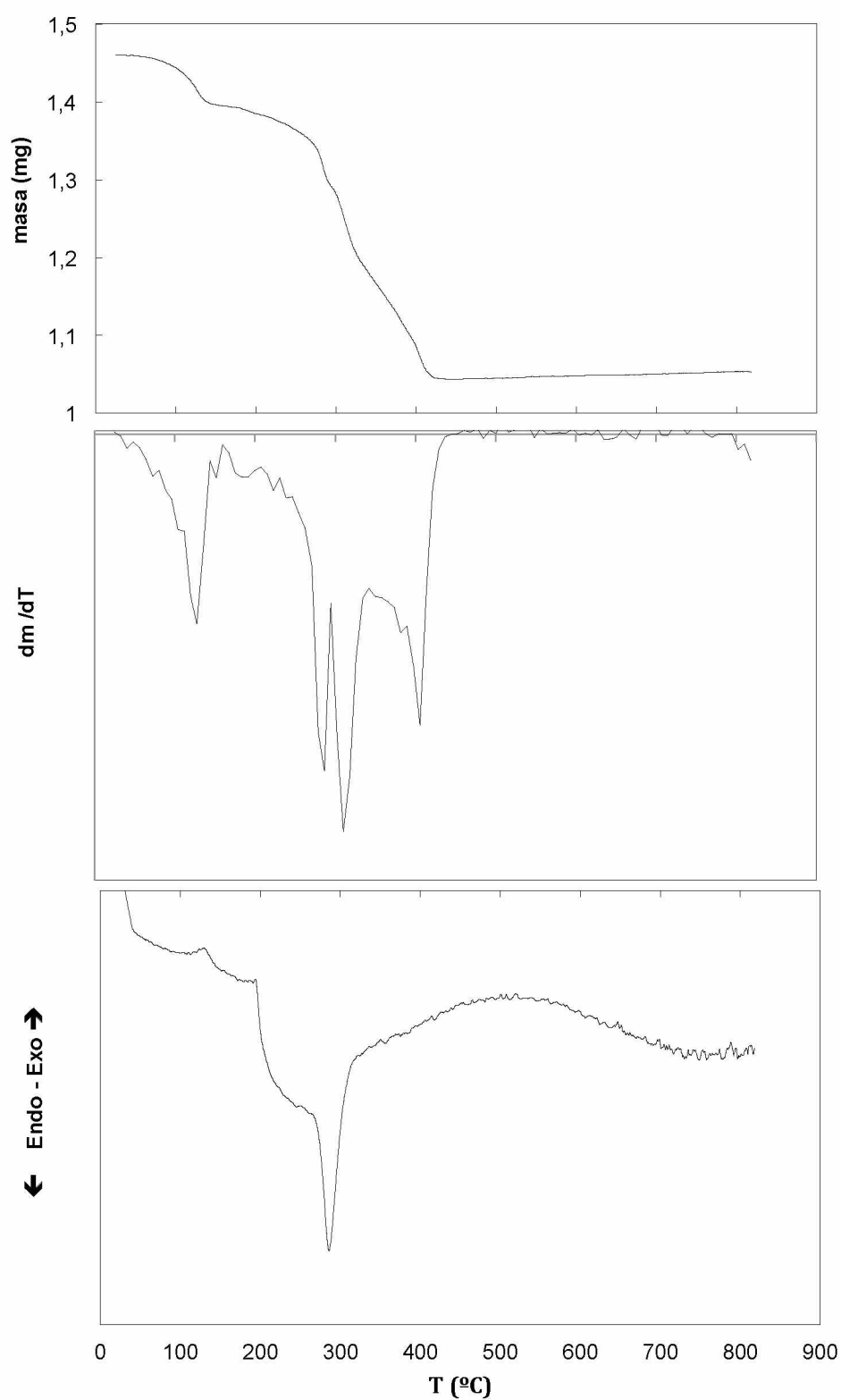
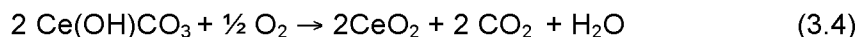


Figura 3.23. Comportamiento térmico de las nanocápsulas liposoma@am-Ce(OH)CO₃. Análisis termogravimétrico (arriba), derivada de la masa en función de la temperatura (medio), y análisis térmico diferencial (abajo).

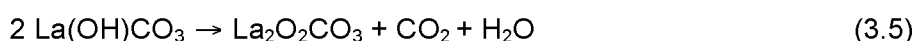
De acuerdo a la bibliografía (Liu et al., 1999; Wang et al., 2007; Guo et al., 2009; Li et al., 2010), la descomposición térmica de Ce(OH)CO_3 cristalino a CeO_2 (Ecuación 3.4), ocurre entre 270 y 450°C, en una única etapa.



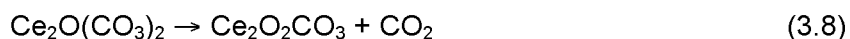
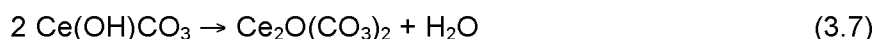
Esta reacción es endotérmica, y se detecta como una depresión aguda centrada alrededor de los 280°C en el análisis térmico diferencial (Wang et al., 2007; Guo et al., 2009); esta depresión es evidente (Figura 3.23, abajo).

Si suponemos que el análisis termogravimétrico, presentado en la Figura 3.23 (arriba), refleja solo la calcinación de $\text{Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (esto es, despreciamos la contribución debida a la masa de los fosfolípidos y del agua que conforman el corazón de las nanocápsulas), y aceptamos que la primera etapa representa la pérdida de agua de cristalización, “x” debería ser igual a 0.53, y la pérdida total de masa debería haber sido del 24.1%, que es inferior a la observada (28.5%). De esta manera, podemos suponer que la contribución de los liposomas a la masa de las nanocápsulas *liposoma@am-Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}* debe ser cercana al 4.4%; nótese que los grupos fosfonatos reaccionan para dar fosfatos térmicamente estables (Figura 3.22). Obviamente, la contribución relativa de los liposomas a la masa dependerá del espesor de las cubiertas. Esta pérdida de masa, sin embargo, no es evidente en el termograma, por lo que es probable que la pérdida del corazón acuoso de las nanocápsulas ocurra durante la condensación de los oxidrilos del carbonato básico, que conduce a la cristalización de las cubiertas. Posiblemente, el hombro endotérmico observado entre 210 y 270°C (Figura 3.23, abajo) refleje parte de esa pérdida.

En el caso de otros Ln(OH)CO_3 cristalinos, por ejemplo, La(OH)CO_3 , se observó que éstos descomponen en dos etapas muy bien diferenciadas, que ocurren dentro de los intervalos de temperatura 427-576°C y 707-837°C (Sun et al., 1986), y que corresponden respectivamente a las reacciones:



Según Jobbágy et al. (2009), estas etapas no se diferencian durante la descomposición térmica de Ce(OH)CO_3 cristalino en aire (Ecuación 3.4), por que la fácil oxidación de Ce(III) a Ce(IV) inestabiliza la estructura del oxocarbonato. Sin embargo, la Figura 3.23 (arriba) sugiere que la formación de las partículas huecas de CeO_2 tiene lugar en tres etapas. Estas pueden ser:



Es probable que, en este caso la oxidación de las cadenas alquílicas de los fosfolípidos sea parcial, produciendo una atmósfera reductora local que estabiliza al Ce(III) . De todos modos, los porcentajes parciales de pérdida de masa observados no se conciben con los predichos por la Ecuaciones 3.7, 3.8 y 3.9 debido, probablemente, a la

superposición de los varios pasos involucrados durante la formación de las partículas huecas de CeO_2 a partir de las nanocápsulas liposoma@*am*- $\text{Ce}(\text{OH})\text{CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$.

El muy leve aumento de la masa que se aprecia en la Figura 3.23 (arriba) por encima de los 430°C debe atribuirse a la oxidación de Ce_2O_3 remanente.

La Figura 3.24 presenta la microfotografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión, y el patrón de difracción de electrones de las partículas huecas de CeO_2 correspondiente a la muestra calcinada. El patrón de difracción indica claramente que el tratamiento térmico conduce a la cristalización de los recubrimientos amorfos de $\text{Ce}(\text{OH})\text{CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ sin que éste pierda su morfología esférica.

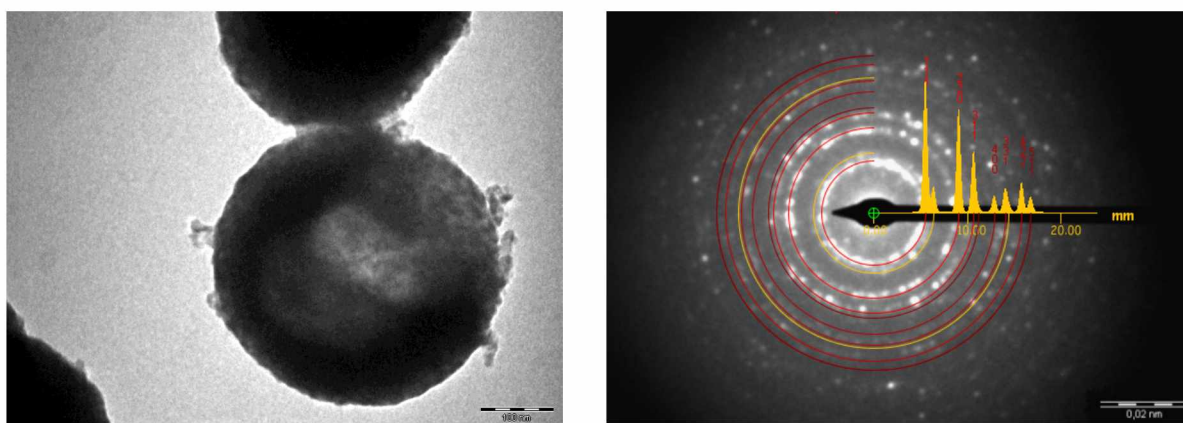


Figura 3.24. Microfotografía de microscopía electrónica de transmisión (izquierda) y patrón de difracción de electrones por área selecta (derecha) de las nanoesferas huecas de CeO_2 obtenidas después del tratamiento térmico escalonado de nanocápsulas liposoma@*am*- $\text{Ce}(\text{OH})\text{CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. La temperatura final fue 600°C .

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES.

Este trabajo demuestra que el método de alcalinización homogénea por hidrólisis forzada de urea posibilita, de forma simple y reproducible bajo ciertos cuidados, la formación de recubrimientos de $\text{Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ amorfo sobre la superficie de liposomas de fosfatidilcolina. También demuestra que las nanocápsulas híbridas $\text{liposoma}@am\text{-Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ son precursores adecuados para la obtención de partículas huecas de CeO_2 por calcinación. Este proceso permite la eliminación del núcleo acuoso del molde blando, y la transformación de la cáscara que mantiene su forma original.

Los aspectos más relevantes para garantizar la preparación de las nanocápsulas precursoras de las partículas huecas de CeO_2 son sólo unos pocos. En primer lugar, los liposomas deben permanecer estables durante la formación del recubrimiento. Para esto deben seleccionarse condiciones de síntesis que no afecten la estabilidad de los liposomas, incluyendo concentraciones de cerio (III) y de urea, temperatura de síntesis, y fundamentalmente, la forma de homogenizar el sistema. Para esto, la temperatura y los tiempos de síntesis deben ser seleccionados de tal forma que la velocidad de hidrólisis de urea permita la precipitación total de $\text{Ce(OH)CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ amorfo en tiempos que sean lo suficientemente cortos para evitar la transformación de los recubrimientos en $\text{Ce}_2\text{O(CO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ cristalino. Por otra parte, las concentraciones iniciales de cerio (III) y de urea, y la temperatura de síntesis, deben asegurar que la nucleación de la fase sólida se produzca exclusivamente de manera heterogénea. Cumplidas estas condiciones, los espesores de los recubrimientos puede controlarse a través del ajuste de las concentraciones de los liposomas y de cerio (III).

CAPÍTULO V

BIBLIOGRAFÍA.

Aiken B., Hsu W. P., y Matijevic E. (1998). Preparation and properties of monodispersed colloidal particles of lanthanide compounds. III. Yttrium(III) and mixed yttrium(III)/cerium(III) systems. *J. Am. Ceram. Soc.*, 10, 845.

Bégu S., Durand R., Lerner D. A., Charnay C., Tourné-Péteilh C., y Devoisselle J. M. (2003). Preparation and characterization of siliceous material using liposomes as template. *Chem. Commun.*, 640.

Bellino M. G., y Regazzoni A. E. (2009). Coating liposomes with yttrium basic carbonate: making hybrid nanocapsules. *J. Colloid Interface Sci.*, 333, 812.

Brookhaven Instruments Corporation. (1998). Instruction manual for BI-9000 AT digital autocorrelator.

Candal R., Regazzoni A. E., y Blesa M. A. (1993). Precipitation of monodispersed mixed copper-gadolinium basic carbonate particles. *Colloids Surf. A*, 79, 191.

Chen F., Chen Z., Li X., y Zhao X. (2011). Synthesis of CeO₂ hollow nanosphere using carbon sphere as template. *J. Chin. Ceram. Soc.*, 39, 397.

Chen C., y Tripp C. P. (2008). An infrared spectroscopic based method to measure membrane permeance in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1778, 2266.

Deng W., Chen D., y Chen L. (2015). Synthesis of monodisperse CeO₂ hollow spheres with enhanced photocatalytic activity. *Ceram. Int.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.04.170> (en prensa).

Dong Y., Hampshire S., Lin B., Ling Y., y Zhang X. (2010). High sintering activity Cu–Gd Co-doped CeO₂ electrolyte for solid oxide fuel cells. *J. Power Sources.*, 195, 6510.

Fowler B. O., Markovic M., y Brown W. E. (1993). Octacalcium phosphate. 3. Infrared and Raman vibrational spectra. *Chem. Mater.*, 5, 1417.

Frigenli U. (1977). The structure of lipids and proteins studied by attenuated total reflection (ATR) infrared spectroscopy. II. Oriented layers of homologous series: Phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine. *Z. Naturforsch.*, 32, 20.

Grdadolnik J., y Maréchal Y. (2002). Urea and urea water solutions an infrared study. *J. Mol. Struct.*, 615, 177.

Guo Z., Du F., y Cui Z. (2009). Hydrothermal synthesis of single-crystalline CeCO₃OH flower-like nanostructures and their thermal conversion to CeO₂. *Mater. Chem. Phys.*, 113, 53.

Guo Z., Jian F., y Du F. (2009). A simple method to controlled synthesis of CeO₂ hollow microspheres. *Script Mater.*, 61, 48.

Hosokawa S., Iwamoto S., y Inoue M. (2008). Synthesis of nanocrystalline rare earth oxides by glycothermal method. *Mater. Res. Bull.*, 43, 3140.

Hsu W. P., Ronnquist L., y Matijevic E. (1988). Preparation and properties of monodispersed colloidal particles of lanthanide compounds. 2. Cerium (IV). *Langmuir*, 4, 31.

Hubert D., Jung M., Frederik P., Bohmans P., Meuldijk J., y German A. (2000). Vesicle-directed growth of silica. *Adv. Mater.*, 12, 1286.

Jin H., Wang N., Xu L., y Hou S. (2010). Synthesis and conductivity of cerium oxide nanoparticles. *Mater. Lett.*, 64, 1254.

Jobbágy M., Mariño F., Schönbrod B., Baronetti G., y Laborde M. (2006). Synthesis of copper-promoted CeO₂ catalysts. *Chem. Mater.*, 18, 1945.

Jobbágy M., Sorbello C., y Sileo E. E. (2009). Crystalline Ce(III)–La(III) double basic carbonates: A chemical shortcut to obtain nanometric La(III)-doped ceria. *J. Phys. Chem. C.*, 113, 10853.

Kartsonakis I. A., Liatsi P., Daniilidis I., y Kordas G. (2008). Synthesis, characterization, and antibacterial action of hollow ceria nanospheres with/without a conductive polymer coating. *J. Am. Ceram. Soc.*, 91, 372.

Kaspar J., Fornasiero P., y Graziani M. (1999). Use of CeO₂ based oxides in the three way catalysis. *Catal. Today*, 50, 285.

Kuchma M. H., Komanski C. B., Colon J., Teblum A., Masunov A. E., Alvarado B., Babu S., Seal S., Summy J., y Baker C. H. (2010). Phosphate ester hydrolysis of biologically relevant molecules by cerium oxide nanoparticles. *Nanomedicine: NBM.*, 6, 738

Leskelä M., Kukli K., y Ritala M. (2006). Rare-earth oxide thin films for gate dielectrics in microelectronics. *J. Alloys Compd.*, 418, 27.

LaMer V. K. Y Dinegar R. H. (1950). Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 4847.

Li C. R., Cui M. Y., Sun Q. T., Dong W. J. Zheng Y. Y., Tsukamoto K., Chen B. Y., y Tang W. H. (2010). Nanostructures and optical properties of hydrothermal synthesized CeOHCO₃ and calcined CeO₂ with PVP assistance. *J. Alloys Compd.*, 504, 498.

Li L., Yang H. K., Moon B. K., Choi B. C., Jeong J. H., y Kim K. H. (2010). Photoluminescent properties of Ln₂O₃:Eu³⁺ (Ln=Y, Lu and Gd) prepared by hydrothermal process and sol–gel method. *Mater Chem. Phys.*, 119, 471.

Li X. L., Lou T. J., Sun X. M. y Li Y. D. (2004). Highly sensitive WO₃ hollow-sphere gas sensors. *Inorg. Chem.*, 43, 5442.

- Liu S., Ma R., Jiang R., y Luo F. (1999). Precipitation and characterization of cerous carbonate. *J. Cryst Growth*, 206, 88.
- Lou X. W., Archer L. A., y Yang Z. (2008). Hollow micro/nanostructures: Synthesis and applications. *Adv. Mater.*, 20, 3987.
- Lucovsky G., Zhang Y., Whitten J. L., Schlom D. G., y Freeouf J. L. (2004). Spectroscopic studies of the electrical structure of transition metal and rare earth complex oxides. *Physica E*, 21, 712.
- Mai H. X., Sun L. D., Zhang Y. W., Si R., Feng W., Zhang H. P., Liu H. C., y Yan C. H. (2005). Shape-selective synthesis and oxygen storage behavior of ceria nanopolyhedra, nanorods, and nanocubes. *J. Phys. Chem. B*, 109, 24380.
- Matijevic E. (1986). Monodispersed colloids: art and science. *Langmuir*, 2, 12.
- Matijevic E. (1993). Preparation and properties of uniform size colloids. *Chem. Mater.*, 5, 412.
- Matijevic E., y Hsu W. P. (1987). Preparation and properties of monodispersed colloidal particles of lanthanide compounds I. gadolinium, europium, terbium, samarium, and cerium(III). *J. Colloid Interface Sci.*, 118, 506.
- Russbueltd B. M., y Hoelderich W. F. (2010). New rare earth oxide catalysts for the transesterification of triglycerides with methanol resulting in biodiesel and pure glycerol. *J. Catal.*, 271, 290.
- Sabín J. (2007). Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Sabín J., Prieto G., Messina P. V., Ruso J. M., Hidalgo-Alvarez R., y Sarmiento F. (2005). On the effect of Ca^{2+} and La^{3+} on the colloidal stability of liposomes. *Langmuir*, 21, 10968.
- Sasidharan M., Zenibana H., Nandi M., Bhaumik A., y Nakashima K. (2013). Synthesis of mesoporous hollow silica nanospheres using polymeric micelles as template and their application as a drug-delivery carrier. *Dalton Trans.*, 42, 13381.
- Schmidt H. T., Gray B. L., Wingert P. A., y Ostafin A. E. (2004). Assembly of aqueous-cored calcium phosphate nanoparticles for drug delivery. *Chem. Mater.*, 16, 4942.
- Schmidt H. T., y Ostafin Agnes E. (2002). Liposome directed growth of calcium phosphate nanoshell. *Adv. Mater.*, 14, 532.
- Schubert D., Dargusch R., Raitano J., y Chan S. W. (2006). Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342, 86.
- Shen W., Dong X., Zhu Y., Chen H. y Shi J. (2005). Mesoporous CeO_2 and CuO-loaded mesoporous CeO_2 : Synthesis, characterization, and CO catalytic oxidation property. *Micropor. Mesopor. Mater.*, 85, 157.

Shih S. J., Wu Y. Y., Chen C. Y., y Yu C. Y. (2012). Morphology and Formation Mechanism of Ceria Nanoparticles by Spray Pyrolysis. *J. Nanopart. Res.*, 14, 1.

Silva G. (2006). Seeing the benefits of ceria. *Nanomedicine*, 1, 92.

Sinha A. K., y Suzuki K. (2005). Preparation and characterization of novel mesoporous ceria-titania. *J. Phys. Chem. B.*, 109, 1708.

Soler-Illia G. J. A. A. (1999). Mecanismos de precipitación de partículas monodispersas de precursores de óxidos mixtos. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Soler-Illia G. J. A. A., Jobbagy M., Candal R. J., Regazzoni A. E., y Blesa M. A. (1998). Synthesis of metal oxide particles from aqueous media: The homogeneous alkalization method. *J. Disper. Sci, Technol.*, 19, 207.

Soler-Illia G. J. A. A., Jobbágy M., Regazzoni A. E., y Blesa M. A. (1999). Synthesis of nickel hydroxide by homogeneous alkalization. Precipitation mechanism. *Chem. Mater.*, 11, 3140.

Strandwitz N. C., y Stucky G. D. (2009). Hollow microporous cerium oxide spheres templated by colloidal silica. *Chem. Mater.*, 21, 4577.

Stewart J. E. (1957). Infrared absorption spectra of urea, thiourea, and some thiourea-alkali halide complexes. *J. Chem. Phys.*, 26, 248.

Sun J., Kyotani T., y Tomita A. (1986). Preparation and characterization of lanthanum hydroxide carbonate. *J. Solid. State Chem.*, 65, 94.

Sun L., Yao J., Liu C., Liao C. y Yan C. (2000). Rare earth activated nanosized oxide phosphors: synthesis and optical properties. *J. Lumin.*, 87, 447.

Sun X., Liu J., y Li Y. (2006). Use of carbonaceous polysaccharide microspheres as templates for fabricating metal oxide hollow spheres. *Chem. Eur. J.*, 12, 2039.

Sun Y., Mayers B. T., y Xia Y. (2002). Template-engaged replacement reaction: A one-step approach to the large-scale synthesis of metal nanostructures with hollow interiors. *Adv. Mater.*, 2, 481.

Tana, Li J., Li H., Li Y., y Shen W. (2009). Morphology-dependent redox and catalytic properties of CeO₂ nanostructures: Nanowires, nanorods and nanoparticles. *Catal. Today*, 148, 179.

Tarnuzzer R. W., Colon J., Patil S., y Seal S. (2005). Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage. *Nano Lett.*, 5, 2573.

Thakur S., y Patil P. (2014). Rapid synthesis of cerium oxide nanoparticles with superior humidity-sensing performance. *Sensors Actuat. B- Chem.*, 194, 260.

Titirici M. M., Antonietti M., y Thomas A. (2006). A generalized synthesis of metal oxide hollow spheres using a hydrothermal approach. *Chem. Mater.*, 18, 3808.

Wang S., Gu F., Li C., y Cao H. (2007). Shape-controlled synthesis of CeOHCO_3 and CeO_2 microstructures. *J. Cryst. Growth*, 307, 386.

Wang C., Yan J., Li Z., Wang H., y Cui X. (2013). Investigation on raspberry-like magnetic-hollow silica nanospheres and its preliminary application for drug delivery. *J. Nanopart. Res.*, 15, 1.

Wang S., Zhang J., Jiang J., Liu R., Zhu B., Xu M., Wang Y., Cao J., Li M., Yuan Z., Zhang S., Huang W., y Wu S. (2009). Porous ceria hollow microspheres: Synthesis and characterization. *Micropor. Mesopor. Mater.*, 123, 349.

Wang X., Hu P., Fangli Y., y Yu L. (2007). Preparation and characterization of ZnO hollow spheres and ZnO-carbon composite materials using colloidal carbon spheres as templates. *J. Phys. Chem. C.*, 111, 6706.

Wang X., Tian W., Zhai T., Zhi C., Bando Y., y Golberg D. (2012). Cobalt (II,III) oxide hollow structures: Fabrication, properties and applications. *J. Mater. Chem.*, 22, 23310.

Yan Z. G., y Yan C. H. (2008). Controlled synthesis of rare earth nanostructures. *J. Mater. Chem.*, 18, 5046.

Zhao F., y Virkar Anil V. (2010). Effect of morphology and space charge on conduction through porous doped ceria. *J. Power Sources*, 195, 6268.