



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Universidade de Vigo

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN
INVESTIGACIÓN QUÍMICA Y QUÍMICA
INDUSTRIAL**

UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Rafhali Solís Pérez

**Óxido de Grafeno Químicamente Modificado
para Bioaplicaciones**

Directores

Alejandro Criado Fernández

Jesús Mosquera Mosquera



CICA | CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS AVANZADAS

Septiembre 2022

Agradecimientos

Agradezco a Dios por acompañarme en todo momento, por ayudarme y protegerme en todo este recorrido y nunca perder la fe.

Al ministerio de Educación Superior Ciencia y Tecnología (MESCYT) de mi país, República Dominicana, por otorgarme una beca para el máster en investigación Química y Química Industrial, para seguir avanzando en mis metas de desarrollo personal y profesional. A la Universidad de la Coruña, al Coordinador Carlos Jiménez, y los maestros que colaboraron para que me pudiera incorporar al máster a pesar del tiempo en que ingrese.

A mis directores de TFM Alejandro Criado Fernández y Jesús Mosquera Mosquera, por su paciencia y dedicación, por orientarme y enseñarme no solo en el campo científico, sino también por mostrarme tantos conocimientos para el desarrollo de mis competencias personales y profesionales. Por igual agradezco todos sus consejos brindados, los cuales tienen mucho valor para mí.

Al grupo NanoSelf, en especial a Sandra Baulde, María Pérez y Adrián Martínez por acogerme, acompañarme y hacerme sentir perteneciente al grupo durante todas las prácticas y momentos compartidos, ¡gracias!. Al grupo Carbon Biotechnology Group en el CIC biomaGUNE en San Sebastián, España, por toda la ayuda proporcionada, en cuanto a materiales y análisis instrumentales requeridos durante el desarrollo de las prácticas de este TFM.

Gracias a mi familia, en especial a mis padres Rafael Solís y Sandra Pérez y mi hermana Frahili Solís Pérez por darme todo el apoyo que necesitaba, mucho cariño, estar siempre conmigo, estar de acuerdo con mis decisiones y por todos los valores que me han inculcado.

A mis amigos y compañeros, Leticia Jazmín, Vanessa Méndez, Jenny Gonzales, Luis García y Rikelvi Fermín que me acompañaron a emprender esta aventura.

Y a mi familia Inteciana que siempre me brindaron su cariño, se alegraron por esta oportunidad que recibí y porque en todo momento desearon lo mejor para mí.

Muchas gracias a todos.

Abreviaturas

ϵ : Coeficiente de extinción

Ω : Ohmio

μ : micro (usado junto a las unidades de medidas requeridas)

λ_{exc} : Longitud de onda de excitación

π : pi (usado en enlaces tipo pi)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AFM: *Atomic Force Microscopy* (Microscopía de fuerza atómica)

DFO: deferoximina B

Fe-DFO: feroximina

FID: *Free induction decay* (señal de respuesta de decaimiento por inducción libre)

dsDNA: ADN bicatenario

ssDNA: ADN monocatenario

GO: Oxido de grafeno

h: hora/s

IRM: Imágenes por Resonancia Magnética

ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo

kDa: kilo dalton

KED: energía cinética

l-GO: *large Graphene Oxide* (Oxido de Grafeno con medidas laterales de mayor tamaño)

min: minuto/s

mg: miligramos

mL: mililitros

mmol: milimoles

N: numero de neutrones

NFS: fibrosis sistémica nefrogénica

pH: potencial de hidrógeno

RF: radiofrecuencia

rpm: revoluciones por minuto

SPIO: small superparamagnetic particles of iron oxide (partículas superparamagnéticas de óxido de hierro)

ta: temperatura ambiente

TEA: trietilamina

TEM: *Transmission electronic Microscopy* (Microscopía de transmisión electrónica)

TF-IR: Espectroscopia de infrarrojo con Transformada de Fourier

TGA: *Thermogravimetric Analysis* (Análisis Termogravimétrico)

usGO: usGO: *ultrasmall Graphene Oxide* (Oxido de Grafeno ultrapequeño)

usGO/DFO: Oxido de Grafeno *ultrasmall* funcionalizado con deferoximina B

usGO/Fe: Oxido de Grafeno ultra pequeño funcionalizado con Fe³⁺

usGO/Fe-DFO: Oxido de Grafeno ultra pequeño funcionalizado con feroximina

Uv-vis: Espectroscopia Ultravioleta visible

USPIO: *ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide* (partículas superparamagnéticas ultrapequeñas de óxido de hierro)

XPS: *X Ray photoelectric spectroscopy* (Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X).

Z: número atómico (número de protones o electrones de un átomo neutro)

Resumen

Con el objetivo de diseñar una nueva familia de agentes de contraste para imagen por resonancia magnética, en este trabajo de fin de máster se ha llevado a cabo la síntesis de derivados de óxido de grafeno equipados con iones paramagnéticos de Fe^{3+} . Concretamente, se han sintetizado dos tipos de nanomateriales basado en óxido de grafeno ultrapequeño (usGO).

El primero de estos nanomateriales se preparó mediante la incubación del usGO con la sal de Fe^{3+} . De esta forma el ión metálico se une directamente al GO mediante una interacción directa con los grupos oxigenados del usGO. En el segundo tipo, la unión del metal al usGO se logró a través de un sideróforo orgánico selectivo al ión Fe^{3+} (deferroxamina B). Para la síntesis de este segundo nanomaterial se llevaron a cabo dos estrategias. En la primera de ellas, el sideróforo DFO se complejó con el hierro en una primera etapa y luego el complejo fue anclado covalentemente al usGO. En la última estrategia, el usGO se trató con el sideróforo DFO para anclarlo covalentemente. A continuación, se trató el nanomaterial modificado con una sal de Fe^{3+} para unir el metal.

Los nanomateriales sintetizados en este TFM fueron caracterizados mediante: espectroscopía UV-vis, ICP-MS, TEM, AFM, IR, Raman; TGA y potencial z.

Resumo

Co obxectivo de deseñar unha nova familia de axentes de contraste para a imaxen por resonancia magnética, neste traballo de fin de máster realizouse a síntese de derivados de óxido de grafeno equipados con ións paramagnéticos Fe^{3+} . En concreto, sintetizáronse dous tipos de nanomateriais baseados en óxido de grafeno ultrapequeno (usGO).

O primeiro destes nanomateriais preparouse incubando usGO coa sal Fe^{3+} . Deste xeito, o ión metálico únese directamente ao GO mediante unha interacción directa cos grupos osixenados de usGO. No segundo tipo, a unión do metal a usGO conseguiuuse mediante un sideróforo orgánico selectivo para o ión Fe^{3+} (deferoxamina B). Para a síntese deste segundo nanomaterial leváronse a cabo dúas estratexias. No primeiro, o sideróforo DFO foi complexado con ferro nunha primeira etapa e despois o complexo uniuse covalentemente a usGO. No último enfoque, usGO foi tratado co sideróforo DFO para ancoralo covalentemente. Despois, o nanomaterial modificado foi tratado cunha sal Fe^{3+} para unir o metal.

Os nanomateriais sintetizados neste TFM caracterizáronse por espectroscopia UV-vis, ICP-MS, TEM, AFM, IR, Raman; TGA e potencial z.

Abstract

With the aim of designing a new family of contrast agents for magnetic resonance imaging, the synthesis of graphene oxide derivatives equipped with paramagnetic Fe^{3+} ions were carried out in this master's thesis. Specifically, two types of ultra-small graphene oxide (usGO) based nanomaterials have been synthesized.

The first of these nanomaterials was prepared by incubating usGO with a Fe^{3+} salt. In this way, the metal ion binds directly to the GO through a direct interaction with the oxygenated groups of the usGO. In the second type, the binding of the metal to the usGO was achieved through an organic siderophore selective to the Fe^{3+} ion (deferoxamine B). For the synthesis of the second nanomaterial, two strategies were carried out. First, the DFO siderophore was complexed with Fe^{3+} in a first step and then the complex was covalently bonded to usGO. In the latter approach, usGO was treated with DFO siderophore to covalently anchor it. Then, the modified nanomaterial was treated with an Fe^{3+} salt to bind the metal.

The nanomaterials synthesized in this TFM were characterized by: UV-vis, ICP-MS, TEM, AFM, IR, Raman, TGA and Z-potential spectroscopy.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Grafeno.....	1
1.2. Oxido de grafeno	1
1.2.1. Síntesis del oxido de grafeno	2
1.2.2. Funcionalización del Oxido de Grafeno	3
1.2.3. Aplicaciones Biomédicas del Oxido de Grafeno	4
1.3. Imagen por Resonancia Magnética.....	5
1.3.1. Agentes de Contraste para Imágenes de Resonancia Magnética (IRM).....	6
1.3.2. Complejos de hierro como agentes de contraste.....	8
1.4. Sideróforos	8
2. Objetivos	11
3. Resultados y Discusión.....	12
3.1. Preparación de usGO a partir de IGO	13
3.2. Síntesis y caracterización usGO funcionalizado con especies de Fe ³⁺	19
4. Parte Experimental	28
4.1. Reactivos y disolventes.....	28
4.2. Instrumentación	28
4.3. Preparación del usGO.....	31
4.4. Funcionalización del usGO.....	31
4.4.1. Complejación de óxido del usGO con Fe ³⁺ (usGO/Fe)	31
4.4.2. Funcionalización de usGO con Fe-DFO (usGO/Fe-DFO)	32
4.4.3. Funcionalización del usGO con DFO (usGO/DFO).....	32
4.4.4. Complejación del Fe ³⁺ con el usGO modificado químicamente con DFO (usGO/DFO).....	33
5. Conclusión.....	34
6. Bibliografía	37

1. Introducción

1.1. Grafeno

El grafeno es un nanomaterial 2D constituido por una sola capa de grafito.¹ Este material fue obtenido por primera vez en 2004 por A.K. Geim and K. Novoselov, por lo cual dichos autores recibieron en 2010 el premio Nobel en física.² Los carbonos del grafeno presentan una hibridación sp^2 y forman por una red aromática hexagonal. Por este motivo, cada carbono presenta un electrón localizado en los orbitales p_z (π) perpendiculares a la lámina, dando lugar a enlaces altamente deslocalizados (π) que le confieren a este material propiedades estructurales, ópticas, mecánicas y electrónicas excepcionales.³

Algunas de las propiedades más interesantes del grafeno son:³

- Es un semiconductor sin banda prohibida y los portadores de carga en el grafeno tienen una masa efectiva muy pequeña. Por este motivo los electrones pueden fluir a través del grafeno más fácilmente que incluso a través del cobre.
- La transparencia óptica de una sola capa de grafeno en el rango visible es del 97,7 % y disminuye linealmente a medida que aumenta el número de capas.
- Es uno de los materiales más fuertes con una resistencia mecánica superior a la del diamante. Además, es flexible y estirable hasta un 20% de su longitud inicial.

1.2. Oxido de grafeno

A pesar de las extraordinarias propiedades del grafeno comentadas anteriormente, este material también presenta importantes desventajas. Una de las principales es su baja estabilidad coloidal, tanto en un medio acuoso como en la mayoría de los disolventes orgánicos, debido a que sus laminas tienden en aglomerarse. Este hecho dificulta su aplicación en biomedicina y ha promovido que la comunidad científica busque materiales 2D alternativos.⁴

Uno de los materiales 2D más relevantes es el óxido de grafeno (GO), el cual consiste en una monocapa de átomos de carbono formada por dominios aromáticos y carbonos oxidados con hibridación sp^3 . Concretamente, en el GO se pueden encontrar una amplia variedad de grupos funcionales oxigenados, tales como epóxidos, hidroxilos,

carbonilos y carboxilos. Estos grupos convierten al GO en un material con alta polaridad, por lo que es considerado como un derivado hidrofílico del grafeno.⁵

En cuanto a su estructura, el óxido de grafeno está constituido por una red aromática hexagonal al igual que el grafeno, pero la adición de los grupos oxigenados reduce su carácter aromático (cambio de hibridación de los carbonos sp^2 a sp^3) empleando cambios en su propiedades mecánicas, eléctricas y químicas (Figura 1).⁴ Dichos grupos dotan al GO de una superficie química más rica, que permite mayores interacciones en su medio, siendo así un material prometedor para distintas bioaplicaciones médicas.⁶

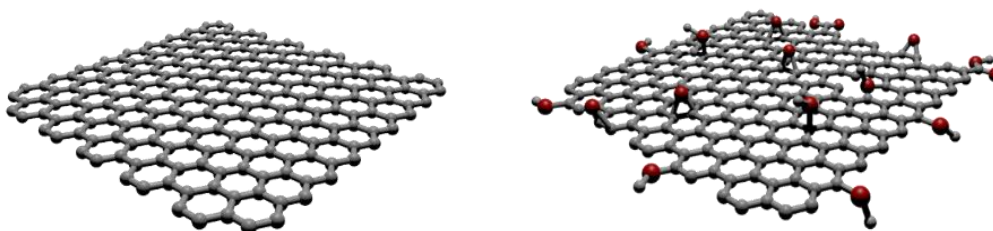


Figura 1. A) Representación gráfica de la estructura de grafeno B) Representación gráfica de la estructura del óxido de grafeno (GO), donde las esferas de color rojo representan los grupos oxigenados.

1.2.1. Síntesis del óxido de grafeno

El método más popular para obtener GO es el de Hummers-Offeman que consiste en oxidar grafito con nitrato de sodio ($NaNO_3$), ácido sulfúrico (H_2SO_4) y permanganato de potasio ($KMnO_4$). Este método proporciona un buen rendimiento y requiere menos tiempo que otros métodos desarrollados anteriormente. El producto final de la síntesis de GO es una suspensión acuosa de color amarillo de partículas GO (Figura 2).^{2,7}

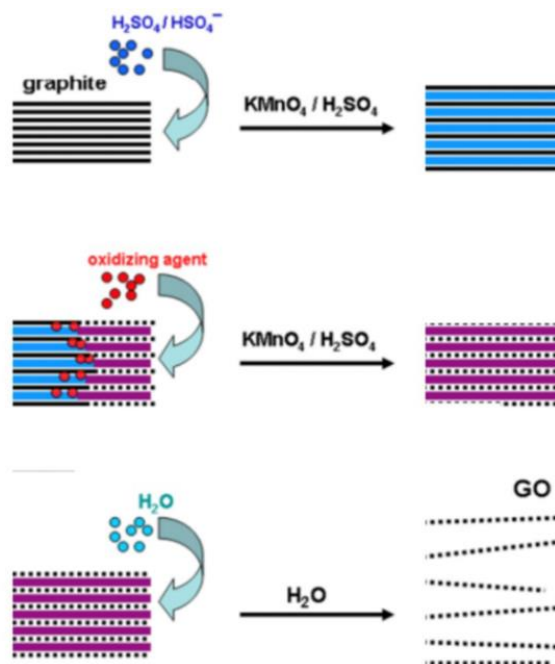


Figura 2. Esquema del mecanismo de obtención del GO a partir de la oxidación del grafito (método Hummers-Offeman).

Para completar las reacciones químicas, generalmente se requiere una agitación intensa o incluso ultrasonidos. Durante esta reacción se generan láminas de GO de diferentes tamaños y se ha demostrado que el tamaño de estas láminas tiene un importante impacto en las propiedades biológicas del GO. Recientemente, se ha comenzado a explorar para aplicaciones biológicas un tipo de GO denominado óxido de grafeno ultrapequeño (**usGO**)^{2,6,8} que está formado por láminas de grafeno con longitudes laterales entre 50 y 500 nm. Los óxidos de grafenos con medidas laterales de mayor tamaño se suelen denominar **IGO**, esta abreviatura proviene de su nombre en inglés *large graphene oxide*.²

1.2.2. Funcionalización del Óxido de Grafeno

Desafortunadamente, las estrategias para la funcionalización del grafeno están limitadas por la estabilidad del sistema π aromático. Por esta razón, se opta por el óxido de grafeno que contiene muchos grupos funcionales diferentes en su superficie, lo que permite aplicar varias estrategias de modificación que optimicen su rendimiento, mejoren su solubilidad y lo hagan útil para aplicaciones electroquímicas y biomédicas.⁹

Se han explorado y establecido dos métodos principales para las modificaciones superficiales del GO, covalentes o no covalentes.¹⁰ En el método covalente se saca ventaja de la gran cantidad de grupos hidroxilo, grupos epoxi y grupos carboxilo presentes en la superficie de GO. La presencia de estos grupos facilita algunas reacciones comunes como la acilación carboxílica, la isocinación, la diazotización y la apertura del anillo epoxi.¹¹

La funcionalización no covalente del GO se basa principalmente en las fuerzas de van der Waals o interacciones π - π con moléculas orgánicas o polímeros que cumplen algunos criterios básicos. Por lo general, las fuerzas de van der Waals se desarrollan entre GO y moléculas orgánicas o polímeros con alto carácter hidrofóbico, mientras que las interacciones π - π son comunes entre GO y moléculas con un sistema π corto o muy extenso. Debido a la presencia regular de grupos carboxilos en el GO, este material tiene carga negativa por lo que la interacción con materiales catiónicos está favorecida.¹²

Cabe destacar que la funcionalización covalente es más estable que la no covalente. Sin embargo, la introducción de moléculas reactivas aumenta el número de defectos sp^3 e incluso provoca la ruptura de la estructura del carbono y como resultado, las propiedades electrónicas intrínsecas se ven alteradas.¹⁰

1.2.3. Aplicaciones Biomédicas del Oxido de Grafeno

En los últimos años el GO y sus derivados funcionalizados han mostrado tener gran potencial para bioaplicaciones médicas por las siguientes razones:^{4,13}

- El GO tiene una gran área superficial que le permite absorber o bioconjugarse de manera eficiente moléculas y polímeros funcionales, convirtiéndolo en un material biocompatible.¹⁴
- Se ha demostrado que el GO es un material que presenta baja toxicidad. En estudios *in vitro* no se han mostrado efectos citotóxicos del GO en el interior de las células¹⁵⁻¹⁷.
- Además, GO presenta una excelente biodegradabilidad, pues las enzimas oxidativas (es decir, las peroxidasas) son capaces de catalizar la degradación del óxido de grafeno.^{14,16}

En particular, el usGO es frecuentemente utilizado para aplicaciones biomédicas, debido que sus dimensiones le permiten formar dispersiones más homogéneas y estables¹⁸.

Según investigaciones recientes, el GO puede ser usado para transportador de fármacos para el tratamiento de algunos cánceres. Por ejemplo, la funcionalización de GO con grupos de ácido sulfónico y moléculas de ácido fólico permite dirigir este nanomaterial específicamente a células de cáncer de mama humano con receptores de ácido fólico.^{11,13,18,19}

Por otro lado, el GO se ha usado ampliamente como biodetector de ADN debido a su interacción preferencial por el ADN monocatenario (ssDNA) respecto el ADN bicatenario (dsDNA). Esto unido a la capacidad del GO para apagar la fluorescencia de fluoróforos orgánicos permite diseñar sensores específicos de secuencia para ssDNA.²⁰

La presencia de regiones aromáticas sp² dentro de una matriz sp³ puede conducir al confinamiento de los electrones π en GO. La recombinación radiactiva de pares electrón-hueco en tales cúmulos sp² puede dar lugar a fluorescencia el tamaño del cúmulo sp² local determina la brecha de energía local y, por lo tanto, la longitud de onda de la fluorescencia emitida. Una emisión en la región UV-visible puede ocurrir a partir de grupos sp² con tamaños de menos de 1 nm. Por otro lado, los dominios sp² que son mayores de 2 nm poseen espacios más pequeños y pueden explicar la emisión de rojo a IR cercano. La fuerte absorbancia óptica de GO en la región del IR cercano se ha aplicado para la terapia fototérmica *in vivo*.²¹

1.3. Imagen por Resonancia Magnética

La imagen por resonancia magnética (IRM) es una técnica no invasiva, utilizada en diagnóstico clínico, para visualizar tejidos con una elevada resolución. Esta técnica, se ha convertido en una herramienta esencial en la medicina moderna desde la década de los ochenta y actualmente en el mundo existen unos 20000 escáneres de IRM.²²

La IRM se base en el fenómeno físico de la resonancia magnética (RM) por el cual partículas como los electrones, protones y los núcleos atómicos con un número impar de protones (Z) y/o un número impar de neutrones (N) pueden absorber selectivamente

energía de radiofrecuencia al ser sometidos a un campo magnético. Concretamente, la IRM usada en clínica aprovecha la resonancia magnética del núcleo ^1H .²³

Para obtener una imagen de RM, el objeto que se desea visualizar se coloca en un campo magnético uniforme. De esta forma, los núcleos de hidrógeno del objeto se alinean con el campo magnético y crean un momento magnético neto. A continuación, se aplica un pulso de radiofrecuencia (RF), perpendicular al campo lo que hace que el momento de los hidrógenos se incline y deje de estar alineado con el campo magnético. Una vez que se elimina la señal de RF, los núcleos se realinean de tal manera que su momento magnético neto vuelve a ser paralelo al campo magnético. Este retorno al equilibrio se conoce como relajación y va acompañado de una emisión de energía que se conoce como señal se denomina señal de respuesta de decaimiento por inducción libre (FID). La señal de respuesta del FID se mide mediante una bobina de campo conductora colocada alrededor del objeto del que se está formando la imagen y se usa para reconstruir la imagen de IRM.²³

1.3.1. Agentes de Contraste para Imágenes de Resonancia Magnética (IRM)

La IRM tiene la desventaja de ser una técnica de baja sensibilidad, lo que dificulta la interpretación de las imágenes obtenidas. La resolución de estas imágenes depende del contenido en agua presente en cada tejido. Este contenido varía de unos a otros, no solo por la naturaleza del tejido, sino también debido a la presencia de procesos patológicos que produzcan alteraciones en el contenido en agua.²⁴

Para mejorar la resolución, se usan agentes de contraste para IRM que son sustancias que, introducidas en el organismo por cualquier vía, permiten resaltar y hacer más opacas estructuras anatómicas normales (vasos, órganos) y patológicas (tumores). Los agentes de contraste son capaces de reducir los tiempos de relajación T1 (longitudinal) y T2 (transversal) de los protones de agua adyacentes al momento de recibir los pulsos convencionales magnéticos.²⁵

Esta reducción de T1 o T2 da lugar a aumentos en la intensidad de la señal que predominan en las imágenes ponderadas, por lo tanto, los agentes de contraste T1 son

positivos y los T2 negativos. Los agentes de contraste T1 son sustancias paramagnéticas y los agentes T2 son superparamagnéticos.²⁵

Los agentes de contraste basados en T1 son sustancias paramagnéticas que acortan el tiempo de relajación en T1 (longitudinal) y provocan un contraste positivo. Por lo general son complejos metálicos solubles en agua basados en metales paramagnéticos como disprosio (Dy^{3+}), el gadolinio (Gd^{3+}) o el ion manganeso (Mn^{2+}). Los complejos de Gd^{3+} , representan la clase de agentes de contraste más común y ampliamente utilizada en aplicaciones y estudios preclínicos. Esto se debe a su elevado momento magnético debido a su configuración de 7 electrones desapareados en su estado fundamental $[Xe]4f^7$. Para su uso en el cuerpo se han diseñado quelatos estables, de la combinación de estos iones paramagnéticos con ligandos, que se excretan intactos, lo que reduce significativamente la toxicidad.²⁶

Los agentes de contraste basados en T2 son sustancias superparamagnéticas que generan un contraste negativo en IRM. Generalmente, están hechos de partículas de óxidos de hierro y materiales macromoleculares de recubrimiento. Las partículas de óxidos de hierro se clasifican en función de su tamaño; si el diámetro (d) es menor a 50 nm, se denominan partículas de partículas superparamagnéticas ultrapequeñas de óxido de hierro (USPIO), mientras que, si mide mayor a 50 nm, se les conoce como partículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIO), y superan los 200 nm, son las partículas grandes. Entre los recubrimientos macromoleculares más típicos para estas partículas se encuentra el dextrano, carboxidextrano, polisacáridos, quitosano, almidón, heparina, albumina y poliestireno.²⁶

Actualmente los complejos de Gd^{3+} son los agentes de contraste más usado en la clínica debido a su contraste positivo y alta eficacia (debido a su alta carácter paramagnético). Sin embargo, a pesar de que se administra en forma de complejo para reducir su toxicidad, el uso de estos agentes se ha asociado con trastornos como la fibrosis sistémica nefrogénica (NFS). Además, también se han observado depósitos de gadolinio en el cerebro después de uso.²⁵

1.3.2. Complejos de hierro como agentes de contraste

Actualmente, existe un gran interés por parte de la comunidad científica por desarrollar agentes de contraste para IRM más seguros. Hacia este fin, uno de los principales enfoques es sustituir el Gd^{3+} por otros iones de metales de transición paramagnéticos menos tóxicos. Iones metálicos como el Mn^{2+} y Fe^{3+} son menos tóxicos que el gadolinio y se encuentran de manera natural en el cuerpo humano. Aunque, estos metales tienen menos electrones desapareados que el Gd^{3+} (ambos iones tienen configuraciones electrónicas d^5), se ha demostrado que los complejos de Fe^{3+} monohidratados son candidatos muy atractivos para el diseño de agentes de contraste IRM. Estos complejos son especialmente efectivos en los campos magnéticos altos de los escáneres clínicos modernos.²⁶

Es importante destacar que la eficiencia de los agentes de contraste puede ser aumentada al conjugarlos a otro tipo de entidades químicas de mayor tamaño (por ejemplo, nanomateriales) ya que de este modo se disminuye considerablemente la velocidad de rotación de la estructura generada y lo que da lugar a una mayor respuesta en la relajatividad del medio.²¹

1.4. Sideróforos

Los sideróforos son compuestos biosintetizados por muchos microorganismos, principalmente bacterias y hongos. Dichos compuestos presentan una gran afinidad y selectividad para quelatar iones de Fe^{3+} . Generalmente incluyen grupos funcionales de ácido hidroxámico, catecol o ácido α -hidroxicarboxílico (Figura 3) que coordinan al que coordinan al hierro dando lugar a complejos octaédricos de gran estabilidad. A pesar de que existe una gran variedad de sideróforos descritos, la mayoría están formados por aminoácidos no proteinogénicos y D-aminoácidos. aminoácidos.²⁷

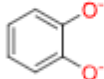


Tipo de ligando	Estructura	pK _a
catecolato		9.2, 13.0
hidroxamato		9.0
α-hidroxicarboxilato		3.0, 14.5

Figura 3. Ligandos más comunes en los sideróforos.

Debido a la gran afinidad de los sideróforos por el Fe^{3+} , la especificidad de sus receptores de membrana, y el papel clave que juegan en las infecciones bacterianas, el estudio de estos compuestos ha producido gran interés para el desarrollo de diferentes aplicaciones, principalmente en el campo de la medicina. Los sideróforos pueden ser usados como fármaco, sensores y antimicrobianos. El primer uso como fármaco de este tipo de compuestos se realizó con la aplicación del sideróforo deferroxamina B (DFO) (de la denominación Desferal®) para el tratamiento de intoxicaciones de hierro agudas y crónicas (Figura 4b). El quelato de Fe^{3+} que forma este compuesto se denomina ferrioxamina (Fe-DFO) y es soluble en agua, lo que permite su eliminación por los riñones (Figura 4a).²⁸

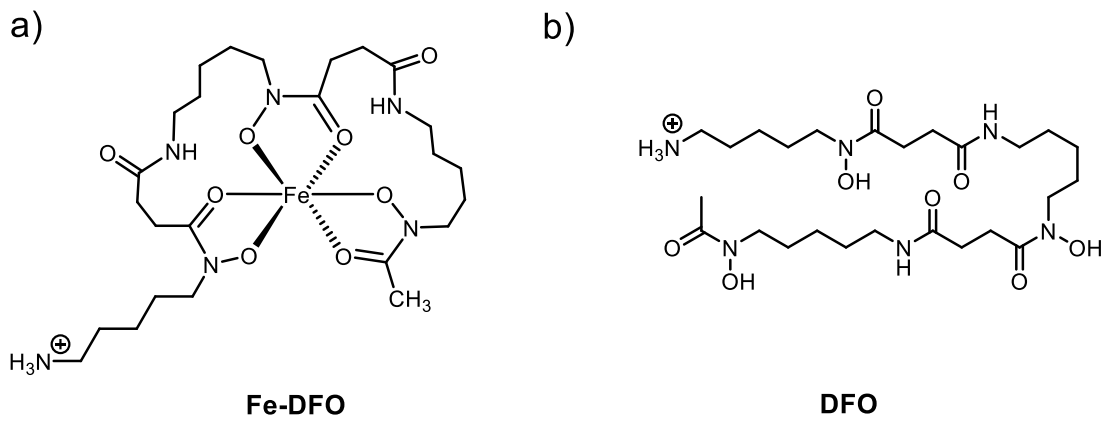


Figura 4. a) Estructura del ligando DFO complejado al hierro (Fe-DFO). b). Estructura del sideróforo deferoxamina B (DFO) utilizado como medicamento bajo la denominación Desferal®.

2. Objetivos

El objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Máster es la preparación de una nueva generación de agentes de contraste T1 para IRM a través de la combinación de **usGO** y Fe^{3+} como especie activa. Estos nuevos materiales podrían ser una alternativa a los actuales complejos de Gd^{3+} debido a la siguiente combinación de propiedades:

1. La unión del Fe^{3+} al **usGO** dará lugar a considerablemente la velocidad de rotación del complejo metálico mejorando la respuesta de relajatividad.
2. La conjugación al **usGO** puede ser usada también para controlar la localización del agente de contraste a nivel de tejido, lo que puede permitir una mejor detección de tejidos patológicos.
3. Baja toxicidad de los componentes.
4. Bajo coste de los componentes del sistema.

Concretamente, en este trabajo probaremos tres tipos de estrategias para la funcionalización del **usGO** con especies de Fe^{3+} (Figure 5). Por un lado, la primera estrategia se basará en evaluar si la unión directa el ion metálico al **usGO** a través de la coordinación con los grupos oxigenados del GO es suficiente para coordinar el Fe^{3+} de forma efectiva (**usGO/Fe**). La segunda estrategia consistirá en enlazar covalentemente el complejo ferrioxamina (**Fe-DFO**) al **usGO** para obtener **usGO/Fe-DFO**. En la tercera estrategia se dividirá en dos pasos, en el primero se enlazarán covalentemente el sideróforo DFO al **usGO** y en la segunda se introducirá el ion metálico al nanomaterial (**usGO/Fe-DFO**). Estas últimas estrategias se identificarán por **usGO/Fe-DFO(2)** y **usGO/Fe-DFO(3)** respectivamente.

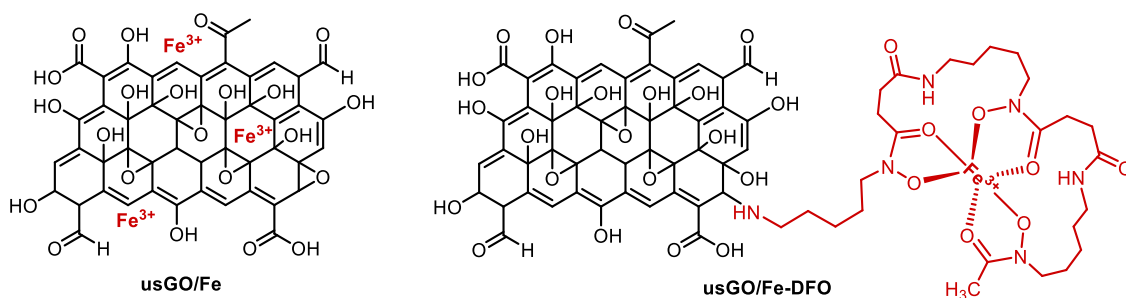


Figura 5. Estructura de los materiales objetivos de este trabajo. El **usGO** es un material heterogéneo por lo que aquí se hace sólo una representación orientativa.

3. Resultados y Discusión

En este apartado se expondrá inicialmente la obtención y caracterización de **usGO**. A continuación, se tratará la funcionalización y posterior caracterización de **usGO** con distintas especies que contienen Fe^{3+} .

Para la preparación de los nanomateriales paramagnéticos descritos en la parte de objetivos se siguieron las tres estrategias mostradas en la Figura 6. En todos los casos, la primera etapa fue la preparación de **usGO** a partir de grafito. La primera estrategia se centró en la obtención del nanomaterial **usGO/Fe** en el cual los átomos de Fe^{3+} están directamente conectados a los grupos oxigenados del **usGO**. Las otras dos estrategias tienen por objetivo la preparación del **usGO/Fe-DFO**. En la estrategia 2, el sideróforo DFO se complejó con el hierro en una primera etapa y luego el complejo fue anclado covalentemente al **usGO**. En la última estrategia, el **usGO** se trató con el sideróforo DFO para anclarlo covalentemente. A continuación, se trató el nanomaterial modificado con una sal de Fe^{3+} para complejar al metal. A continuación, se pasa a discutir cada una de estas etapas.

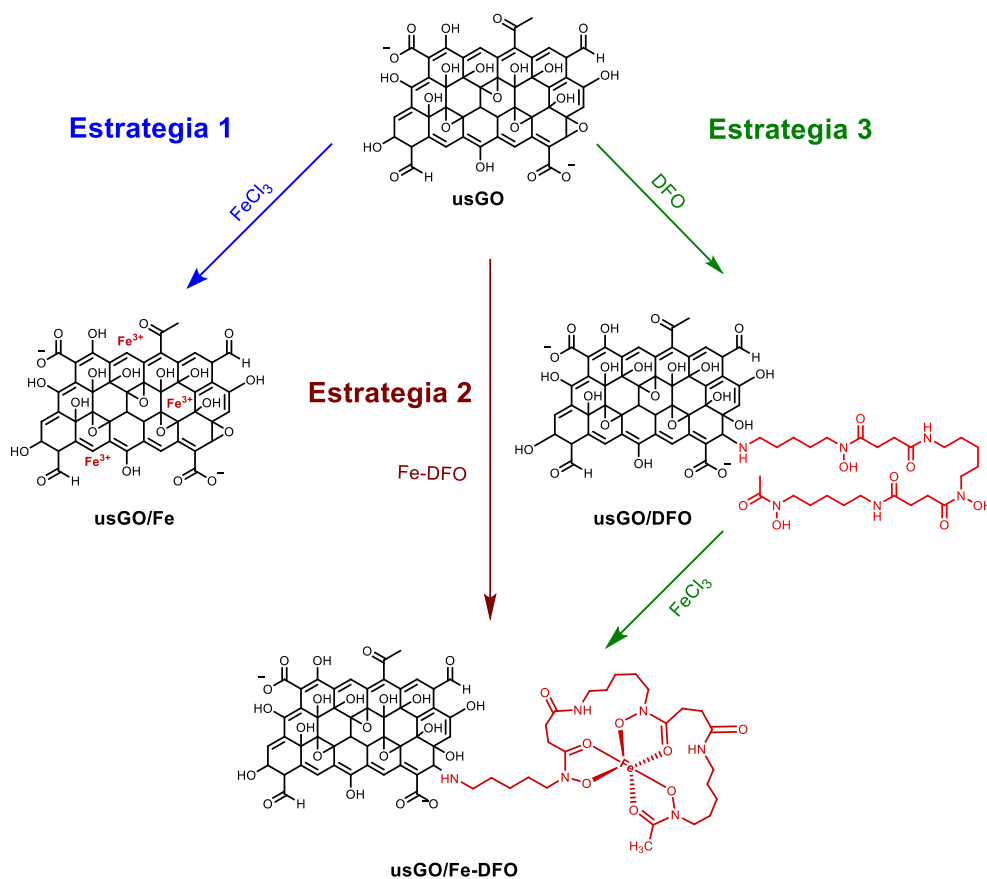


Figura 6. Esquema de las estrategias de funcionalización de **usGO** con Fe^{3+} .

3.1. Preparación de usGO a partir de IGO

Para la síntesis de **usGO** se utilizó el método descrito por Rodrigues y colaboradores (Figura 7). Para ello, se utilizó como material de partida una suspensión de **IGO** preparada previamente por nuestros colaboradores del grupo *Carbon Bionanotechnology* del CIC biomaGUNE. El **IGO** se obtuvo a partir de grafito utilizando unas condiciones ácidas y oxidativas fuertes.²

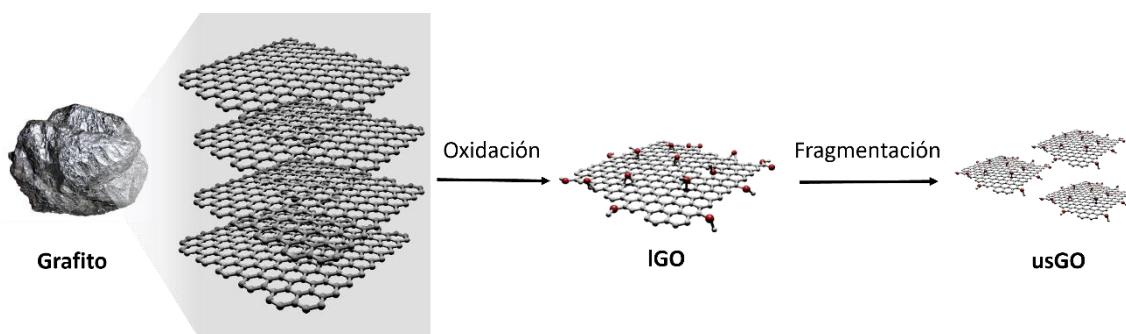


Figura 7. Representación esquemática de la obtención de **usGO** a partir de grafito, mediante un proceso de oxidación química del grafito seguido de una fragmentación producida por ultrasonidos.

Para la obtención del **usGO**, se sometió el **IGO** a un proceso de fragmentación asistido por ultrasonidos manteniendo la temperatura constante a 25°C (Figura 8). Cabe destacar que el control de la temperatura del baño es necesario para evitar procesos de reducción térmica no deseada. A continuación, se separó el **IGO** restante mediante centrifugación y nos quedamos el sobrenadante resultante que contiene el **usGO**. La concentración de **usGO** en el sobrenadante fue calculada mediante la liofilización de una parte de la dispersión y posterior pesada. De esta forma se obtuvo una concentración de **usGO** de 1.17 mg/mL. Las propiedades químico-físicas del **usGO** fueron estudiadas a través de microscopía de fuerza atómica (*Atomic Force Microscopy*, AFM); microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*, TEM); espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis), espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), Raman; análisis termogravimétrico (*thermogravimetric analysis*, TGA) y potencial Z.

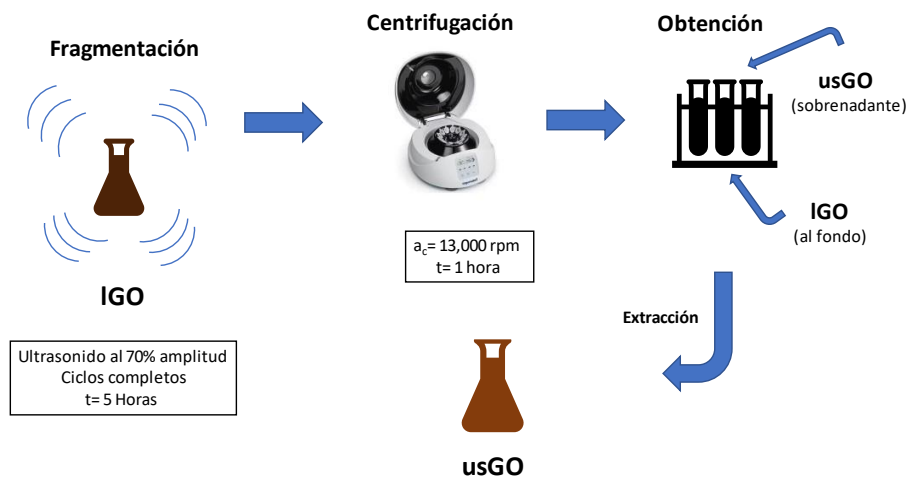


Figura 8. Esquema de la obtención de **usGO** a partir de **IGO**.

Para la determinación de las dimensiones de los derivados de GO, **usGO** y **IGO**, se utilizaron las microscopías AFM y TEM, respectivamente. A través de AFM, el **usGO** muestra una dimensión lateral promedio de (405 ± 154) nm (Figura 9a). Desafortunadamente, el **usGO** no se pudo caracterizar por TEM debido a su menor tamaño y falta de contraste.

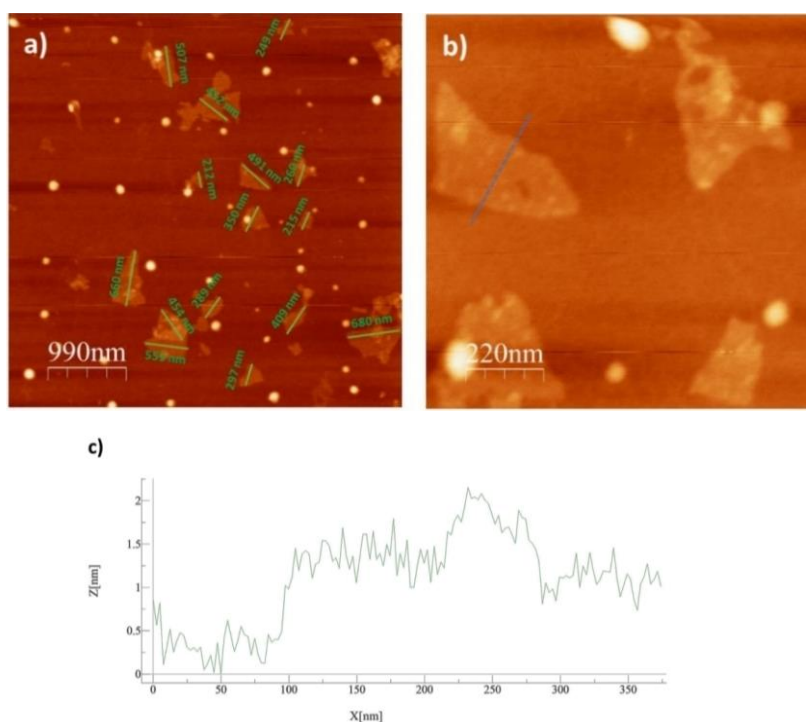


Figura 9. a-b) Imágenes AFM representativas del **usGO**. c) Perfil correspondiente a la altura definida por la línea azul punteada en b).

En cambio, las imágenes TEM del **IGO** exhibe una dimensión lateral mayor del orden de 5 μm , confirmando la reducción de tamaño a través de ultrasonidos (Figura 10).

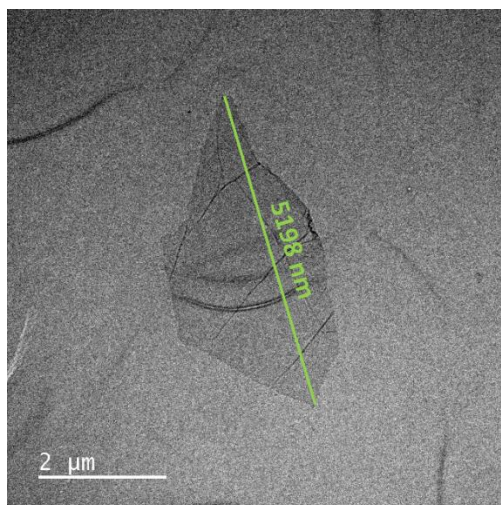


Figura 10. Imagen TEM representativa del **IGO**.

Mediante AFM, también se pudo estimar el número de capas de **usGO**. Se observó que esta estructura posee una altura comprendida entre 2.0-0.6 nm (Figura 9b-c). Considerando como valor teórico de una monocapa de GO 0.12 nm, se concluyó que el **usGO** estaría formado por 5-20 capas.⁵

La presencia de grupos funcionales presentes tanto en **usGO** y **IGO** en la superficie de ambos materiales se estudió mediante espectroscopías UV/Vis, FT-IR, Raman, TGA y potencial Z.

Las medidas de absorbancia para las suspensiones de **usGO** y **IGO** se muestran en la Figura 10 en un rango de concentraciones de 10-30 $\mu\text{g/mL}$. Dichos espectros muestran una banda intensa a 234 nm que se corresponde con las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los enlaces C=C. Además, se pudo identificar un hombro a 300 nm, que se asocia a las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ de los pares de electrones libres en los átomos de oxígeno que forman enlaces de tipo C=O. Esto confirma la presencia de grupos carbonilos y carboxilos en la superficie del GO (Figura 11).

Cabe destacar que ambas suspensiones muestran una dependencia lineal entre la concentración del material y la absorbancia obedeciendo a la ley de Lambert-Beer (ecuación 1):

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (\text{Ecuación 1}),$$

Donde A es la absorbancia de la muestra, ϵ el coeficiente de extinción, l la longitud de paso de la cubeta, y C la concentración de la muestra.

Aplicando así dicha la ley en la longitud de onda de máxima absorbancia (234 nm) se obtuvo un coeficiente de extinción de 0.037 y $0.040 \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para el **usGO** y el **IGO**, respectivamente.

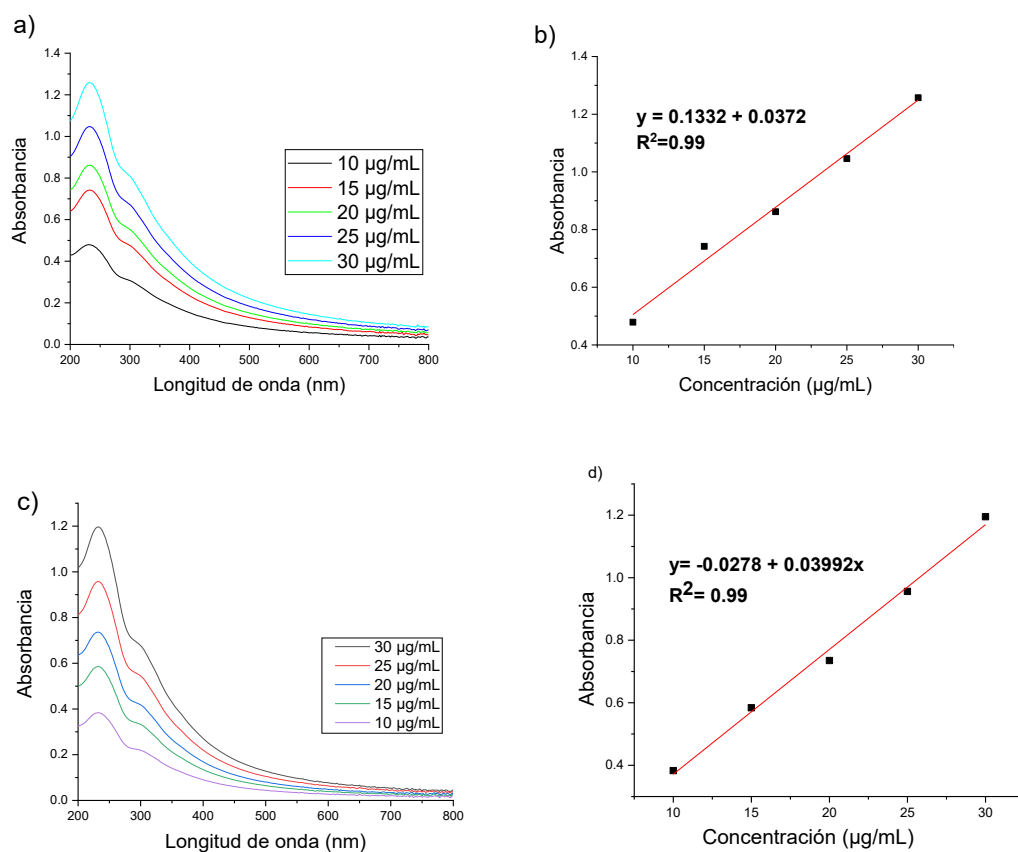


Figura 11. a y b) Espectro de absorbancia y curva de calibración para dispersiones **usGO**. c y d) Espectro de absorbancia y curva de calibración para dispersiones **IGO**.

A través de FT-IR se identificaron los grupos oxigenados principales presentes en **usGO** y **IGO** (Figura 12). En ambos derivados de GO se detectó una banda ancha e intensa entre $3700\text{-}2950 \text{ cm}^{-1}$, asociada a la vibración de tensión O-H de grupos hidroxilo, carboxilo y moléculas de agua adsorbidas.² En la región comprendida entre $1640\text{-}1660 \text{ cm}^{-1}$, se observó un pico intenso relacionado con las vibraciones de tensión de C=O, debido a la presencia de grupos cetónico y/o carboxilo. Sin embargo, no se detectó la

presencia de una banda a $\sim 1195\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a las vibraciones de tensión C-O típicas de fenoles, probablemente debido a su baja intensidad.

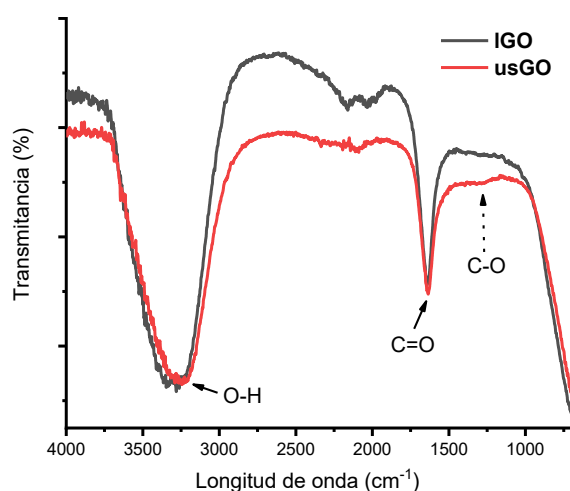


Figura 12. Los espectros FTIR de muestras **IGO** y **usGO**.

El TGA es una técnica muy utilizada en el campo de los nanomateriales de carbono. Se basa en calentar una pequeña cantidad de muestra ($\sim 0.5\text{ mg}$) con una rampa de temperatura creciente ($10^\circ\text{C}/\text{min}$) hasta aproximadamente 800°C . El gráfico de TGA muestra la pérdida de peso al cambiar la temperatura. Este análisis, dependiendo de las condiciones utilizadas, proporciona información sobre la termoestabilidad del material o información sobre la funcionalización orgánica. Concretamente, el TGA en atmósfera inerte (N_2) para derivados de GO nos permite evaluar el grado de oxidación ya que los grupos oxigenados de la oxidación del grafito presentan una elevada labilidad térmica. Los perfiles de TGA de **usGO** y **IGO** son muy similares entre sí, presentando dos pérdidas de peso claramente diferenciadas (Figura 13). La primera pérdida comprendida entre $100\text{-}200^\circ\text{C}$ se corresponde mayoritariamente con la descomposición de los grupos funcionales oxigenados (54 y 61 %, para **IGO** y **usGO**, respectivamente). La segunda pérdida de peso, a partir de 500°C se produce una degradación completa del material. Probablemente esto es debido al elevado número de defectos estructurales en la estructura grafitica de ambos derivados.

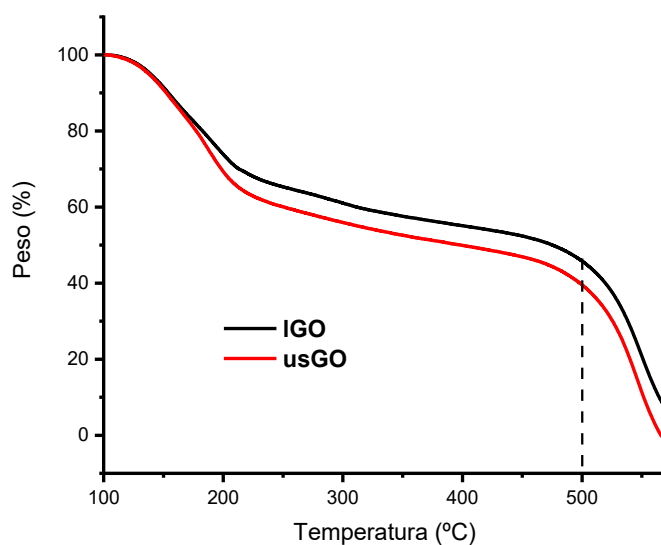


Figura 13. Curvas TGA de la descomposición térmica para **IGO** y **usGO** bajo atmósfera de N_2 .

La espectroscopía Raman permite estudiar de forma semicuantitativa el efecto de la oxidación y fragmentación en los derivados de GO. La excitación de **IGO** y **usGO** con un láser de 633 nm dio lugar a los espectros Raman de la Figura 14. En ambos casos se observó la presencia de las dos bandas típicas de GO, la banda D ($\sim 1330\text{ cm}^{-1}$) y la banda G ($\sim 1590\text{ cm}^{-1}$).²⁹ La elevada intensidad de la banda D (I_D) indica la presencia de una estructura gráfica con un elevado número de defectos. Éstos se asocian tanto con la pérdida de aromaticidad de la estructura gráfica como con las funcionalidades de oxígeno introducidas durante la oxidación de grafito. Para estudiar de forma semicuantitativa el efecto del proceso de oxidación y fragmentación en la estructura del GO, se calculó la relación de intensidad de las bandas D y G (I_D/I_G). El valor obtenido es mayor para el **usGO** ($I_D/I_G = 0.82$) respecto al **IGO** ($I_D/I_G = 0.60$), indicando que el **usGO** presenta una mayor cantidad de defectos. Probablemente, esta diferencia se deba a los defectos introducidos a través del proceso de fragmentación.

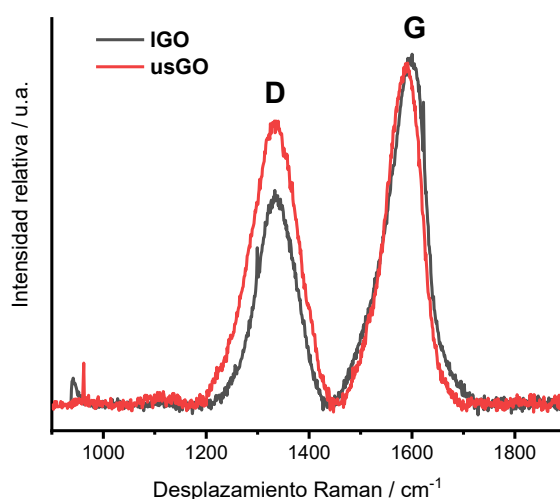


Figura 14. Espectro Raman de IGO (línea negra) y usGO (línea roja) a una longitud de onda de excitación de 633 nm.

3.2. Síntesis y caracterización usGO funcionalizado con especies de Fe^{3+}

Para la preparación de los derivados de GO paramagnéticos **usGO/Fe** y **usGO/Fe-DFO** se siguieron las rutas mostradas en la Figura 6. El **usGO/Fe** se preparó a partir del **usGO** mediante una complejación directa con Fe^{3+} (Estrategia 1, Figura 15). Sin embargo, para la preparación de **usGO/Fe-DFO** se llevó a cabo a través de dos estrategias de síntesis distintas: la preparación de **usGO/Fe-DFO** mediante la funcionalización directa con DFO/Fe (Estrategia 2), y la síntesis a través de una primera funcionalización del **usGO** con DFO seguida de la complejación del derivado de GO correspondiente con Fe^{3+} (Estrategia 3, Figura 16).

Estrategia 1

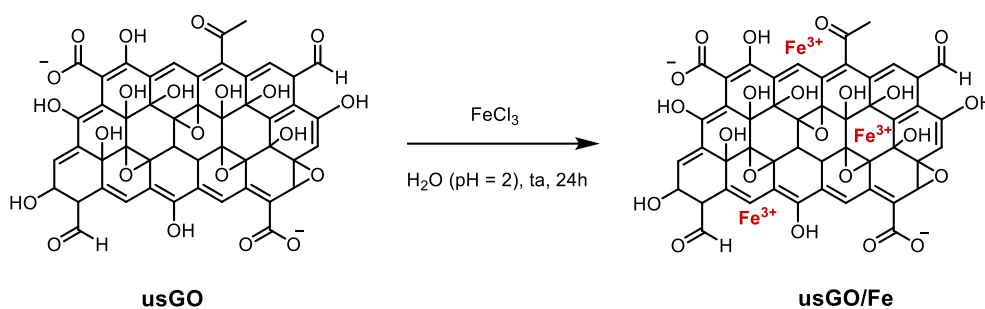


Figura 15. Representación esquemática de la síntesis de **usGO/Fe** denominada como estrategia 1.

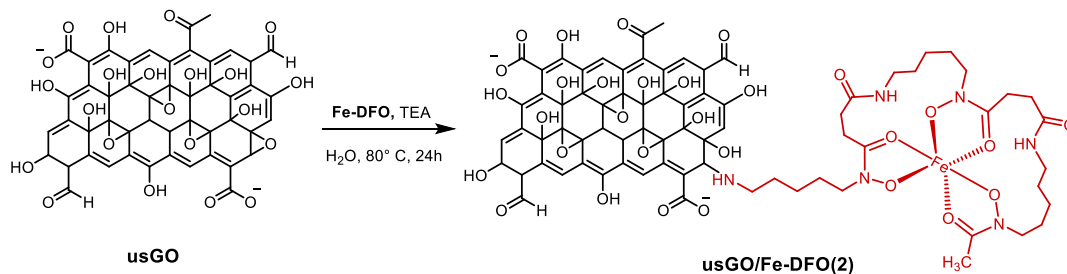
Los derivados de GO son capaces de complejar una variedad de cationes metálicos en su estructura debido a los diferentes grupos oxigenados que poseen, tales como epóxidos, alcoholes, cetonas, aldehídos y grupos carboxílicos, entre otros.³⁰ Concretamente, se conoce que el GO posee la capacidad de complejar Fe^{3+} dando lugar a derivados estables en suspensiones acuosas.³¹ Por ello, se decidió preparar el **usGO/Fe** tratando directamente el **usGO** con FeCl_3 (Figura 15). En esta síntesis fue necesario mantener el pH = 2 para evitar la precipitación del Fe^{3+} como óxidos de hierro. De esta forma se obtuvo el **usGO/Fe** como un sólido marrón con alta estabilidad coloidal en agua.

La obtención de **usGO/Fe-DFO** se basa, en ambas estrategias, en la funcionalización covalente del **usGO** con el derivado amínico correspondiente, DFO y DFO-Fe para las estrategias 2 y 3, respectivamente (Figura 16). Dicha amina actúa como nucleófilo permitiendo llevar a cabo la apertura de los anillos epóxido mediante catálisis básica. Se eligió este tipo de modificación química, en lugar de las reacciones que implican a los grupos carboxilo y carbonilo, ya que estos grupos epoxi son muy abundantes en la superficie del GO.¹⁸ Respecto a la utilización de dos estrategias de síntesis, el principal objetivo fue obtener la mayor cantidad de Fe^{3+} complejoado en el derivado de GO. Cabe destacar que las distintas muestras de **usGO/Fe-DFO** preparadas por la estrategias 2 y 3 se denominaron como **usGO/Fe-DFO(2)** y **usGO/Fe-DFO(3)**, respectivamente.

El **usGO/Fe-DFO(2)** se obtuvo como un sólido negro con una estabilidad coloidal en agua notable. Sin embargo, a través de la estrategia 3, tanto el **usGO/DFO** como **usGO/Fe-DFO(3)** presentaron una baja estabilidad en agua. Esto puede ser debido a un

proceso de agregación y/o reducción no controlada durante la modificación química del **usGO** con DFO.

Estrategia 2



Estrategia 3

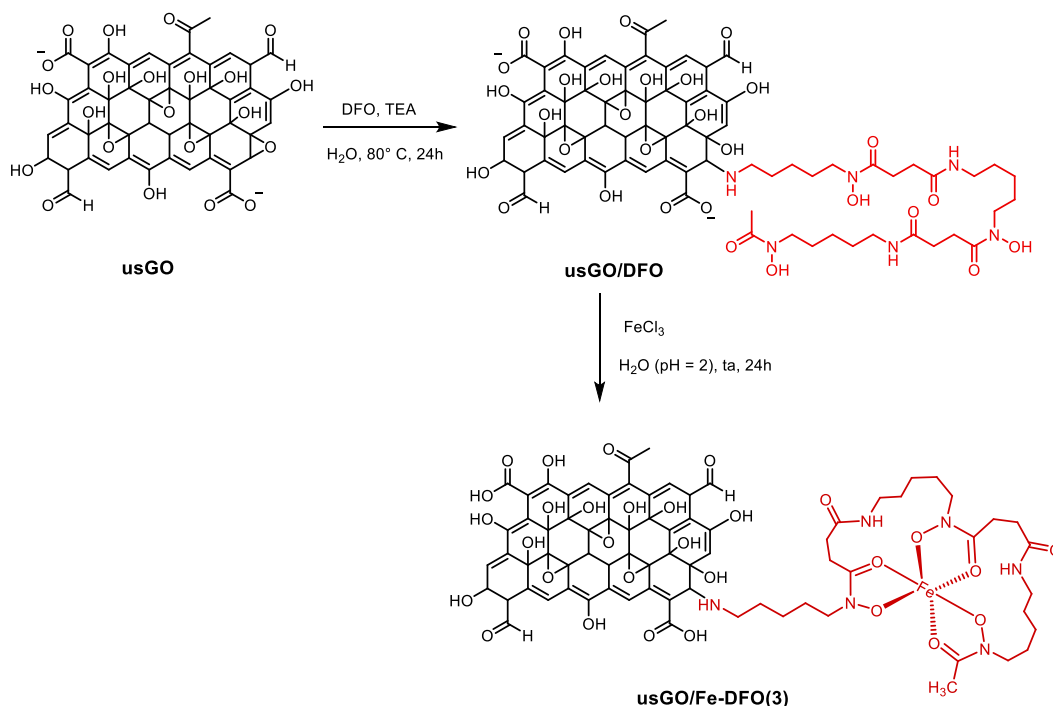


Figura 16. Representación esquemática de la síntesis de **usGO/Fe-DFO** mediante las estrategias 2-3.

Con el objetivo de evaluar los procesos de funcionalización y conocer su composición química, una vez sintetizados y aislados los distintos derivados de GO **usGO** se caracterizaron a través de TGA, espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*, XPS) Y FT-IR.

El TGA se utilizó para realizar un estudio cualitativo sobre la cantidad de Fe presente en **usGO/Fe**, **usGO/DFO** y **usGO/Fe-DFO(2-3)**. Los derivados de GO

presentan una baja termoestabilidad bajo atmósfera de aire. Esto nos permite cuantificar la cantidad de material no combustible presente en el material correspondiente y así establecer una relación con la cantidad de Fe. Al calentar los derivados de GO en un rango de temperaturas de 100-800 °C bajo aire artificial, se obtuvieron los perfiles de TGA mostrados en la Figura 17. Como cabría esperar, únicamente los derivados de GO tratados con Fe^{3+} **usGO/Fe** y **usGO/Fe-DFO(2-3)** mostraron un residuo termoestable pasados los 450-500 °C hasta 800 °C (Tabla 1). En particular, el **usGO/Fe-DFO(2)** y **usGO/Fe** muestran la mayor cantidad de residuo (5.0 y 4.9 %, respectivamente). Sin embargo, **usGO/Fe-DFO(3)** presenta un bajo contenido. Este resultado sugiere que la última etapa de complejación en la estrategia 3 no ha sido efectiva. Cabe destacar que no se puede establecer una relación directa entre el residuo obtenido y la cantidad de Fe, ya que puede haber otras especies no degradables presentes en las muestras (por ejemplo, otros residuos metálicos, sales, etc.).

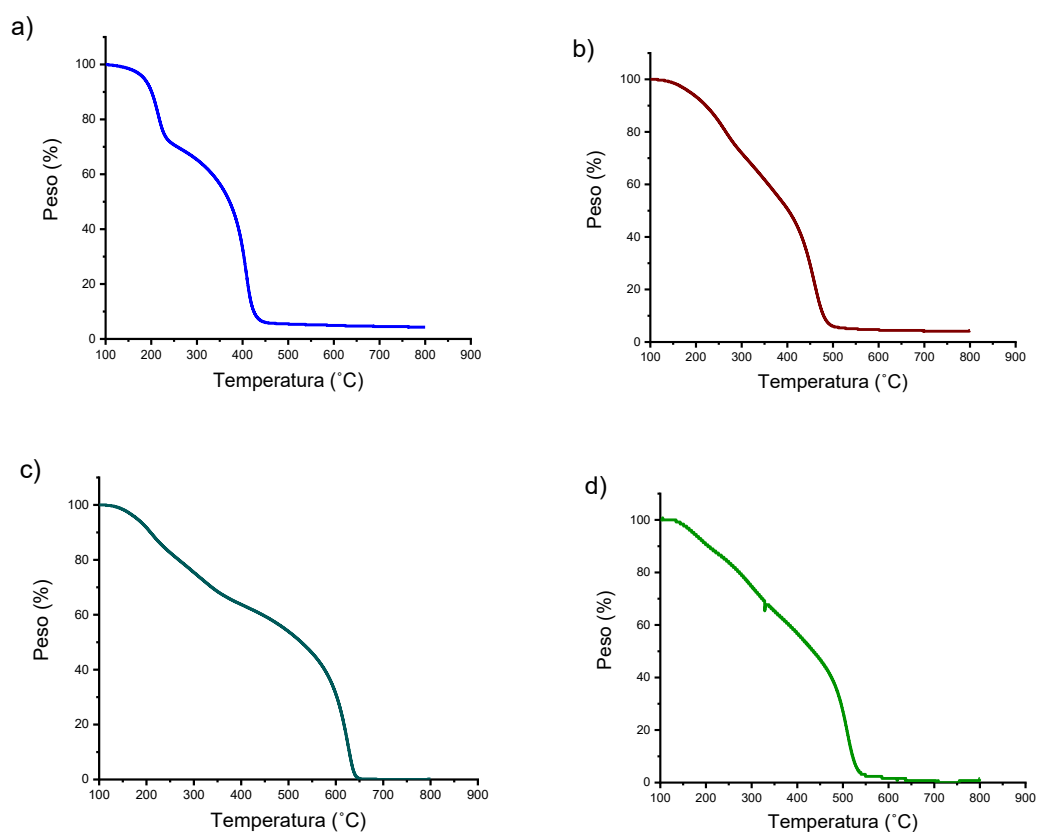


Figura 17. Curvas TGA para la descomposición térmica de a) **usGO/Fe**, b) **usGO/Fe-DFO(2)**, c) **usGO/DFO** y d) **usGO/Fe-DFO(3)**.

Tabla 1. Porcentaje del peso residual para los derivados de usGO funcionalizados.

Derivado de GO	% Peso residual (%)
usGO/Fe	4.9%
usGO/Fe-DFO(2)	5.0 %
DFO-usGO	0.0 %
usGO/Fe-DFO(3)	0.5 %

La ICP-MS se utilizó para dilucidar la presencia efectiva y la cantidad de Fe debido a su baja sensibilidad. Tras la digestión de las muestras **usGO/Fe**, **usGO/DFO** y **usGO/Fe-DFO(2-3)**, se obtuvieron los resultados que se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentración de hierro presente en los derivados de GO.

Derivado GO	Concentración de Fe ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
usGO/Fe	24.23
usGO/DFO	1.29
usGO/Fe-DFO(2)	23.73
usGO/Fe-DFO(3)	9.64

En línea con los resultados obtenidos mediante TGA bajo atmósfera de aire, los nanomateriales **usGO/Fe** y **usGO/Fe-DFO(2)** presentaron la mayor concentración de Fe (24.23 y 23.73 μg por mg de muestra). A través de esta técnica, se confirma la baja concentración de Fe en **usGO/Fe-DFO(3)**. De esta forma podemos concluir que la estrategia 3 es inadecuada para obtener el nanomaterial **usGO/Fe-DFO**.

Una vez confirmada la presencia de Fe, se estudió el estado de oxidación de Fe presente en los derivados de GO **usGO/Fe** y **usGO/Fe-DFO(2)** mediante XPS de alta resolución. La XPS es una técnica espectroscópica cuantitativa utilizada para realizar análisis elementales. Mediante la irradiación con rayos X, se emiten fotoelectrones desde la superficie de la muestra. Al detectar simultáneamente la energía cinética y el número

de electrones emitidos, se obtiene información sobre la composición elemental y el estado químico. De hecho, la energía de enlace depende en gran medida del elemento y del estado químico, mientras que la intensidad de los picos proporciona un análisis elemental cuantitativo. En el estudio de la modificación de nanoestructuras de carbono, la XPS se utilizó para confirmar la funcionalización de la superficie, concretamente con especies de Fe.

Se realizó análisis XPS de **usGO/Fe** y **usGO/Fe-DFO(2)** al ser los materiales con mayor cantidad de Fe (Figura 18). También se analiza el **usGO** con el fin de identificar los grupos pertenecientes a la estructura de GO. Para las tres muestras se detecta mayoritariamente la presencia de C y O como C1s y O1s. A continuación, se llevó a cabo un análisis XPS de alta resolución de los picos de interés C1s, O1s y Fe2p. Mediante la integración de estos picos, se pudo obtener una composición atómica para cada uno de los materiales (Tabla 3).

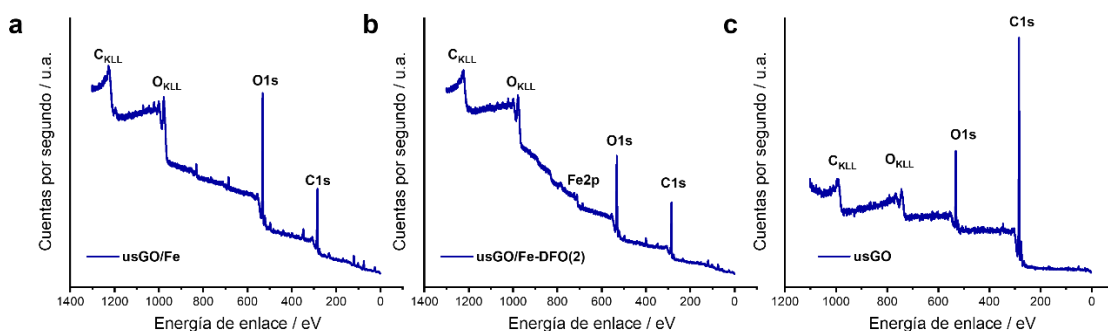


Figura 18. Espectros XPS de a) **usGO/Fe**, b) **usGO/Fe-DFO(2)** y c) **usGO**.

Tabla 3. Porcentaje atómico para **usGO/Fe**, **usGO/Fe-DFO(2)** y **usGO** obtenido a partir del análisis de XPS de alta resolución.

Derivado GO	C / % atómico	O / % atómico	Fe / % atómico
usGO/Fe	62.8	37.2	Trazas
usGO/DFO-Fe(2)	64.4	34.7	0.9
usGO	86.8	13.2	-

Para **usGO/Fe-DFO(2)** se registró la presencia de Fe en un bajo porcentaje atómico (0.9 %). El **usGO/Fe** presentó también un pico Fe2p, pero su baja intensidad no permite

una integración precisa; por tanto, consideramos únicamente la presencia de trazas de este elemento.

Con el objetivo de identificar los distintos estados químicos del Fe, se deconvolucionó el Fe2p para **usGO/Fe-DFO(2)** (Figura 19). Dicha deconvolución se ajustó con la presencia de dos especies distintas Fe que denominamos A y B (Fe2p3/2 (A) = 710.3 eV; Fe2p3/2 (B) = 711.9). La presencia de estas dos especies A y B se podría deber a dos causas:

1. La presencia de Fe^{2+} y Fe^{3+} .³² Sin embargo, se conoce que el DFO estabiliza selectivamente al Fe^{3+} . Además, en ningún momento se ha tratado el nanomaterial con agentes reductores. Por lo tanto, se descarta esta interpretación.
2. Dos tipos de complejación distinta para Fe^{3+} . Conociendo la capacidad del **usGO** de complejar el Fe^{3+} , como se ha visto a través de la muestra **usGO/Fe**; y la utilización de DFO-Fe, es posible la presencia de dos estados de coordinación para el Fe^{3+} en el nanomaterial **usGO/Fe-DFO(2)**. Es decir, en uno de ellos el Fe estaría unido al DFO y en otro a los grupos coordinantes del **usGO**.

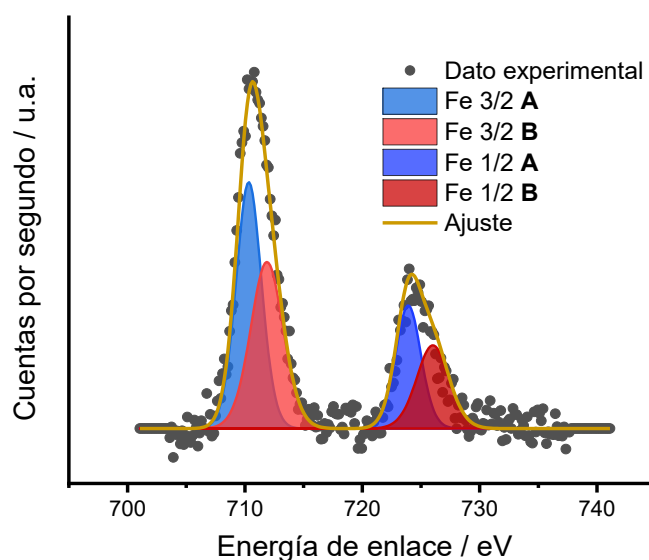


Figura 19. Espectro XPS de alta resolución de Fe2p para **usGO/Fe-DFO(2)**.

A través de la deconvolución de O1s en alta resolución, se estudió la complejación del Fe^{3+} en **usGO/Fe** y **usGO/Fe-DFO(2)** (Figura 20). En particular, la presencia del pico O-Fe (530.8 eV) para **us/GOFe** (Figura 20b) nos sugiere que el Fe^{3+} se coordina a través

de los grupos funcionales oxigenados presentes en la estructura del GO.³³ Esto refuerza la segunda hipótesis planteada anteriormente.

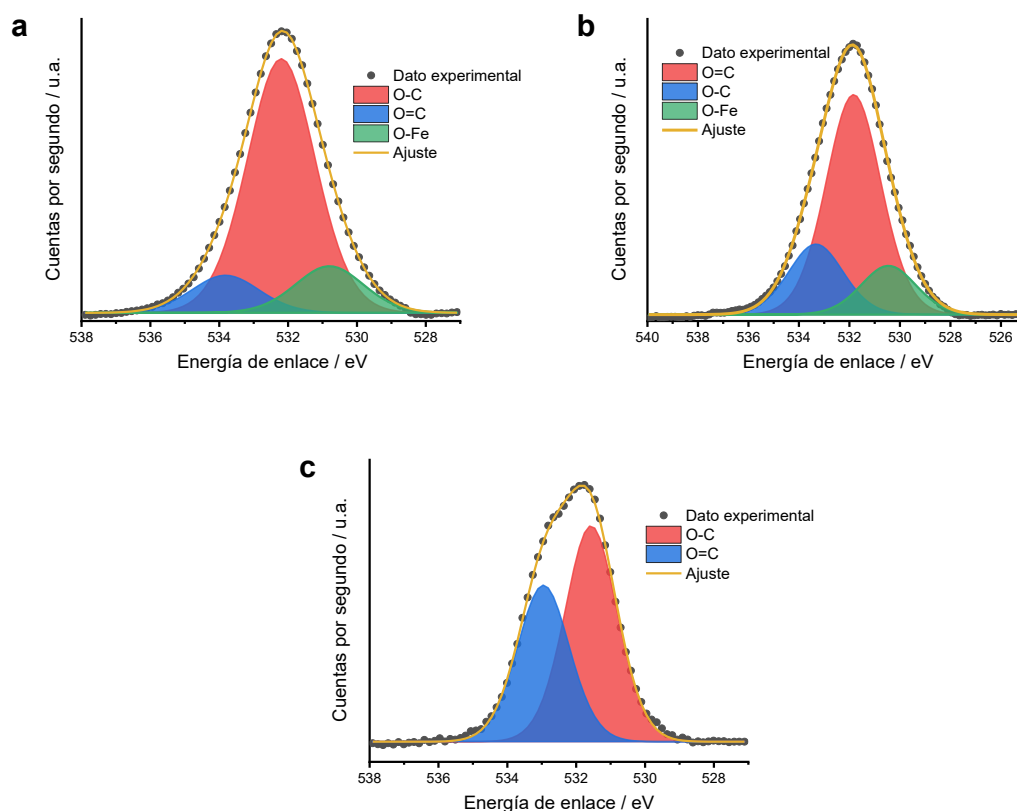


Figura 20. Espectros XPS de alta resolución de O1s para a) **usGO**, b) **usGO/Fe** y c) **usGO/Fe-DFO**.

La espectroscopía FT-IR se utilizó para caracterizar **usGO/DFO** y **usGO/Fe-DFO(2-3)** ya que el DFO presenta grupos funcionales detectables mediante esta técnica. Los tres materiales presentaron los picos C-H y C-N a $\sim 2980\text{ cm}^{-1}$ y 1380 cm^{-1} , respectivamente. Estas señales, ausentes en el **usGO** de partida (Figura 21), confirman la presencia de DFO en **usGO/DFO** y de DFO-Fe en **usGO/Fe-DFO(2-3)**. Además, los tres nanomateriales presentan los picos C-O ($\sim 1130\text{ cm}^{-1}$), C=O ($\sim 1660\text{ cm}^{-1}$) y O-H ($\sim 3300\text{ cm}^{-1}$), como cabría esperar para un derivado de GO.²

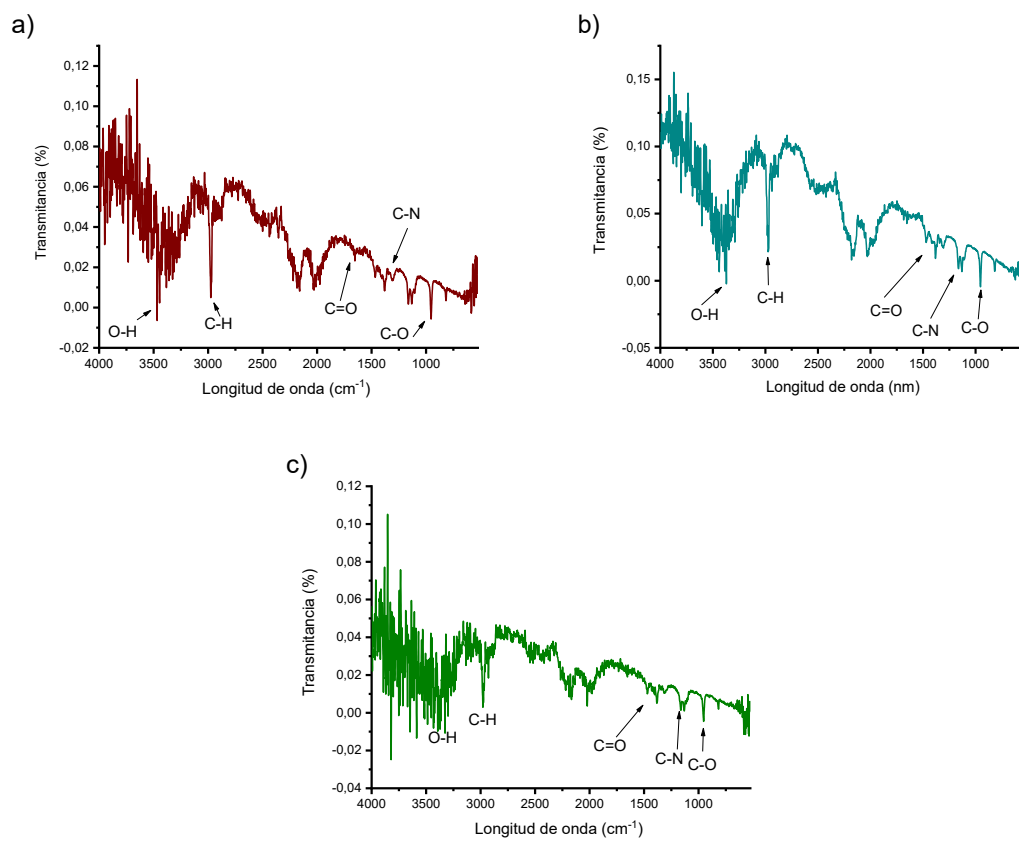


Figura 21. Espectro TF-IR para de las especies de usGO funcionalizado, a) usGO/Fe-DFO(2), b) usGO/DFO, c) usGO/Fe-DFO(3).

4. Parte Experimental

4.1. Reactivos y disolventes

Se usaron los siguientes reactivos y disolventes: para preparación de muestras y disolución de reactivos y solvente puros, se utilizó agua Milli-Q (agua ultrapura “Tipo 1”, con resistividad $0,05\mu\text{S cm}^{-1}$ a $25,5\text{ }^\circ\text{C}$); la sal de $\text{FeCl}_3 \cdot 5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ de (PANREAC); el HCl 35% de (ALDO); el DFO (deferroxamina, ACROS ORGANICS); la trietilamina (TEA) al 99.5 % de *labkem*

Para la obtención de **usGO** se partió de una dispersión acuosa de **IGO** antes preparada a partir de la oxidación de grafito mediante el método de Hummers por el grupo Carbon bionanotechnology del CIC biomaGUNE.²

El DFO-Fe se preparó en el grupo IMMO del CICA en la Universidade da Coruña, mediante a través de una complejación con Fe^{3+} .³⁴

Para la diálisis de **usGO** funcionalizados se utilizó *Spectra/Por*[®] *Dialysis Membrane Standar RC Tubinc* (MWCO: 3.5 kDa). Para la purificación de **usGO/DFO** se usaron filtros de membrana ($0.45\ \mu\text{m}$, 47 mm en diámetro).

4.2. Instrumentación

Para determinar la concentración por diferencia de masas de las dispersiones de GO (**usGO** y **IGO**) y para el secado de **usGO** funcionalizado con especies de Fe^{3+} , se congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron durante 48 horas en el Liofilizador - Telstar - Cryodos-80.

Para la preparación de **usGO** se utilizó la Centrifuga de Eppendorf de sobremesa Mini Spin. Para la purificación de **usGO/Fe-DFO(2)** obtenicon por la segunda estrategia se utilizó la centrifuga Baths Ultrasonic FB15050, 80 W, Fisherbrand.

Las imágenes de TEM se consiguieron con el equipo JEOL JEM-1010, del SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña). Presenta un cañón de electrones termoiónico con filamento de tungsteno operado a un voltaje de aceleración

de 100 kV. Proporciona imágenes de transmisión convencionales, de campo oscuro y campo claro, 12 con una resolución entre puntos de 0,35 nm, captadas con una cámara Megaview II. Las imágenes fueron tratadas con el programa ImageJ.

Las medidas de AFM fueron realizadas en el equipo JPK NanoWizard II operado en modo de contacto intermitente. Se usó una sonda de silicio grabada por contacto (TESPA-V2), con un silicio dopado con antimonio de $0,01 - 0,025 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$. La sonda estaba equipada con un cantiléver rectangular ($3.8 \mu\text{m}$ de grosor, frecuencia de resonancia nominal de 320 kHz, constante de resorte de $42 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$, longitud de $123 \mu\text{m}$ y anchura de $40 \mu\text{m}$). Los datos se analizaron con el software WSxM 5.0 Develop 7.0, y las imágenes fueron tratadas con el programa *ImageJ*. Esto se obtuvo en colaboración del grupo *Carbon bionanotechnology* del CIC biomaGUNE

Los espectros de absorbancia para las dispersiones **usGO** y **IGO** se adquirieron con GENESYSTM UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific). Las muestras de dichas dispersiones se transfirieron a una cubeta de cuarzo de 1mL con una longitud de paso óptico de 1cm (Hellma Analytics). Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, usando agua Milli-Q como control de blanco abarcando el espectro en los rangos de los 200-800 nm.

Los espectros FT-IR se obtuvieron en el equipo de FT-IR – Thermo Scientific – Nicolet is10, colocando las muestras con cuidadosamente sobre el diamante del espectroscopio. Los espectros de transmitancia se registraron mediante la adquisición de 32 escaneos en el rango de los $800- 4000 \text{ cm}^{-1}$, con una resolución de 4 cm^{-1} . En el caso de las dispersiones de **usGO** y **IGO**, se depositó una gota de aproximadamente $20 \mu\text{L}$ y para **usGO** funcionalizado se depositaron muestras solidas (alrededor de 2 mg).

La medida de la movilidad electroforética (μ) de **usGO** y **IGO** se obtuvo mediante un analizador de medida de tamaños de partícula en el rango nanométrico con medida de potencial Z- *Brookhaven- NanoBrook Plus Zeta*. Se usaron cubetas plásticas de 3.5 mL de muestra y un paso óptico de 1 cm. Para ello, se emplearon configuraciones y análisis predeterminados por el equipo para todas las mediciones, donde el software instalado convirtió automáticamente el valor μ en valores de potencial zeta (ζ) en MV de acuerdo con la ecuación de Smoluchowski. Se efectuó cada medición por triplicado a temperatura ambiente (25°C) y los valores se reportaron como la media \pm su desviación estándar.

El TGA se llevó a cabo mediante el equipo Discovery (TA Instruments), con mediciones realizadas de 100°C a 800°C después de un tratamiento isotérmico de 20 min a 100°C con el objetivo de eliminar posibles trazas de agua, aplicando un gradiente de 10°C·min⁻¹. Para el caso de **usGO** y **IGO** se empleó una atmósfera de nitrógeno, mientras que para **usGO** funcionalizado con especies de Fe³⁺ realizaron en una atmósfera de aire. Estos análisis fueron realizados en colaboración con el grupo Carbon Biotechnology Group en el CIC biomaGUNE

El análisis ICP-MS de los diferentes compuestos de **usGO** funcionalizado con especies de Fe³⁺ se realizaron en colaboración con Carbon Biotechnology Group en el CIC biomaGUNE. Para ello, se utilizó un espectrómetro de masas de plasma acoplado inductivamente ICP-MS -Thermo Fisher iCap-Q, equipado con una célula de colisión/reacción de discriminación de energía cinética (KED) de gas He. La digestión previa de las muestras se realizó en un sistema de digestión por microondas Berghof Speedwave Xpert. Para dicha digestión se empleó una mezcla de 750 µL de HNO₃, y 250 µL de HCl, 50 µL de HF y 300 µL de H₃BO₃ (para neutralizar) aplicando el método descrito en la Tabla 4.

Tabla 4. Método para la digestión asistida por microondas de los derivados de GO.

Etapa	T (°C)	P (bar)	Tiempo de exposición (min.)	Descanso (min.)	Potencia (%)
1	150	40	10	5	50
2	210	25	10	30	0
3	50	40	10	2	0

Las medidas de XPS fueron hechas por los colaboradores del grupo Carbon bionanotechnology del CICbiomaGUNE, empleando un espectrómetro SPECS Sage HR 100 con una fuente de rayos X no monocromática de aluminio con una línea K α de 1486,6 eV de energía y 300 W. El ajuste de los datos se llevó a cabo con el software CasaXPS.

Los espectros Raman se registraron con un microscopio confocal Raman Renishaw Invia equipado con un láser rojo ($\lambda_{exc} = 633$ nm), y se representaron tras haber corregido la línea base mediante el software Wire 4.3. Las medidas fueron realizadas en colaboración con el grupo Carbon bionanotechnology del CIC biomaGUNE.

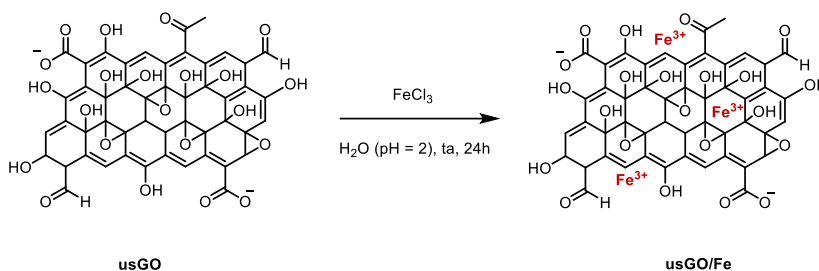
4.3. Preparación del usGO

Una suspensión de láminas de **IGO** ($2.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) en agua (85 mL) se sometió a un tratamiento de ultrasonidos empleando una sonda en un baño de agua. La temperatura de dicho baño se mantuvo en todo momento a 25°C . A continuación, la suspensión se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 h (Centrifuge MinisSpin, Eppendorf) para descartar las láminas de **IGO** que pudiesen quedar. Se separó el sobrenadante por decantación, obteniéndose el **usGO** como una disolución marrón (65 mL, 1.4 mg/mL).

4.4. Funcionalización del usGO

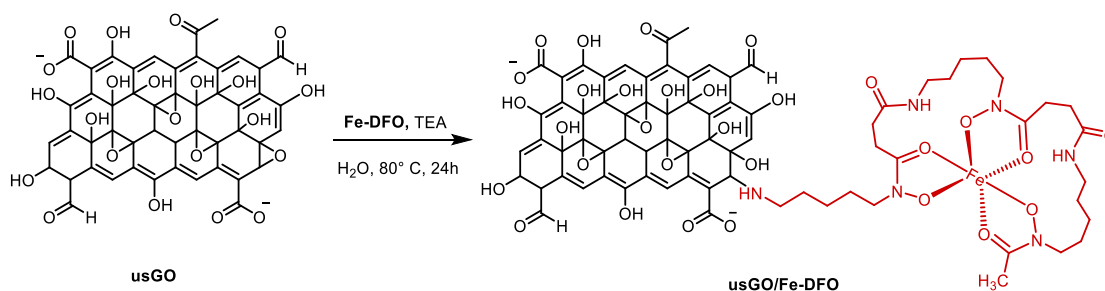
En esta sección se describen los procedimientos y parámetros de las distintas metodologías para la funcionalización de **usGO** con especies Fe^{3+} según los objetivos antes descritos.

4.4.1. Complejación de óxido del usGO con Fe^{3+} (usGO/Fe)



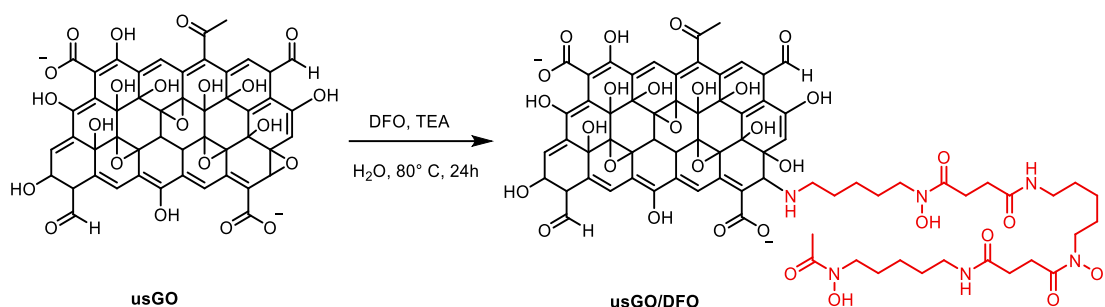
Sobre una disolución acuosa de FeCl_3 (135.1 mg, 0.5 mmol) en agua Milli Q (5 mL) a pH 2 se añadió una dispersión de **usGO** (1.4 mg/mL) en agua (5 mL) y se agitó durante 24 h a ta. La suspensión resultante se purificó mediante diálisis (peso molecular de corte 3.5 kDa) durante 5 días manteniendo un pH 2. A continuación, la suspensión se neutralizó a través de lavados con agua mediante centrifugación (10,000 rpm, 15 min) hasta alcanzar pH neutro. El sólido obtenido se redispersó en agua y se liofilizó obteniendo un sólido marrón (6.4 mg) el cual se almacenó a 4°C para su posterior uso.

4.4.2. Funcionalización de usGO con Fe-DFO (usGO/Fe-DFO)



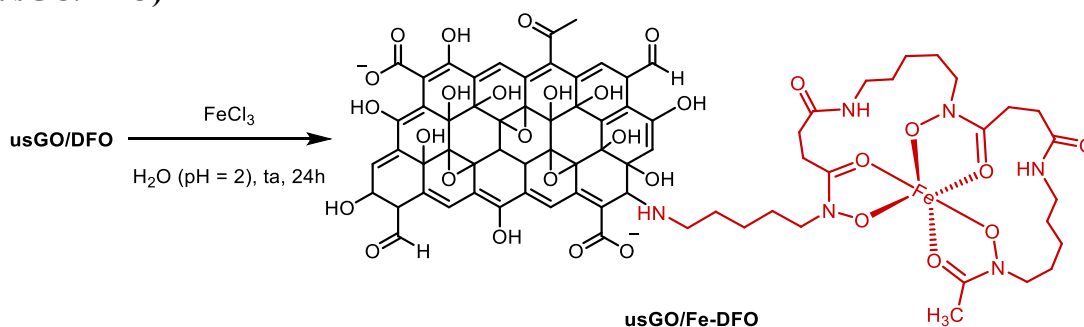
Sobre una disolución de TEA (70 μL , 0.5 mmol) en agua (210 μL) se añadió el complejo de Fe (III) de la deferoxinamina B sideróforo (**Fe-DFO**, 306.6 mg, 0.5 mmol). A continuación, se añadió una suspensión de **usGO** (1.4 mg/mL) en agua (10 mL) y se calentó a 80°C durante 24 h. La dispersión obtenida se dializó (peso molecular de corte 3.5 kDa) en agua durante tres días. La suspensión resultante se liofilizó obteniendo un sólido negro (15.2 mg) el cual se almacenó a 4°C para su posterior uso.

4.4.3. Funcionalización del usGO con DFO (usGO/DFO)



Sobre una disolución de Deferoxinamina B (DFO) (95 %, 328.5 mg, 0.5mmol) en agua (3 mL) se añadió TEA (100 μL , 0.07 mmol) y una suspensión acuosa de **usGO** (10 mL, 1.4 mg/mL). La mezcla resultante se calentó a 80°C durante 24 h con agitación. Posteriormente, la mezcla de reacción se purificó mediante filtración (0.45 μm , 47 mm en diámetro) y se lavó con agua Milli-Q (3 x 10 mL), La dispersión resultante se liofilizó obteniendo un sólido negro (10.8 mg) que se almaceno a 4°C hasta su uso.

4.4.4. Complejación del Fe^{3+} con el usGO modificado químicamente con DFO (usGO/DFO)



Sobre una disolución de FeCl_3 (135.1 mg, 0.5 mmol) en HCl (5mL, 0.01M, pH 2) se añadió una suspensión acuosa de **DFO-usGO** (4.6 mg, 250 mL) a pH 2. Ésta se agitó a ta durante 24 h. La dispersión obtenida se dializó (peso molecular de corte 3.5 kDa) en agua Milli-Q durante tres días. Para neutralizar **usGO/Fe-DFO** se aplicó ultrasonido para homogenizar la dispersión, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 min, se retiró el sobrenadante y se añadió agua Milli Q, se repitió el procedimiento cinco veces hasta que la dispersión estuviera a pH neutro. Se liofilizó durante 48 h obteniéndose un sólido negro (4.3 mg) que luego se almaceno a 4°C para su posterior caracterización.

5. Conclusión

El objetivo principal de este trabajo de fin de máster fue la obtención de una nueva generación de agentes de contraste T1 para IRM a través de la combinación de **usGO** y Fe^{3+} como especie activa. Teniendo en cuenta los objetivos propuestos y los resultados obtenidos en el desarrollo, se pueden enumerar las siguientes conclusiones:

- Se ha sintetizado **usGO** por un método de fragmentación (asistido por ultrasonido) a partir de **IGO** previamente preparado por una variación del método de Hummers.
- Ambos nanomateriales, **usGO** y **IGO** han sido exhaustivamente caracterizados por las técnicas de TEM, AFM, espectroscopias UV-vis, FT-IR, Raman, TGA y potencial Z. Estos estudios permitieron comprobar que el **usGO** cumplía con las características requeridas para su aplicación en el diseño de agentes de contraste.
- Se ha llevado a cabo la funcionalización del **usGO** con especies de Fe^{3+} mediante tres estrategias que dieron lugar a los nanomateriales **usGO/Fe**, **usGO/Fe-DFO(2)** y **usGO/Fe-DFO(3)**.
- Los anteriores nanomateriales fueron caracterizados por las técnicas de TGA, ICP-MS, XPS y espectroscopia FT-IR. Estos estudios mostraron que **usGO/Fe** y **usGO/Fe-DFO(2)** presenta una complejación del Fe^{3+} mucho más efectiva que **usGO/Fe-DFO(3)**.

En resumen, los estudios realizados en este TFM han permitido obtener dos nanomateriales, **usGO/Fe** y **usGO/Fe-DFO(2)**, que presentan unas propiedades muy prometedoras para su uso en IRM. A continuación, el grupo NanoSelf llevará a cabo con estos derivados de GO estudios de relajatividad para determinar su eficiencia como agente de contraste T1.

Conclusión

O obxectivo principal deste traballo de fin de máster foi a obtención dunha nova xeración de axentes de contraste T1 para a resonancia magnética mediante a combinación de **usGO** e Fe^{3+} como especies activas. Tendo en conta os obxectivos propostos e os resultados obtidos no desenvolvemento, pódense enumerar as seguintes conclusións:

- **usGO** foi sintetizado por un método de fragmentación (asistido por ultrasóns) a partir de **IGO** previamente preparado mediante unha variación do método Hummers.
- Ambos nanomateriais, **usGO** e **IGO** foron caracterizados exhaustivamente mediante técnicas de TEM, AFM, espectroscopía de UV-vis, FT-IR, Raman, TGA e potencial Z. Estes estudos permitiron comprobar que **usGO** cumpría coas características requiridas para a súa aplicación. deseño de axentes de contraste.
- A funcionalización de **usGO** con especies Fe^{3+} realizouse mediante tres estratexias que orixinaron os nanomateriais **usGO/Fe**, **usGO/Fe-DFO(2)** e **usGO/Fe-DFO(3)**.
- Os nanomateriais anteriores caracterizáronse mediante técnicas TGA, ICP-MS, XPS e espectroscopía FT-IR. Estes estudos demostraron que **usGO/Fe** e **usGO/Fe-DFO(2)** presentan unha complexación de Fe^{3+} moito máis eficaz que **usGO/Fe-DFO(3)**.

En resumo, os estudos realizados neste TFM permitiron obter dous nanomateriais, **usGO/Fe** e **usGO/Fe-DFO(2)**, que teñen unhas propiedades moi prometedoras para o seu uso en IRM. A continuación, o grupo NanoSelf realizará estudos de relaxividade con estes derivados GO para determinar a súa eficacia como axente de contraste T1.

Conclusion

The main objective of this master's thesis was to obtain a new generation of T1 contrast agents for MRI through the combination of usGO and Fe³⁺ as active species. Taking into account the proposed objectives and the results obtained in the development, the following conclusions can be listed:

- **UsGO** has been synthesized by a fragmentation method (ultrasound-assisted) from **IGO** previously prepared by a variation of Hummers' method.
- Both **usGO** and **IGO** nanomaterials have been exhaustively characterized by TEM, AFM, UV-vis, FT-IR, Raman spectroscopies, TGA and Z-potential. These studies allowed us to verify that **usGO** fulfilled the characteristics required for its application in the design of contrast agents.
- Functionalization of **usGO** with Fe³⁺ species has been carried out using three strategies that gave rise to **usGO/Fe**, **usGO/Fe-DFO(2)** and **usGO/Fe-DFO(3)** nanomaterials.
- The above nanomaterials were characterized by TGA, ICP-MS, XPS and FT-IR spectroscopy techniques. These studies showed that **usGO/Fe** and **usGO/Fe/Fe-DFO(2)** presents much more effective Fe³⁺ complexation than **usGO/Fe-DFO(3)**.

In summary, the studies carried out in this TFM have allowed us to obtain two nanomaterials, **usGO/Fe** and **usGO/Fe-DFO(2)**, which present very promising properties for their use in MRI. Next, the NanoSelf group will carry out relaxivity studies with these GO derivatives to determine their efficiency as a T1 contrast agent.

6. Bibliografía

- (1) Eigler, S.; Hirsch, A. Chemistry with Graphene and Graphene Oxide - Challenges for Synthetic Chemists. *Angewandte Chemie - International Edition*. Wiley-VCH Verlag July 21, 2014, pp 7720–7738. <https://doi.org/10.1002/anie.201402780>.
- (2) Rodrigues, A. F.; Newman, L.; Lozano, N.; Mukherjee, S. P.; Fadeel, B.; Bussy, C.; Kostarelos, K. A Blueprint for the Synthesis and Characterisation of Thin Graphene Oxide with Controlled Lateral Dimensions for Biomedicine. *2d Mater* **2018**, 5 (3). <https://doi.org/10.1088/2053-1583/aac05c>.
- (3) *Propiedades del Grafeno – Graphenea*. <https://www.graphenea.com/pages/graphene-properties#.Yw8wFXZIC01> (accessed 2022-08-31).
- (4) Reina, G.; González-Domínguez, J. M.; Criado, A.; Vázquez, E.; Bianco, A.; Prato, M. Promises, Facts and Challenges for Graphene in Biomedical Applications. *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry August 7, 2017, pp 4400–4416. <https://doi.org/10.1039/c7cs00363c>.
- (5) Dimiev, A. M.; Eigler, S. *Graphene Oxide Fundamentals and Applications Edited By*; 2017.
- (6) Eigler, S.; Hirsch, A. Chemistry with Graphene and Graphene Oxide - Challenges for Synthetic Chemists. *Angewandte Chemie - International Edition* **2014**, 53 (30), 7720–7738. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201402780>.
- (7) De, C.; Mecánica, I. Síntesis y Caracterización de Óxido de Grafeno y Óxido de Grafeno Reducido. **2020**.
- (8) Compton, O. C.; Nguyen, S. T. Graphene Oxide, Highly Reduced Graphene Oxide, and Graphene: Versatile Building Blocks for Carbon-Based Materials. *Small* **2010**, 6 (6), 711–723. <https://doi.org/10.1002/SMLL.200901934>.
- (9) Scienze, S. di; Wetzl RELATORE Chiarma Profssa Stefania Rapino CORRELATORE Giovanni Valenti Alejandro Criado Fernández, C. *Graphene-Based Functional Materials for Electrochemical Cell Imaging Chimica Classe LM-54 – Scienze Chimiche CANDIDATO*; 2019.
- (10) Nasrollahzadeh, M.; Sajjadi, M.; Sajadi, S. M. Functionalized-Graphene and Graphene Oxide: Fabrication and Application in Catalysis. *Photoenergy and Thin Film Materials* **2019**, 661–727. <https://doi.org/10.1002/9781119580546.CH16>.
- (11) Zhang, L.; Xia, J.; Zhao, Q.; Liu, L.; Zhang, Z. Functional Graphene Oxide as a Nanocarrier for Controlled Loading and Targeted Delivery of Mixed Anticancer Drugs. *Small* **2010**, 6 (4), 537–544. <https://doi.org/10.1002/SMLL.200901680>.
- (12) Georgakilas, V.; Tiwari, J. N.; Kemp, K. C.; Perman, J. A.; Bourlinos, A. B.; Kim, K. S.; Zboril, R. Noncovalent Functionalization of Graphene and Graphene Oxide for Energy Materials, Biosensing, Catalytic, and Biomedical Applications.

- Chem Rev* **2016**, *116* (9), 5464–5519.
https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.5B00620/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR-2015-00620Y_0047.GIF.
- (13) Shen, H.; Zhang, L.; Liu, M.; Zhang, Z. Biomedical Applications of Graphene. *Theranostics* **2012**, *2* (3), 283. <https://doi.org/10.7150/THNO.3642>.
- (14) Martín, C.; Kostarelos, K.; Prato, M.; Bianco, A. Biocompatibility and Biodegradability of 2D Materials: Graphene and Beyond. *Chemical Communications* **2019**, *55* (39), 5540–5546.
<https://doi.org/10.1039/C9CC01205B>.
- (15) Chng, E. L. K.; Pumera, M. Toxicity of Graphene Related Materials and Transition Metal Dichalcogenides. *RSC Adv* **2014**, *5* (4), 3074–3080.
<https://doi.org/10.1039/C4RA12624F>.
- (16) Bianco, A. Graphene: Safe or Toxic? The Two Faces of the Medal. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (19), 4986–4997.
<https://doi.org/10.1002/ANIE.201209099>.
- (17) Guo, Z.; Chakraborty, S.; Monikh, A.; Varsou, D.-D.; Chetwynd, A. J.; Afantitis, A.; Lynch, I.; Zhang, P.; Guo, Z.; Chetwynd, A. J.; Lynch, I.; Zhang, P.; Chakraborty, S.; Monikh, F. A.; Varsou, D.-D.; Afantitis, A. Surface Functionalization of Graphene-Based Materials: Biological Behavior, Toxicology, and Safe-By-Design Aspects. *Adv Biol* **2021**, *5* (9), 2100637.
<https://doi.org/10.1002/ADBI.202100637>.
- (18) Nanda, S. S.; Papaefthymiou, G. C.; Yi, D. K. Functionalization of Graphene Oxide and Its Biomedical Applications.
<https://doi.org/10.1080/10408436.2014.1002604> **2015**, *40* (5), 291–315.
<https://doi.org/10.1080/10408436.2014.1002604>.
- (19) Liu, J.; Cui, L.; Losic, D. Graphene and Graphene Oxide as New Nanocarriers for Drug Delivery Applications. *Acta Biomater* **2013**, *9* (12), 9243–9257.
<https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2013.08.016>.
- (20) Chung, C.; Kim, Y. K.; Shin, D.; Ryoo, S. R.; Hong, B. H.; Min, D. H. Biomedical Applications of Graphene and Graphene Oxide. *Acc Chem Res* **2013**, *46* (10), 2211–2224.
https://doi.org/10.1021/AR300159F/ASSET/IMAGES/LARGE/AR-2012-00159F_0016.JPEG.
- (21) Ma, X.; Tao, H.; Yang, K.; Feng, L.; Cheng, L.; Shi, X.; Li, Y.; Guo, L.; Liu, Z. A Functionalized Graphene Oxide-Iron Oxide Nanocomposite for Magnetically Targeted Drug Delivery, Photothermal Therapy, and Magnetic Resonance Imaging. *Nano Res* **2012** (3), 199–212. <https://doi.org/10.1007/s12274-012-0200-y>.
- (22) *Imagen por Resonancia Magnética (IRM)*.
<https://www.nibib.nih.gov/espanol/temas-cientificos/imagen-por-resonancia-magn%C3%A9tica-irm> (accessed 2022-09-03).

- (23) Lafuente Martínez, J.; Luis, Y.; Moreno, H. GENERALIDADES Y CONCEPTOS BÁSICOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA (RM) TÉCNICA DE LA IMAGEN POR RESONANCIA MAGNÉTICA.
- (24) Burtea, C.; Laurent, S.; vander Elst, L.; Muller, R. N. Contrast Agents: Magnetic Resonance. *Handb Exp Pharmacol* **2008**, *185* (PART1), 135–165. https://doi.org/10.1007/978-3-540-72718-7_7.
- (25) Xiao, Y. D.; Paudel, R.; Liu, J.; Ma, C.; Zhang, Z. S.; Zhou, S. K. MRI Contrast Agents: Classification and Application (Review). *Int J Mol Med* **2016**, *38* (5), 1319–1326. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2016.2744>.
- (26) Zeng, L.; Wu, D.; Zou, R.; Chen, T.; Zhang, J.; Wu, A. Paramagnetic and Superparamagnetic Inorganic Nanoparticles for T1-Weighted Magnetic Resonance Imaging. *Curr Med Chem* **2017**, *25* (25), 2970–2986. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170314124616>.
- (27) Cisneros Sureda, J. Síntesis de Los Sideróforos Amonabactinas, Análogos, y Conjugados Con Nanopartículas, Fluoróforos y Antibióticos. Evaluación Como Antimicrobianos y En La Detección de Patógenos. **2022**.
- (28) Bellotti, D.; Remelli, M. Deferoxamine B: A Natural, Excellent and Versatile Metal Chelator. *Molecules* *2021*, *Vol. 26*, Page 3255 **2021**, *26* (11), 3255. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26113255>.
- (29) Ferrari, A. C. Raman Spectroscopy of Graphene and Graphite: Disorder, Electron–Phonon Coupling, Doping and Nonadiabatic Effects. *Solid State Commun* **2007**, *143* (1–2), 47–57. <https://doi.org/10.1016/J.SSC.2007.03.052>.
- (30) Amirov, R. R.; Shayimova, J.; Nasirova, Z.; Dimiev, A. M. Chemistry of Graphene Oxide. Reactions with Transition Metal Cations. *Carbon N Y* **2017**, *116*, 356–365. <https://doi.org/10.1016/J.CARBON.2017.01.095>.
- (31) Kang, Y. G.; Chi Vu, H.; Chang, Y. Y.; Chang, Y. S. Fe(III) Adsorption on Graphene Oxide: A Low-Cost and Simple Modification Method for Persulfate Activation. *Chemical Engineering Journal* **2020**, *387*, 124012. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2020.124012>.
- (32) Wu, H.; Gao, G.; Zhou, X.; Zhang, Y.; Guo, S. Control on the Formation of Fe₃O₄ Nanoparticles on Chemically Reduced Graphene Oxide Surfaces †. <https://doi.org/10.1039/c1ce05724c>.
- (33) Hua, Y., Wang, S., Xiao, J., Cui, C., & Wang, C. Preparation and characterization of Fe₃O₄/gallic acid/graphene oxide magnetic nanocomposites as highly efficient Fenton catalysts *RSC Advances*, **2017**, *46*, 28979–28986. <https://doi.org/10.1039/c6ra23939k/div>
- (34) Martínez-Matamoros, D., Castro-García, S., Balado, M., Matamoros-Veloza, A., Camargo-Valero, M. A., Cespedes, O., Rodríguez, J., Lemos, M. L., & Jiménez, C. Preparation of functionalized magnetic nanoparticles conjugated with feroxamine and their evaluation for pathogen detection. *RSC Advances*, **2019**, *9*(24), 13533–13542. <https://doi.org/10.1039/c8ra10440>

