



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Físico Matemáticas

Síntesis y caracterización de materiales a base de Calcio con propiedades luminiscentes y su efecto toxicológico en *Daphnia magna*.

Tesis presentada al

Colegio de Física

como requisito parcial para la obtención del grado de

LICENCIADO EN FÍSICA APLICADA

por

Guadalupe Genoveva Méndez Ramos

Asesorado por

Dr. Salvador Carmona Téllez

Dra. Yessica Linares García

Puebla Pue.
Marzo de 2025



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Físico Matemáticas

Síntesis y caracterización de materiales a base de Calcio con
propiedades luminiscentes y su efecto toxicológico en
Daphnia magna.

Tesis presentada al

Colegio de Física

como requisito parcial para la obtención del grado de

LICENCIADO EN FÍSICA APLICADA

por

Guadalupe Genoveva Méndez Ramos

Asesorado por

Dr. Salvador Carmona Téllez

Dra. Yessica Linares García

Puebla Pue.
Marzo de 2025

Título: Síntesis y caracterización de materiales a base de Calcio con propiedades luminiscentes y su efecto toxicológico en *Daphnia magna*.

Estudiante: GUADALUPE GENOVEVA MÉNDEZ RAMOS

COMITÉ

Dr. Rosendo Lozada Morales
Presidente

Dra. Laura Morales Lara
Secretario

Dra. Angélica Gutiérrez Franco
Vocal

Dr. Vicente Vargas García
Suplente

Dr. Salvador Carmona Téllez
Asesor

Agradecimientos

Sin duda la culminación de este trabajo de investigación no habría sido posible sin el apoyo de mis padres, agradezco profundamente a Clara Ramos Teapila por su apoyo y cuidado incondicional, a Modesto Trinidad Méndez Solís por su confianza y resiliencia. Agradezco a mi hermana, María José, por su compañía y complicidad.

Agradezco a cada una de las amistades que forjé durante la licenciatura, Ana Sofía, Emanuel, Luis Fernando, Mytzi, Andrés y Manuel, por su gran compañía, por ser una red de apoyo cuando más lo necesité y por crear anécdotas inolvidables.

Agradezco a quienes me impulsaron a estudiar una licenciatura en la facultad de Ciencias Físico-Matemáticas, Francisco Javier, Víctor y Adriana.

A cada uno de mis profesores con quienes tomé clase durante la licenciatura, por su paciencia y dedicación, en especial con quien cursé el servicio social, Dr. Lucio Fidel, y con quien realicé mis prácticas profesionales, Dr. Benito Desirena.

Estoy agradecida con el cuerpo académico de Física de Materiales Avanzados, quienes me acogieron para la realización de este trabajo y me dieron infinidad de consejos y apoyo para la culminación del mismo. Agradezco a mis sinodales por sus observaciones y dedicación a este trabajo.

Finalmente quiero agradecerles a la Dra. Yessica Linares por sus aportaciones, retroalimentación, apoyo y guía para la realización de la presente tesis y al Dr. Salvador Carmona Telléz por su paciencia, apoyo y consejos.

A todos ustedes, muchas gracias.

Índice general

Resumen	XIII
Introducción	XV
Justificación	XVII
Objetivos	XIX
0.1. Objetivo general	XIX
0.2. Objetivos específicos	XIX
1. Fundamento teórico	1
1.1. Hidroxiapatita	1
1.2. Pirofosfato de Calcio	1
1.2.1. Tierras raras	3
1.3. Luminiscencia	5
1.3.1. Diagrama de Dieke	5
1.3.2. Reglas de selección	5
1.3.3. Up conversion	7
1.4. Técnicas de caracterización	8
1.4.1. Difracción de rayos X	8
1.4.2. SEM	10
1.4.3. Espectroscopia de excitación y de emisión	13
1.5. Ventanas biológicas	14
1.6. Bioensayos de toxicidad	14
1.6.1. D. magna	14
1.6.2. Pruebas agudas	16
1.6.3. Pruebas crónicas	16
2. Desarrollo experimental	17
2.1. Síntesis de nanopartícula de hidroxiapatita dopada con Eu por la técnica de hidro- termal.	19
2.2. Pruebas en el modelo eco toxicológico: D. magna	21
2.2.1. Pruebas agudas	21
2.2.2. Pruebas crónicas	21
3. Análisis de Resultados	23
3.1. Estructura de los materiales	23
3.1.1. RDX de pirofosfato de calcio	23
3.1.2. RDX de hidroxiapatita	23
3.1.3. SEM para pirofosfato de calcio	25
3.1.4. SEM para Hidroxiapatita	25

3.2. Luminiscencia	26
3.2.1. Luminiscencia en $Ca_2P_2O_7 : Er(III) - Yb(III)$	26
3.2.2. Luminiscencia de $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2 : Eu(III)$	28
3.3. Efecto tóxico de los compuestos micrométricos y nanométricos sobre <i>Daphnia magna</i>	30
3.4. Dinámica poblacional de <i>Daphnia magna</i> bajo exposición crónica a materiales a base de calcio.	30
Conclusión	34
3.5. Conclusiones generales	35
3.6. Trabajo a futuro	36
A. Publicaciones	37
B. Contribuciones a congresos	39
C. Glosario	41

Índice de figuras

1.1. Estructura molecular de Hidroxiapatita. Imagen recuperada de Hydroxyapatite Whisker, HA Whisker as reinforcement materials from EPRUI (epruibiotech.com).	2
1.2. Estructura molecular de Pirofosfato de Calcio. Imagen recuperada de Calcium pyrophosphate Ca ₂ P ₂ O ₇ CID 24632 - PubChem (nih.gov)	3
1.3. Posicionamiento de los electrones respecto a sus niveles de energía [54].	4
1.4. Diagrama de Dieke donde se representan los niveles de energía de iones libres calculados de tierras raras trivalentes. [68]	6
1.5. Visión general de los primeros niveles con sus posibles transiciones en la notación de Siegbahn.[73]	7
1.6. . Representación gráfica de la transferencia de energía por up-conversion	8
1.7. Espectro electromagnético y su longitud de onda.[73]	9
1.8. Derivación de Ley de Bragg.	10
1.9. Esquema de un monocromador que, mediante reflexión de Bragg, selecciona un espectro estrecho de longitudes de onda de rayos X o neutrones a partir de un haz incidente de amplio espectro. La parte superior de la figura muestra el análisis (obtenido por reflexión de un segundo cristal) de la pureza de un haz de neutrones de 1,16 Å de un monocromador de cristal de fluoruro de calcio.	11
1.10. Esquema del microscopio electrónico de barrido (SEM) en el que se muestran los diferentes componentes de este. LP: light pipe, F: fotomultiplicador, ORC: osciloscopio de rayos catódicos, GB: generador de barrido, BA: bobinas de amplificación.	12
1.11. Esquema para la medición de un espectro de fotoluminiscencia.	13
1.12. Fisiología D. magna[79]	15
1.13. Modelo de decisión reproductiva del organismo D. Magna [24].	16
2.1. Proceso de síntesis del piro fosfato de calcio por la técnica de evaporación de solventes.	18
2.2. Proceso de síntesis de Hidroxiapatita por la técnica de de Hidrotermal.	20

3.1. Patrón de difracción de rayos x para pirofosfato de Calcio sintetizado por evaporación de solventes.	24
3.2. Patrón de difracción de rayos x para Hidroxiapatita sintetizada por hidrotermal.	25
3.3. Imagen SEM de pirofosfato de Calcio.	26
3.4. Imagen SEM para Hidroxiapatita sintetizada por hidrotermal.	26
3.5. Propiedades luminiscentes de up-conversion bajo una onda excitación de 980nm del material: $Ca_2P_2O_7$ Er (III)/Yb (III).	27
3.6. Luminiscencia del material $Ca_2P_2O_7$:Er (III)-Yb (III)	27
3.7. Fotoluminiscencia de $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$: Eu (III) en el espectro de excitación y emisión	28
3.8. Luminiscencia de Hidroxiapatita dopada con Eu(III) como función del porcentaje de Europio..textbf	29
3.9. Supervivencia del Organismo D. Magna a lo largo del estudio agudo.	31
3.10. Distribución de las poblaciones de D. magna en tres grupos de edad tras 20 días de tratamiento (valor medio \pm desviación estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	32

Índice de tablas

1.1. Tabla de elementos lantánidos con sus radios iónicos y configuraciones electrónicas.	5
2.1. Regla de 3 para el cálculo del dopaje del 1% de Erblio	18
2.2. Regla de 3 para el cálculo del dopaje del 1% de Yterbio	18
2.3. Regla de 3 para el cálculo del dopaje del 1% de Europio	20
3.1. Tabla con parámetros evaluados en diferentes tratamientos.	33

Resumen

En el presente trabajo se reporta la síntesis y caracterización de materiales a base de calcio como fosfato de calcio e hidroxiapatita activados con Er (III)-Yb(III) y Eu(III) respectivamente. $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 : \text{Er (III)-Yb (III)}$ a 980 nm puede producir las características emisiones de conversión ascendente (UC) verde y roja, observadas a 520, 548 (en la región de emisión de luz verde) y 658 nm (en la región de emisión de luz roja), correspondientes a las transiciones de estado de energía interelectrónica de Er (III) de $^2H_{11/2}$, $^4S_{3/2}$, y $^4H_{9/2}$ y al estado fundamental $^4I_{15/2}$, respectivamente. Por otro lado, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2 : \text{Eu(III)}$ bajo una longitud de onda de excitación continua de 246 nm produce cuatro bandas de emisión ubicadas a 590, 516, 653 y 700 nm y que corresponden a las transiciones $^5D_0 \rightarrow ^7F_1, ^7F_2, ^7F_3$ y 7F_4 Eu (III) respectivamente. Los materiales a base de calcio eventualmente podrían ser adecuados para aplicaciones biológicas como la dosimetría o como marcadores celulares y tisulares. Sin embargo, es esencial realizar una evaluación de toxicidad exhaustiva, ya sea in vitro o in vivo, para garantizar que el material no represente un riesgo para la salud. En la propuesta de trabajo de tesis, se pretende un estudio de toxicidad con el modelo *Daphnia magna* utilizando concentraciones altas y bajas de compuestos a base de calcio en un estudio poblacional crónico.

Palabras clave: *Materiales a base de Calcio, D. magna, dopante, bioensayo .*

Introducción

La física de materiales investiga, sintetiza y caracteriza diversos materiales; todo ello con el fin de crear materiales con propiedades magnificadas como los superconductores, paramagnéticos, termo crómicos o fotoluminiscentes, la cual tiene múltiples aplicaciones.

La luz proviene de distintas fuentes, desde una lámpara, el sol o el fuego; no obstante, puede provenir de insectos como luciérnagas, peces, hongos, las auroras, entre otros. En esta clasificación se puede distinguir una diferencia, el primer grupo produce luz y calor, en tanto que los segundos solo generan luz. A este fenómeno de producir luz sin calor se le conoce como luminiscencia y es ocasionado por la des-excitación de un átomo o molécula por emisión de fotones [16].

Si bien es posible encontrar luminiscencia de manera natural, también es posible replicar dicho fenómeno de manera artificial por medio de materiales que produzcan luminiscencia y, dependiendo de donde provenga la energía necesaria para la generación de luz, es que el material adquirirá su nombre. Por ejemplo, la fotoluminiscencia contiene el prefijo foto, lo que indica que, la energía necesaria para producir este tipo de luminiscencia proviene de los fotones, es decir radiación electromagnética, que abarca desde los rayos gamma hasta las ondas de radio [70].

La presente investigación se enmarca en esta área de la física de materiales fotoluminiscentes. Su objetivo principal es elaborar un fosforo a base de Calcio que pudiera ser usado como biomarcador con excitación en el infrarrojo y emisión en el espectro visible. Una vez sintetizado el material se lleva a cabo un estudio toxicológico en el organismo D. magna a fin evaluar posibles efectos secundarios y comprender la propagación del material en el mismo.

Esta tesis se encuentra dividida en 5 capítulos donde se desglosan los diferentes aspectos de la investigación. En el Capítulo 1: Introducción, se plantearán los objetivos de la tesis, se dará la justificación del trabajo, un preámbulo y visión de este.

En el segundo Capítulo 2: Fundamento teórico, se estudiarán conceptos básicos del área de física de materiales como lo son la luminiscencia, técnicas de caracterización, descripción de las tierras raras y descripción del organismo D. Magna, el cual será el modelo eco-toxicológico usado, todo ello a fin de introducir los conceptos necesarios para el análisis de los resultados.

En el tercer capítulo, Capítulo 3: Desarrollo experimental, se desglosa con detalle los precursores e impurificantes de cada síntesis y se da descripción de esta, así como se describe el estudio toxicológico crónico que se realizó en D. magna.

En el cuarto apartado, Capítulo 4: Análisis de resultados, se explican los resultados de las caracterizaciones realizadas a cada material que se hicieron con microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en ingles) y difracción de rayos x (RDX), se analizan y comparan con la bibliografía y se da explicación a su comportamiento, y de manera análoga se realiza con los espectros de luminiscencia. Por otra parte, también se presentan las gráficas de dinámica

poblacional del organismo *D. magna* durante las distintas pruebas.

Finalmente, en el Capítulo 5: Conclusiones, se abarcan los alcances de la presente investigación, se analizan si los objetivos planteados se cumplieron y se dan observaciones finales, de igual forma se presenta una propuesta de trabajo a futuro. Se tienen como anexos un glosario con terminología usada en el área de biología, publicaciones y contribuciones a congresos.

Justificación

El cáncer es una de las principales causas de defunción alrededor del mundo por lo que en las últimas décadas se han desarrollado tratamientos como la radioterapia, quimioterapia, e intervenciones quirúrgicas para la extracción de tumores con el fin de tener una remisión. La probabilidad de que estos tratamientos sean exitosos tiene diferentes factores como la edad del paciente, los hábitos a lo largo de su vida, el tipo de cáncer y la etapa de detección [26]. Los métodos de diagnóstico han evolucionado gracias a la física médica; desde el ultrasonido hasta la tomografía por emisión de positrones (PET), los cuales son estudios confiables para la detección de tumores. A pesar de ello, no se pueden utilizar de manera periódica debido a que estos usan los rayos x o gamma, lo cual deposita una dosis de radiación al paciente y esto representa un riesgo para la creación de células cancerígenas.

El problema planteado tira en ambas direcciones; se necesita detectar el cáncer en etapas tempranas para reducir la mortalidad y a la par no se puede diagnosticar por que los estudios usados son un factor de riesgo para generar más células cancerígenas. Es en este punto donde se visualiza plantear un método de detección que sea reproducible a gran escala, económico en producción y, sobre todo, que no represente un riesgo para el paciente.

Los biomarcadores con excitación en el infrarrojo se postulan entonces como una alternativa atractiva para este problema. Algunas de las tierras raras que cumplen con esta característica son Er e Yb. Por tanto, en esta investigación se abordan dos fases cruciales; en primera estancia la realización de un fosfato con potencial de hacerse marcador y el estudio de su toxicidad crónica en el organismo *Daphnia magna*, cuyas características fisiológicas apremiaron la posibilidad de usar un dopaje de Eu, excitado en UV-B que emite en rojo en el espectro visible.

Objetivos

0.1. Objetivo general

Elaborar un fósforo a base de Calcio que pudiera ser usado como biomarcador con excitación en el infrarrojo y emisión en el espectro visible a fin de estudiar sus efectos secundarios y comprender la propagación del material en el organismo *D. magna*.

0.2. Objetivos específicos

- Obtener el porcentaje de dopante óptimo de Er (III) e Yb (III) para el fosfato de calcio para obtener la mayor luminiscencia del material.
- Obtener el porcentaje de dopante óptimo de Eu para las nanopartículas de hidroxiapatita.
- Caracterizar las partículas de fosfato de calcio y las nanopartículas de hidroxiapatita mediante RDX y SEM.
- Estudiar y analizar los efectos producidos en la población de *D. Magna* tras el consumo de micro y nanopartículas de hidroxiapatita y fosfato de Calcio.
- 5. Analizar la propagación de la hidroxiapatita dopado con Eu dentro del organismo *D. magna*.

Capítulo 1

Fundamento teórico

1.1. Hidroxiapatita

Las apatitas son un grupo de minerales encontrados en la naturaleza, su composición química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2\text{X}$ donde X puede ser sustituido por OH_2 , *Cl* o *F* y dependiendo de esto se le asigna su nombre, Hidroxiapatita, Clorapatita y Fluorapatita respectivamente [14].

La fluorapatita constituye parte importante del esmalte dental, la hidroxiapatita por su parte es la principal molécula que constituyen los huesos ocupando hasta un 98% de su composición. Debido a esto se consideró la hipótesis de ser un material biocompatible, y después de diversas investigaciones la Hidroxiapatita en efecto se ha desarrollado como un material apto para el ser humano.

float

Sus aplicaciones son diversas; ha sido de utilidad en cirugía como relleno óseo, recubrimiento para implantes metálicos para mejorar la fijación del implante al tejido óseo y en pastas dentales para reducir la sensibilidad y reabsorción de las encías [25].

Dependiendo del propósito para el cual sea usada puede obtenerse de forma natural o sintética; de manera natural se puede extraer de ovinos y porcinos. Para sintetizarla existen diversas maneras desde la técnica de coprecipitación, la evaporación, cristalización hidrotérmica hasta la técnica de sol-gel (Martínez-Valencia, 2008). Una de las técnicas más económicas y aplicable a nivel industrial es la de precipitación; para esta técnica el pH de la mezcla es uno de los factores decisivos en la cristalización de hidroxiapatita. Los pH básicos entre 10 y 11, así como la mezcla de los solventes gota a gota y el tiempo de reposo de la muestra antes de un tratamiento térmico son necesarios para no crear cualquier otro fosfato de calcio [15].

Entre otras características cabe destacar que no es soluble en agua, tiene un color blanquecino-amarillento, presenta estabilidad química, cuenta con una estructura molecular hexagonal mostrada en la figura 1.1 y densidad de 3.16g/cm³ [35].

1.2. Pirofosfato de Calcio

El fosfato de calcio con fórmula $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ es un compuesto de color blanquecino insoluble en agua con un peso molar de 254.10 g/mol y con una estructura molecular de dicromato como se muestra en la figura 1.2.

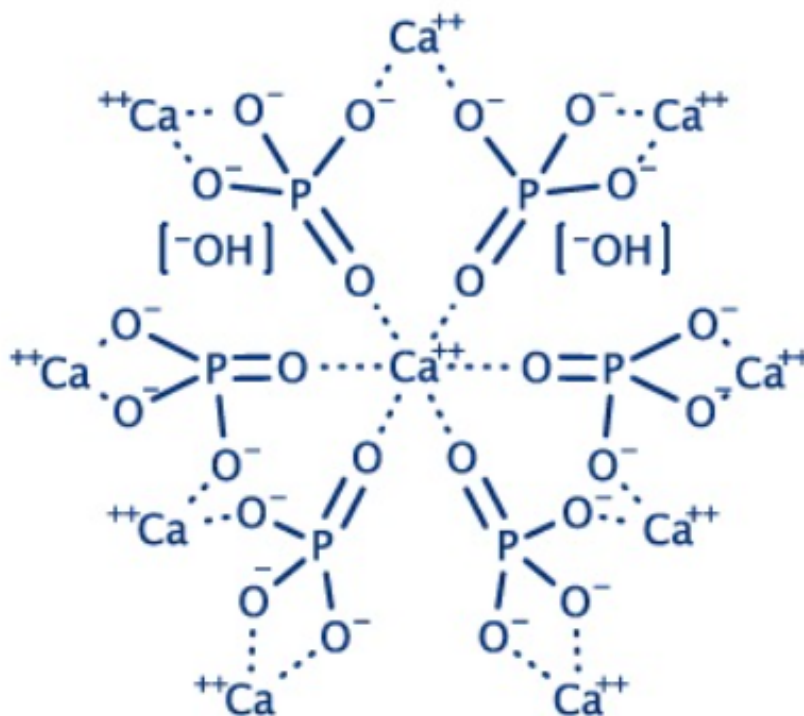


Figura 1.1: Estructura molecular de Hidroxiapatita. Imagen recuperada de Hydroxyapatite Whisker, HA Whisker as reinforcement materials from EPRUI (epruibiotech.com).

Sus aplicaciones se encuentran principalmente en los campos de la luminiscencia y los biomateriales. Dentro de la primera área cada año se descubren nuevos sistemas de fósforos aptos para su uso en las lámparas fluorescentes convencionales a pesar de los altos estándares que ya alcanzan los materiales existentes; tal que esta búsqueda esta estimulada no sólo por la necesidad de que los fósforos sean más eficientes o baratos de producir, sino también por la posibilidad de descubrir fósforos con nuevas características de luminiscencia [47] [6]

Los pirofosfatos alcalinotérreos tienen propiedades interesantes para su aplicación en dosimetría, como lo es $\text{Sr}_2\text{P}_2\text{O}_7$: CU-PrSr₂P₂O₇ ya que tiene una fuerte curva de brillo de termoluminiscencia compuesta por dos picos a 90 °C y 180 °C, un amplio rango lineal y un 20 % de desvanecimiento después de 1 mes. También está el caso de $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$: Er (III)-Yb (III) en el cual se ha reportado que tiene una curva de brillo de termoluminiscencia compuesta por un pico a 62 °C y a 100 °C relacionado con las emisiones de luz del ion Yb(III) [67].

En la segunda área, la de biomateriales, se buscan materiales que puedan hacer la función de relleno óseo. Si bien la hidroxiapatita ya es usada para este propósito tiene baja resistencia mecánica y esta característica impide que sea usada en áreas de estrés óseo, es por ello por lo que se busca algún material dentro de los fosfatos de calcio que tenga mayor resistencia mecánica. En el caso del pirofosfato de calcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) adicionado con $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ al 5 %mol presenta una mejor resistencia mecánica, lo cual tiene potencial aplicación ortopédica en el futuro cercano [33].

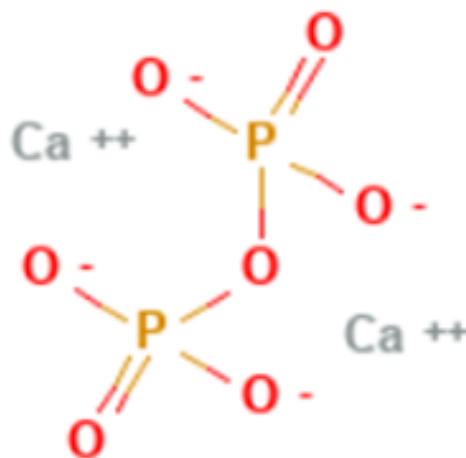


Figura 1.2: Estructura molecular de Pirofosfato de Calcio. Imagen recuperada de Calcium pyrophosphate | Ca₂P₂O₇ | CID 24632 - PubChem (nih.gov)

1.2.1. Tierras raras

Las tierras raras son el gran material del siglo XX y XXI, debido a que con ellas se han podido elaborar imanes permanentes Nd₂Fe₁₄B, lámparas tricolores Y₂O₃ : Eu(III), (Ce, Tb)MgAl₁₁O₁₉, BaMg₂Al₁₆O₂₇ : Eu(II) pantallas intensificadoras de rayos x CaWO₄, fibras ópticas dopadas (Er (III)), catalizadores usados en el craqueo de petróleo (Zeolitas Y), catalizadores de tres vías CeO₂, láseres, agentes antimicrobianos (Ce(NO₃)₃) las aplicaciones que tienen este grupo son diversas . La explicación a estas características recae en la configuración electrónica [61]

La configuración electrónica es el orden que toma cada electrón que posee un elemento dentro del átomo. Se tienen 7 niveles de energía (toman valores del 1 al 7) y 4 subniveles de energía (s, p, d y f). En la figura 1.3 se pueden ver los diferentes niveles de energía y se observa que no todos los niveles poseen 4 subniveles de energía. El principio de Aufbau determina la configuración electrónica de un átomo [54].

article booktabs

El arreglo de electrones con mínima energía, o configuración electrónica de estado fundamental de un átomo, es una lista de los orbitales ocupados por sus electrones, por lo que se puede predecir este arreglo siguiendo tres reglas:

- Los orbitales de energía más baja se llenan primero de acuerdo con el orden 1s, 2s, 2p, 3s, 3p, 4s, 3d; expresión conocida como el principio de Aufbau.
- Los electrones se comportan como si giraran en torno a un eje. Este giro (espín) puede tener dos orientaciones, indicados como arriba (↑) y abajo (↓); sólo dos electrones pueden ocupar

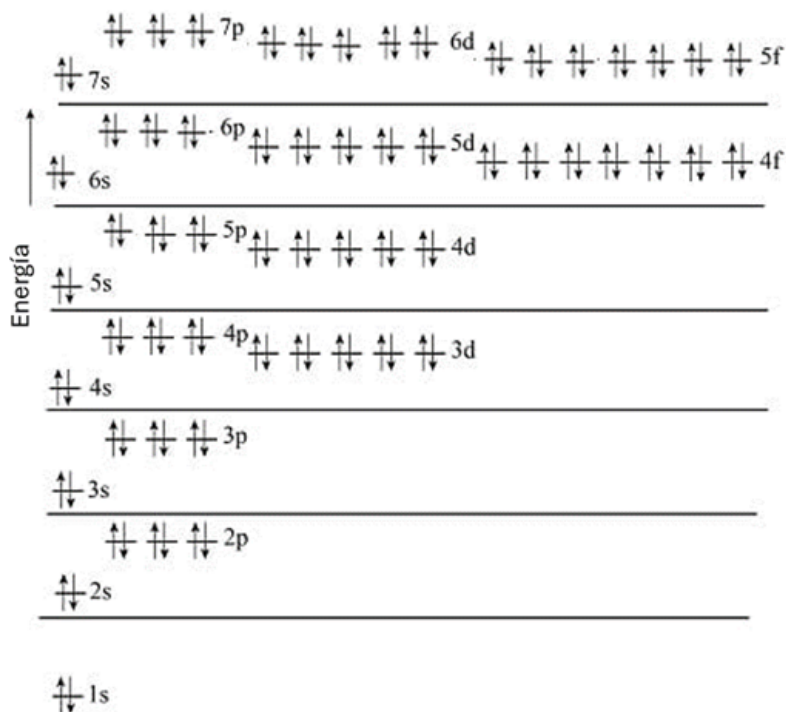


Figura 1.3: Posicionamiento de los electrones respecto a sus niveles de energía [54].

un orbital y deben tener un espín opuesto. A esta afirmación se le llama principio de exclusión de Pauli [54].

- Si están disponibles dos o más orbitales de igual energía, un electrón ocupa cada uno con espines paralelos hasta que todos los orbitales estén medio llenos; y sólo entonces un segundo electrón con espín opuesto puede ocupar cualquiera de los orbitales. A esta expresión se le conoce como regla de Hund. De tal manera que las configuraciones electrónicas de cada tierra rara quedan como se muestra en la tabla 1.1. [54].

En la columna 3 de la tabla 1.1 se tienen los radios iónicos (la distancia entre el centro del núcleo y el electrón más alejado del átomo) de cada tierra rara, el cual reduce de tamaño conforme aumenta el número atómico del elemento; a este fenómeno se le conoce como contracción lantánida.

La contracción lantánida se explica debido a que conforme avanza el llenado del orbital 4f también aumenta la carga nuclear; y añadiendo que el efecto pantalla que brinda un electrón a otro en el nivel f es pequeño, la carga nuclear efectiva que experimenta cada electrón aumenta, produciéndose una reducción del tamaño de la capa f. En conjunto con el efecto relativístico que contribuye un 10% en la contracción, se tiene como resultado una diferencia iónica entre el Lutecio y el Cerio de 0.149 pm.

De esta configuración y la contracción lantánida se derivan las propiedades físicas, ópticas, y magnéticas de los lantánidos. Las tierras raras utilizadas en el presente trabajo de investigación son Europio, Erblio e Yterbio.

Número atómico	Elemento	Símbolo	Radio iónico (pm) ¹	Configuración electrónica
58	Cerio	Ce	1.010	[Xe]4f ¹ 5d ¹ 6s ²
59	Praseodimio	Pr	0.990	[Xe]4f ³ 6s ²
60	Neodimio	Nd	0.983	[Xe]4f ⁴ 6s ²
61	Prometio	Pm	0.970	[Xe]4f ⁵ 6s ²
62	Samario	Sm	0.958	[Xe]4f ⁶ 6s ²
63	Europio	Eu	0.947	[Xe]4f ⁷ 6s ²
64	Gadolinio	Gd	0.938	[Xe]4f ⁷ 5d ¹ 6s ²
65	Terbio	Tb	0.923	[Xe]4f ⁹ 6s ²
66	Disproso	Dy	0.912	[Xe]4f ¹⁰ 6s ²
67	Holmio	Ho	0.901	[Xe]4f ¹¹ 6s ²
68	Erbio	Er	0.890	[Xe]4f ¹² 6s ²
69	Tulio	Tm	0.880	[Xe]4f ¹³ 6s ²
70	Iterbio	Yb	0.868	[Xe]4f ¹⁴ 6s ²
71	Lutecio	Lu	0.861	[Xe]4f ¹⁴ 5d ¹ 6s ²

Tabla 1.1: Tabla de elementos lantánidos con sus radios iónicos y configuraciones electrónicas.

1.3. Luminiscencia

1.3.1. Diagrama de Dieke

Gerhard Heinrich Dieke fue un físico del siglo XX que realizó una amplia investigación sobre los espectros de absorción de iones trivalentes de tierras raras los cuales se midieron en una red de Cloruro de Lantano LaCl₃. Actualmente estas aportaciones son conocidas como diagrama de Dieke el cual se puede ver en la figura 1.4.

A pesar de que estos espectros de emisión fueron medidos en un solo material, se pueden extrapolar a otros materiales, debido a que los iones de tierras raras dentro de cristales tienen un comportamiento de iones libres.

El ancho de cada estado indica la magnitud del desdoblamiento del campo cristalino, mientras que el centro de gravedad de cada multiplete da la ubicación aproximada de su correspondiente al nivel de energía del ion libre.

El diagrama de Dieke proporciona información muy útil para predecir una asignación adecuada de los espectros de emisión correspondientes a los iones trivalentes de tierras raras en los cristales, también se puede usar como guía para predecir aproximadamente la longitud de onda media para cada transición.

1.3.2. Reglas de selección

Como se ha visto, en luminiscencia se producen transiciones entre estados energéticos, estos tienen cierta probabilidad de que ocurran o sean prohibidas, uno de los factores que determina esto es la conservación de la energía. A la par también se deben respetar las reglas de selección las cuales son:

- El cambio en el número cuántico principal n debe ≥ 1 .
- El cambio en el número cuántico de momento angular orbital l sólo puede ser ± 1 .

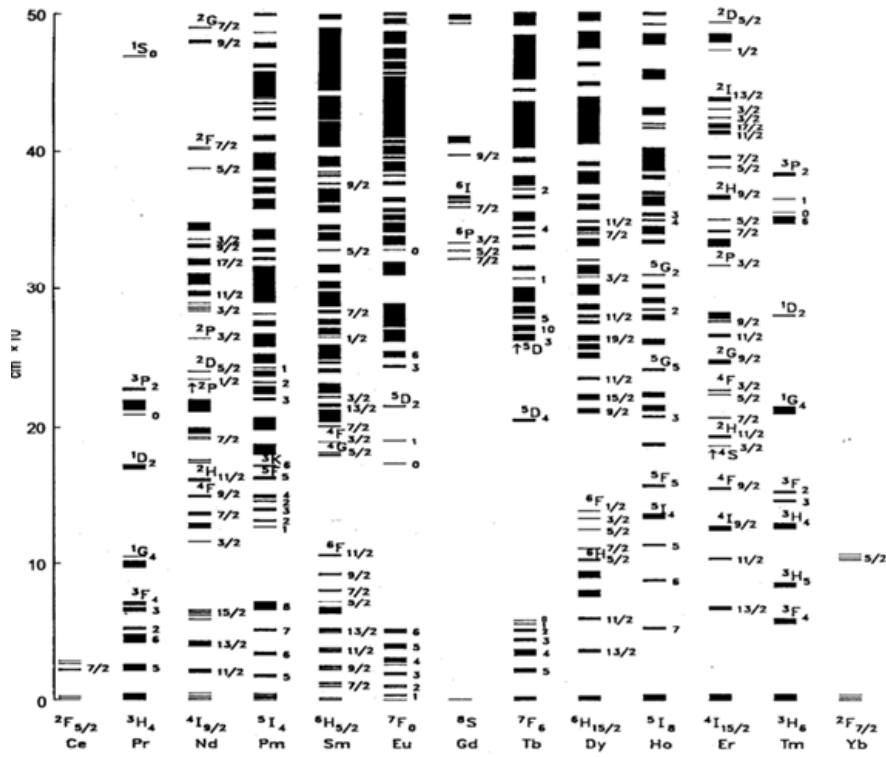


Figura 1.4: Diagrama de Dieke donde se representan los niveles de energía de iones libres calculados de tierras raras trivalentes. [68]

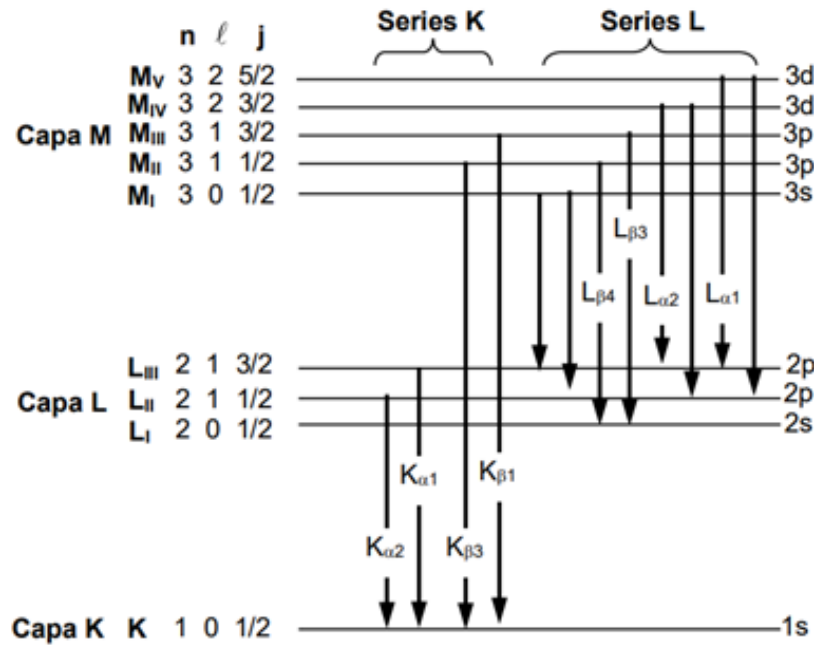


Figura 1.5: Visión general de los primeros niveles con sus posibles transiciones en la notación de Siegbahn.[73]

- El cambio en el número cuántico de momento angular total j sólo puede ser ± 1 o 0.

Las primeras transiciones posibles se muestran en la figura 1.5, las cuales se rigen por las reglas previamente mencionadas.

1.3.3. Up conversion

Existen diversos mecanismos de fotoluminiscencia como Down-shifting, down-conversión y up-conversion. La energía de los fotones emisores suele ser inferior a la de los fotones absorbidos como es el caso de fluorescencia (FL) y el proceso de corte cuántico (QC). Sin embargo, hay otros mecanismos de luminiscencia como up-conversion (UC) que emite fotones de mayor energía (luz visible) después de la absorción de fotones de menor energía (infrarrojo).

El proceso de transferencia de energía por up-conversion es un fenómeno óptico no lineal en el que la absorción continua de dos o más fotones conduce a una radiación de longitud de onda más corta a través de estados intermedios de larga duración (emisión antiStokes) [18].

La longitud de onda de excitación de 980 nm puede producir un fenómeno de up-conversion, este fenómeno se conoce como anti-Stokes porque se utilizan fotones infrarrojos de baja energía (1,26 eV) para excitar el material y producir fotones visibles verdes (2,38 eV) y rojos (1,88 eV) de mayor energía que la longitud de onda de excitación.

Sucede gracias a dos tipos de centros luminiscentes, que generalmente se denominan sensibilizador y activador (figura 1.6) los cuales están incrustados en la matriz cristalina. Bajo la excitación de fotones con menor energía, tanto el sensibilizador como el activador se excitarían.

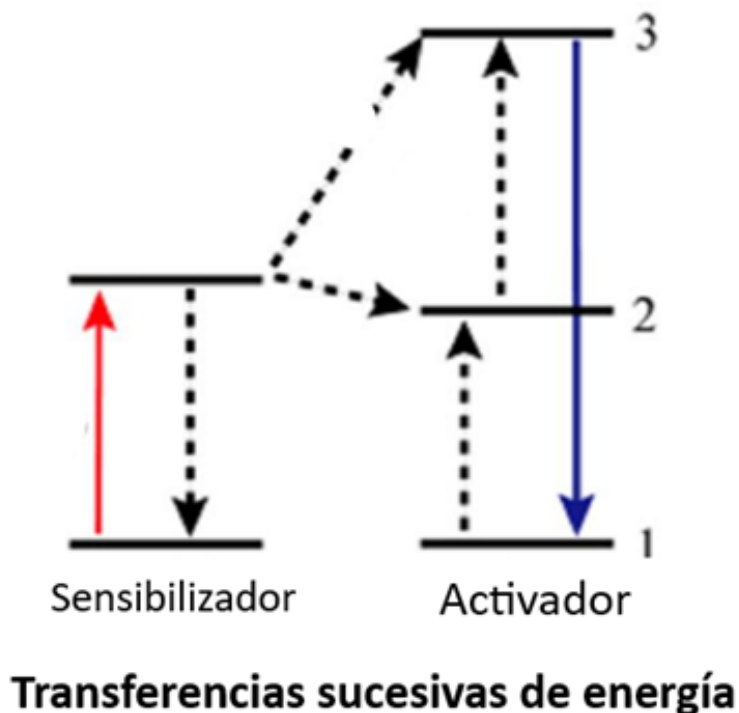


Figura 1.6: . Representación gráfica de la transferencia de energía por up-conversion

Con la transferencia de energía no radiativa del sensibilizador al activador adyacente, se produce la absorción secuencial de los activadores a los estados más excitados. Y se puede observar la emisión radiativa con el regreso del activador al estado fundamental.

Entre todos los Ln (III), el Yb (III) tiene el potencial de servir como sensibilizador en sistemas de transferencia de energía por up-conversion debido a su nivel de energía único y simple con solo un nivel excitado de ${}^7F_{5/2}$. Con niveles de energía dispuestos en forma de escalera, estados excitados de larga duración y excelente resonancia con la transición del Yb (III); Er (III), Ho (III) y Tm (III) han sido seleccionados como activadores UC durante décadas. Entre estos Ln (III) destaca el Er (III) como activador ya que muestra una eficiencia up-conversion mayor [18].

1.4. Técnicas de caracterización

1.4.1. Difracción de rayos X

La difracción de rayos x es una técnica para el estudio de la estructura atómica de la materia, debido a que las muestras no necesitan una preparación previa para su análisis y por ser no destructiva es ampliamente usada.

El haz de rayos x tiene una longitud de onda alrededor de 1.5 \AA el cual es un orden de magnitud parecido al espaciado interplanar de los sólidos como se muestra en la figura 1.7.

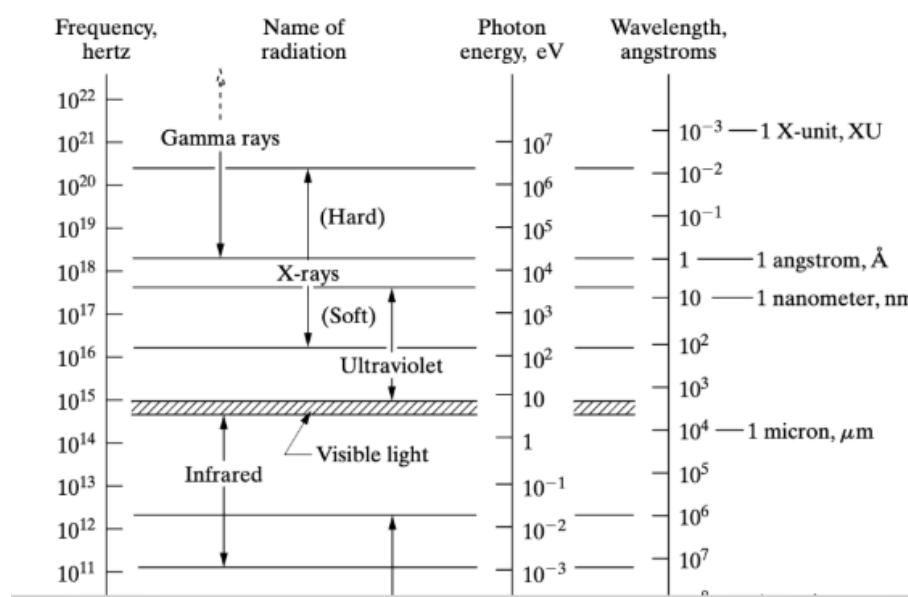


Figura 1.7: Espectro electromagnético y su longitud de onda.[73]

Esta caracterización es un proceso por el cual un haz de rayos X pasa a través de un conjunto de átomos, las cortezas electrónicas de los átomos interactúan con la onda incidente dispersándolos. El haz es difractado debido a la simetría de agrupación de los átomos. La difracción del haz de rayos-X se produce si la longitud de onda es prácticamente la misma que la distancia que hay entre los planos cristalinos de reflexión, y debido a la diferencia de caminos ópticos, existirá una diferencia de fases entre los frentes de onda resultantes del haz de rayos-X, ya sean constructivos o destructivos lo cual genera un patrón de difracción esta forma de describir la difracción de los rayos-X está dada por la Ley de Bragg [74][31].

W. L. Bragg presentó una explicación sencilla de los rayos difractados de un cristal. Suponiendo que las ondas incidentes se reflejan especularmente desde planos paralelos de átomos en el cristal, y que cada plano refleja sólo una fracción muy pequeña de la radiación, como un espejo ligeramente plateado. En la reflexión especular (similar a un espejo), el ángulo de incidencia es igual al ángulo de reflexión. Los rayos difractados se encuentran cuando los reflejos de planos paralelos de átomos interfieren de manera constructiva, como en la figura 1.8. Se trata la dispersión elástica, en la que la energía de los rayos X no cambia con la reflexión.

Se deben considerar planos reticulares paralelos espaciados a una distancia d entre sí. La radiación incide en el plano del papel. La diferencia de trayectorias para los rayos reflejados desde planos adyacentes es $2d \sin \theta$, donde θ se mide desde el plano. La interferencia constructiva de la radiación desde planos sucesivos ocurre cuando la diferencia de trayectorias es un número entero n de longitudes de onda, de modo que da la ecuación 1, la cual se cumple solo para longitudes de onda $\lambda \leq 2d$ [35]

$$2d \sin(\theta) = n\lambda \quad (1.1)$$

De manera técnica, todo experimento de difracción de rayos x requiere una fuente de ra-

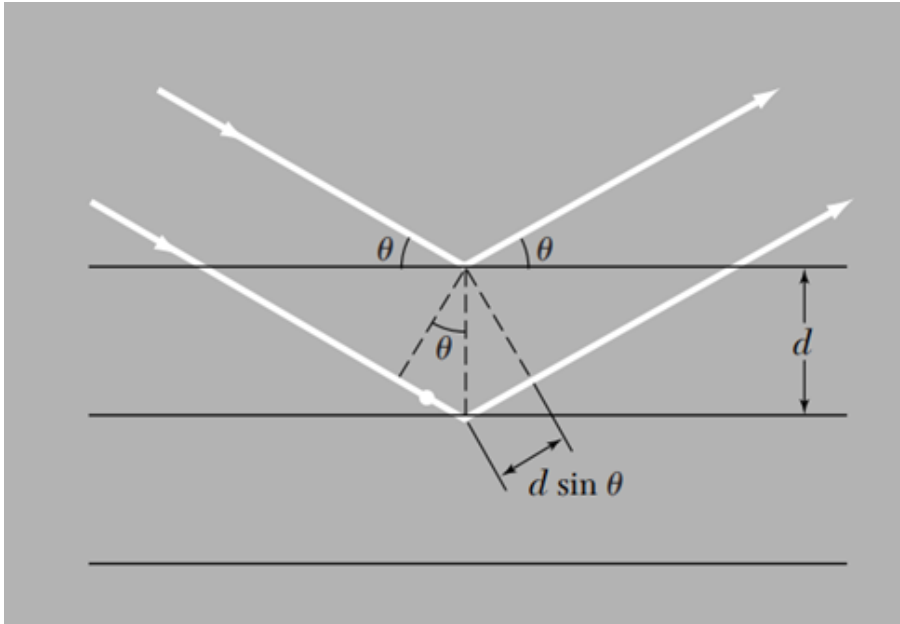


Figura 1.8: Derivación de Ley de Bragg.

yos x, la muestra que se investiga y un detector para recoger los rayos x difractados. Dentro de este marco de trabajo general las variables que caracterizan las diferentes técnicas de rayos x son:

- Radiación, monocromática o de λ variable.
- Muestra: monocristal, polvo o pieza sólida.
- Detector: contador o película fotográfica.

En la figura 1.9 también se puede ver la creación del patrón de difracción por rayos x. Un difractograma de rayos x recoge los datos de intensidad en función del ángulo de difracción (2θ) obteniéndose una serie de picos. Los datos más importantes obtenidos a partir de un difractograma son los siguientes:

- Posición de los picos expresada en valores de θ , 2θ .
- Intensidad de pico. Las intensidades se pueden tomar como alturas de los picos o para trabajos de más precisión las áreas. Al pico más intenso se le asigna un valor de 100 y el resto se resécala respecto a éste.
- Perfil de pico. Aunque se utiliza menos que los anteriores la forma de los picos también proporciona información útil sobre la muestra analizada.

1.4.2. SEM

El desarrollo de nuevas técnicas para obtener imágenes y sondear nanoestructuras ha sido esencial para la evolución de este campo. En el caso de estructuras periódicas en 3D, la difracción de electrones o rayos X se puede utilizar para determinar la estructura en el espacio recíproco, que

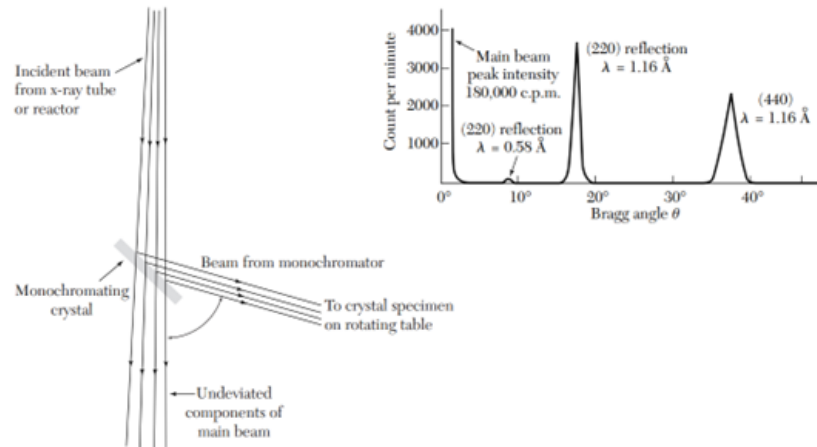


Figura 1.9: Esquema de un monocromador que, mediante reflexión de Bragg, selecciona un espectro estrecho de longitudes de onda de rayos X o neutrones a partir de un haz incidente de amplio espectro. La parte superior de la figura muestra el análisis (obtenido por reflexión de un segundo cristal) de la pureza de un haz de neutrones de 1,16 Å de un monocromador de cristal de fluoruro de calcio.

luego se puede invertir para encontrar las disposiciones atómicas en el espacio real. En el caso de los sólidos individuales a escala nanométrica, la difracción es solo de utilidad limitada por razones fundamentales y prácticas. El pequeño tamaño del sólido interrumpe la periodicidad de la red, difuminando los picos de difracción, y también produce una señal dispersa muy pequeña.

Por lo tanto, las sondas en el espacio real que pueden determinar directamente las propiedades de la nanoestructura son muy valiosas. Estas sondas utilizan la interacción de una partícula, normalmente un electrón o un fotón, con el objeto en estudio para crear una imagen. Las técnicas se dividen en dos clases principales, sondas focales y sondas escaneadas.

En la microscopía focal, la partícula de la sonda se enfoca mediante una serie de lentes sobre la muestra. La resolución final del sistema está limitada por la naturaleza ondulatoria de la partícula a través del principio de incertidumbre de Heisenberg o, equivalentemente, la difracción.

Una de las principales limitaciones del microscopio electrónico (TEM) es que el haz de electrones debe penetrar la muestra, lo que hace imposible examinar las estructuras sobre sustratos sólidos. Este problema se supera con el microscopio electrónico de barrido (SEM). En un SEM, un haz de electrones de alta energía (100 V a 100 kV) y muy enfocado se barre sobre la muestra.

El fundamento del SEM radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una columna en la que se ha hecho un vacío de alrededor de $10^{(-7)}$ Torr. En ella, el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas (condensadora y objetivo) como se muestra en la figura 1.10 desde unos 25 000-50 000 nm hasta unos 10 nm. Al mismo tiempo, la intensidad de corriente se disminuye desde unos $10^{(-14)}$ hasta unos $10^{(-10)}$ o $10^{(-12)}$. Esta disminución en la intensidad implica una menor cantidad de electrones primarios ya que la intensidad inicial de $10^{(-14)}$ supone una emisión de $1015 e^-/\text{seg}$, mientras que, en la definitiva, de $10^{(-12)}$ es de $6.106e^-/\text{seg}$ [48]

El haz electrónico con estas últimas características, es decir puntual, es desplazado sobre toda

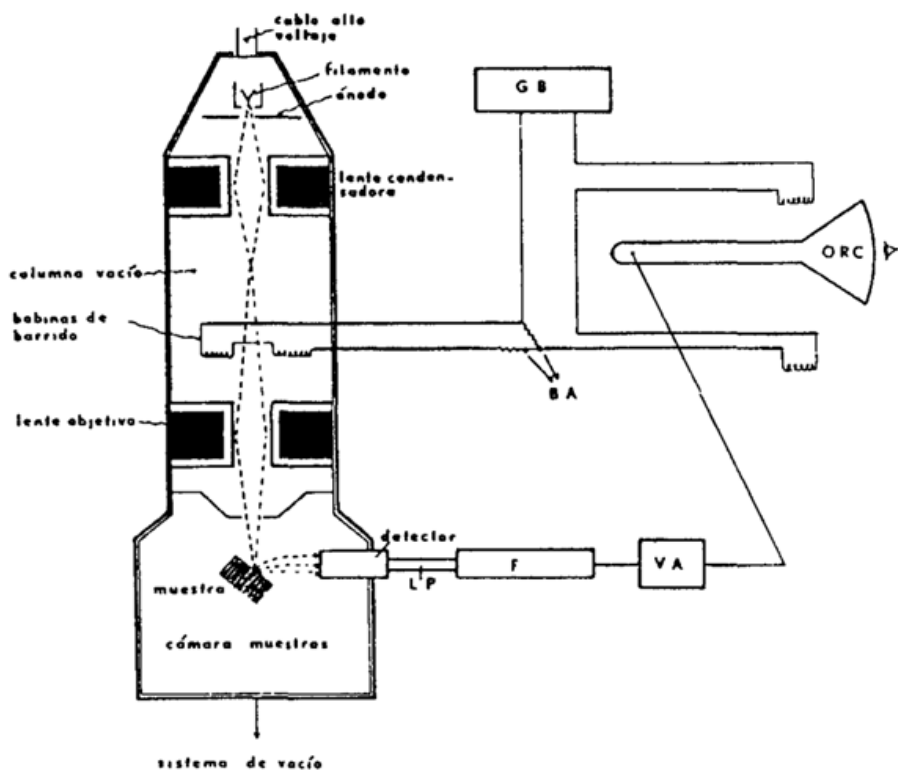


Figura 1.10: Esquema del microscopio electrónico de barrido (SEM) en el que se muestran los diferentes componentes de este. LP: light pipe, F: fotomultiplicador, ORC: osciloscopio de rayos catódicos, GB: generador de barrido, BA: bobinas de amplificación.

la superficie de la muestra a modo de un pincel que iría barriendo la muestra con continuas idas y venidas. Esta motilidad del haz se consigue gracias a un sistema de bobinas de barrido situadas en la columna del instrumento.

En la interacción del haz electrónico con la superficie se producen e^- secundarios que, tras ser captados por un detector, son hechos incidir sobre un "scintillator", donde cada e^- dará origen a varios fotones. Dichos fotones son dirigidos hasta un fotomultiplicador a través del cañón de luz y, ya en aquél, cada fotón dará origen a un fotoelectrón que, a través de una serie de dinodos con diferencias de potencial crecientes produce, mediante un efecto en cascada, gran cantidad de e^- secundarios. En definitiva, lo que se ha conseguido ha sido una amplificación de la corriente debida a los e^- secundarios originales o, dicho de otro modo, una amplificación de la información sobre la muestra suministrada de dichos e^- . Los e^- secundarios, finalmente, previo paso por un videoamplificador, son dirigidos hacia un tubo semejante a un osciloscopio de rayos catódicos (ORC) sobre cuya pantalla se producirá la imagen. A continuación, las señales se muestran en la pantalla de visualización y el operador controlará el brillo y la intensidad hasta obtener una imagen razonablemente clara. La cantidad de electrones retro dispersados y/o electrones secundarios generados por el haz que emergen de la muestra depende de la composición local y la topografía de la muestra. Estos electrones son recogidos por un detector de electrones y se forma una imagen al representar gráficamente la señal del detector en función de la ubicación del haz.

Esta potente técnica se puede utilizar en la mayoría de los tipos de muestras, pero normalmente tiene una resolución inferior (1 nm) que el TEM [31].

Además de la obtención de imágenes, el haz de SEM se puede utilizar para exponer un material sensible a los electrones y dibujar pequeñas características en una técnica conocida como litografía por haz de electrones. La resolución máxima (10 nm) es muy alta, pero es un proceso lento porque los patrones deben dibujarse píxel por píxel. Se utiliza principalmente en la investigación relacionada con la creación de prototipos y fabricación de máscaras ópticas.

La imagen del espécimen se forma punto por punto dependiendo del movimiento de las bobinas de escaneo, lo que hace que el haz de electrones se mueva a ubicaciones discretas en forma de líneas rectas hasta que se produce un ráster rectangular en la superficie del espécimen. Todo el proceso depende del aumento requerido. En caso de que el operador solicite una imagen ampliada más alta, las bobinas de escaneo hacen que el haz desvíe un cruce en un área más pequeña.

1.4.3. Espectroscopia de excitación y de emisión

En la figura 1.11 se muestra un esquema típico de un experimento para medir los espectros de fotoluminiscencia. Los espectros de fotoluminiscencia también se miden a menudo utilizando equipos comerciales compactos llamados espectrofluorímetros.

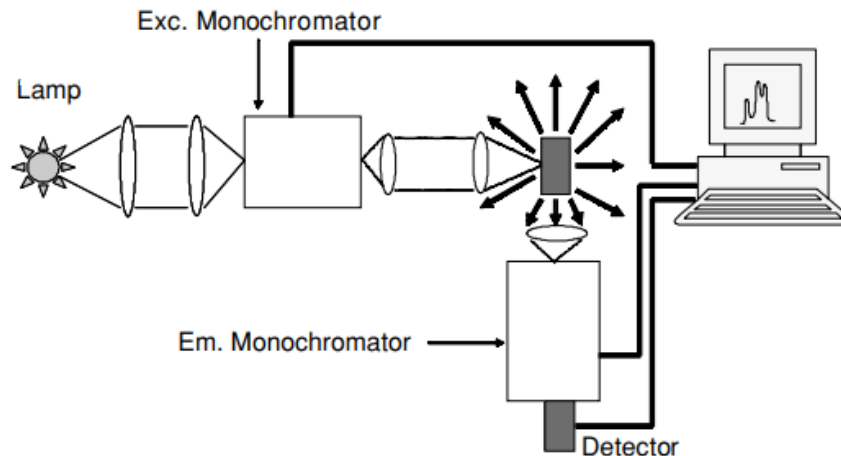


Figura 1.11: Esquema para la medición de un espectro de fotoluminiscencia.

La muestra se excita con una lámpara, seguida de un monocromador (el monocromador de excitación) o un haz láser. La luz emitida se recoge con una lente de enfoque y se analiza mediante un segundo monocromador (el monocromador de emisión), seguido de un detector adecuado conectado a una computadora. Se pueden registrar dos tipos de espectros:

- Espectro de emisión.
- Espectro de excitación.

En los espectros de emisión, la longitud de onda de excitación es fija y la intensidad de la luz emitida se mide en diferentes longitudes de onda mediante el escaneo del monocromador de emisión.

En los espectros de excitación, el monocromador de emisión se fija en cualquier longitud de onda de emisión mientras que la longitud de onda de excitación se escanea en un rango espectral determinado [42] [73].

1.5. Ventanas biológicas

Las ventanas biológicas son regiones donde los tejidos biológicos muestran una transparencia parcial debido a disminuciones simultáneas en la absorción y dispersión de la luz [72].

Su importancia recae en la obtención de imágenes de fluorescencia para la detección de tipos de tejidos específicos. Se tienen tres ventanas para la radiación electromagnética, las cuales son:

- 650 a 950 nm.
- 1000 a 1350 nm.
- 1350 nm a 2400 nm.

1.6. Bioensayos de toxicidad

Las diversas actividades humanas generan desechos que desencadenan en cuerpos de agua y para evaluar los efectos de estos, o de cualquier otro material, es necesario establecer una relación cuantitativa reproducible entre la exposición de la sustancia y la mortalidad para el organismo bajo investigación. Esto es precisamente lo que hace un bioensayo ya que son métodos que buscan evaluar estos efectos del material tras ser aplicado en un ser vivo o tejido.

Dependiendo del tiempo de exposición al material se determinan dos tipos de pruebas agudas y crónicas. La especie utilizada en esta investigación es *D. magna* (*Daphnia magna*).

1.6.1. *D. magna*

Una de las especies más usadas hasta ahora para bioensayos, ha sido el modelo toxicológico *D. magna* debido a que, es un crustáceo de agua dulce con un papel clave dentro de la cadena alimenticia como consumidor primario de algas y plantón.

Las *D. magna* son crustáceos planctónicos que pertenecen a Phyllopoda también llamados Brachiopoda pertenecientes a la familia de los Cladoceros. Sus tamaño va desde los 0.5mm a más de 6mm y su caparazón, que se compone principalmente de quitina tiende a ser transparente lo cual permite ver su anatomía. De manera más detallada se describe la fisiología de *D. magna* en la figura 1.12.

Su alimentación consiste en algas planctónicas y debido a la transparencia de su caparazón, tiende a tener el color de lo que consume. La comida se recolecta con la ayuda de un aparato de filtración, que consiste en los filopodos, que son patas planas en forma de hojas que producen una corriente de agua al interior.

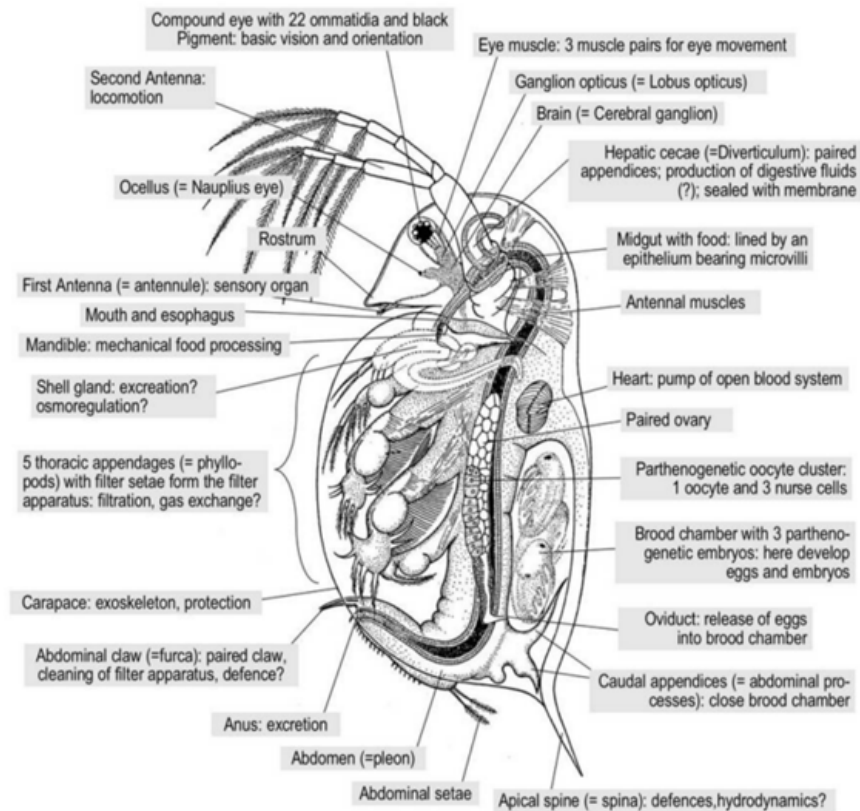


Figura 1.12: Fisiología D. magna[79]

La característica más importante de la especie D. magna es su reproducción debido a que existen dos, asexual y sexual. La primera es por partenogénesis lo que genera clones de sí misma, este tipo de reproducción es favorable para los bioensayos debido a que todas las generaciones tienen la misma carga genética y de esta manera se asegura la reproducibilidad del experimento.

Su otro tipo de reproducción, el sexual, solo se produce cuando la especie se encuentra en estrés, este podría producirse por sequías, cambios de temperatura o sobrepoblación. Parte del nacimiento de un macho y de hembras con formación de un huevo haploide, que después de aparearse con el macho, la hembra expulsa un epítopo (huevo sexual). El epítopo puede soportar lapsos de tiempos prolongados sin eclosionar y bajas temperaturas, este no eclosiona al menos que existan estímulos externos como fotoperíodos apropiados. Del epítopo solo pueden eclosionar hembras como se ve en la figura 1.13.

Otro punto favorable es su período de vida corto debido a que permiten la observación y monitoreo de diversos tóxicos en características de historia de vida. Todos ellos hacen que Daphnia sea un modelo altamente reproducible, de corta duración y con gran facilidad exploratoria del organismo [76].

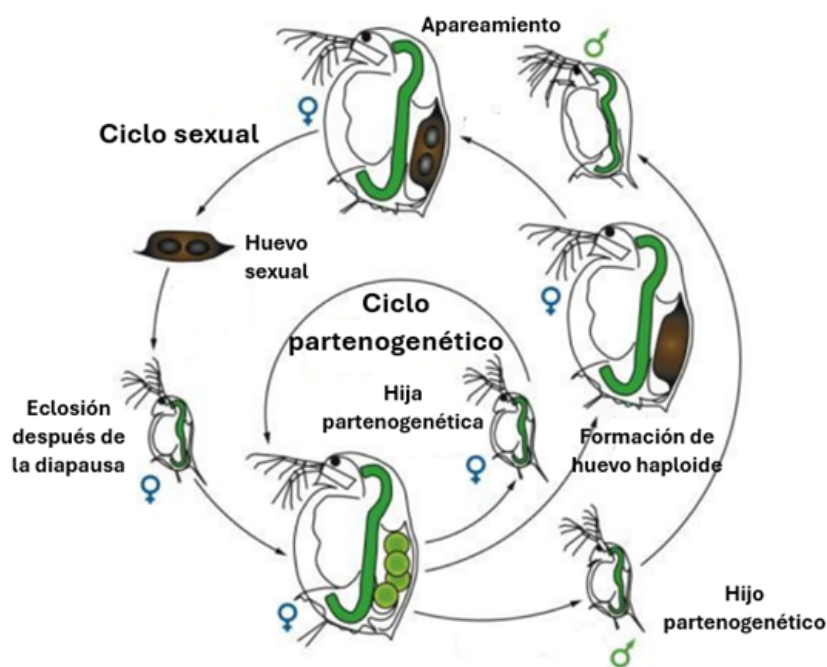


Figura 1.13: Modelo de decisión reproductiva del organismo *D. magna* [24].

1.6.2. Pruebas agudas

Como se había mencionado antes, existen dos tipos de pruebas que se puedan realizar a fin de conocer la toxicidad de los materiales, los cuales son las pruebas agudas y las crónicas. Las pruebas agudas son de corta duración (entre 24 y 48 horas) y buscan hallar los efectos inmediatos (mortalidad o inmovilización). Con este fin se busca la relación CE_{50} la cual es la concentración a la cual el 50% de la población fallece o queda inmovilizada durante las primeras 48 horas, se realiza en neonatos y se efectúa siguiendo lo dispuesto en la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010.

1.6.3. Pruebas crónicas

Por otra parte, se tienen la prueba crónica, que en el caso de *D. magna* tiene una duración promedio de 20 días en los cuales se expone a un grupo de neonatos a una concentración del material previamente determinada, que suele ser mayor a la CE_{50} . En este tipo de pruebas se evalúan distintos parámetros poblacionales, como la natalidad, edad de maduración sexual y mortalidad. Puede realizarse en ausencia de alimento [20].

Capítulo 2

Desarrollo experimental

Se llevaron a cabo dos síntesis, la primera de ellas se hizo por medio de la técnica de evaporación de solventes, esta técnica de síntesis es económica y de cortos tiempos de síntesis; consiste en realizar soluciones químicas adecuadas, mezclarlas y colocarla en una mufla para que se evapore el solvente, posterior a esto se somete a un tratamiento térmico. Se utilizaron como precursores:

- Fosfato de amonio monobásico $\{NH_4H_2PO_4\}$.
- Cloruro de calcio hexahidratado $CaCl_2 \cdot 6H_2O$

Como impurificantes se usaron:

- Nitrato de Er (III) pentahidratado $Er(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$.
- Nitrato de Yb (III) pentahidratado $Yb(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$.

Ambos, tanto precursores como impurificantes, fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Para realizar la síntesis de la matriz se pesaron 1.0000 gr de cloruro de calcio y 0.6000 gr de fosfato de amonio monobásico como se muestra en la figura 2.1 A. El cloruro de calcio se disuelve en 5ml de agua desionizada y después se añade el fosfato de amonio monobásico, para poder homogenizar la mezcla se coloca en un mezclador tipo vortex como el de la figura 2.1 B. Como resultado se obtiene una suspensión, esta se centrifuga para decantar la parte sólida. Lo decantado se coloca en un crisol y el mismo se coloca en una parrilla como en la figura 2.1 C a 60°C durante 2 horas. Una vez concluidas las 2 horas se realiza un tratamiento térmico, este fue realizado en un horno tipo mufla a 700°C durante 4 horas (figura 2.1 D). Finalmente, la muestra recolectada se muele durante 2 horas con el objetivo de homogenizar el tamaño de las partículas a escala submicrométrica.

Si se requiere impurificar estas muestras, al inicio de la síntesis se pesa la cantidad necesaria de impurificantes que se requiera de Er (III) e Yb (III) de acuerdo con el porcentaje de dopaje que se busque. Este material se mezcla en la solución de cloruro de calcio y después es agregado el fosfato de amonio monobásico, posterior a ello, todo el proceso de síntesis es exactamente igual al descrito en la matriz. Los dopajes son normalmente tratados en porcentajes, y varían de acuerdo con la matriz en la que sean usados. Para hallarlos se realizan los siguientes cálculos.

El peso molar del cloruro de calcio hexahidratado es de 219.08 g/mol, cada elemento que compone al compuesto contribuye a este peso, de tal manera que el elemento Calcio solo contribuye

40.078g. Si en cada 219.08g/ mol de $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ hay 40.078g de Ca, entonces por regla de 3 en cada 1g/mol de $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ habrá 0.18g de Ca. De tal manera que 0.18g de Ca representa el 100 % y el 1 % serían 0.0018g.

Por otra parte, se hace un proceso análogo con el Er e Yb. El compuesto usado para la síntesis fue nitrato de Erblio pentahidratado $Er(NO_3)_5 \cdot H_2O$ con un peso molar de 443.35g/mol donde el Er contribuye a este peso con 167.26g. De tal manera que colocando la razón de proporción como se muestra en la tabla 2.1 y haciendo uso de la regla de 3 se obtiene que para dopar al material al 1 % en peso molar se necesitan 0.0047g de $Er(NO_3)_5 \cdot H_2O$.

Tabla 2.1: Regla de 3 para el cálculo del dopaje del 1 % de Erblio

443.35g/mol	167.26g
0.0047g/mol	0.0018g

Finalmente, para el Yb se usó nitrato de Yterbio pentahidratado $Yb(NO_3)_5 \cdot H_2O$ con un peso molar de 449.13 g/mol donde el Yb contribuye con 173.05g de tal manera que al realizar la regla de 3 como se muestra en la tabla 2.2, se queda que para dopar el material al 1 % en peso molar se debe usar 0.00467g $Yb(NO_3)_5 \cdot H_2O$.

Tabla 2.2: Regla de 3 para el cálculo del dopaje del 1 % de Yterbio

449.13g/mol	173.05g
449.13g/mol	0.0018g

En un principio se requirió encontrar el porcentaje de dopante en el cual el material tuviera la mayor intensidad en luminiscencia. A este porcentaje se nombró como “porcentaje optimo” y para encontrarlo se debe realizar un mapeo.

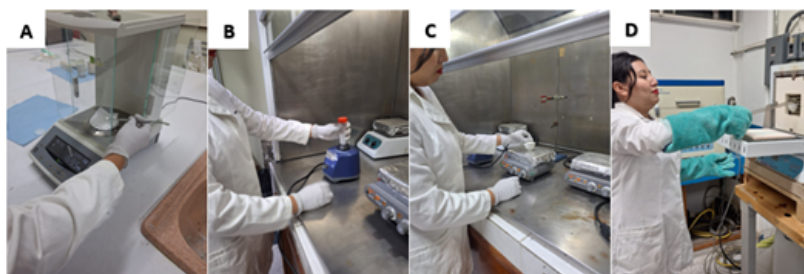


Figura 2.1: Proceso de síntesis del piro fosfato de calcio por la técnica de evaporación de solventes.

El primer mapeo fue realizado con los porcentajes de 0.5 %, 1.0 %, 1.5 %, 3.0 %, 4.5 % y 6.0 % de Er, y como se verá en el capítulo 4: Análisis de resultados, se logró hallar que el mejor dopaje fue al 1.5

Posterior a esto impurificó la muestra al 1.5 % de Er y se mapeo el porcentaje de Yb optimo. Se hicieron dopajes de mapeo al 0.5 %, 1.0 %, 1.5 %, 3.0 %, 4.5 % y 6.0 % de Yb, lo que se encontró fue que el dopaje de 4.5 % de Yb es el porcentaje de dopaje óptimo para la síntesis de fosfato de calcio por medio de la síntesis de evaporación.

2.1. Síntesis de nanopartícula de hidroxiapatita dopada con Eu por la técnica de hidrotermal.

La síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita dopada con Eu se realizó con la técnica de hidrotermal. Esta técnica consiste en colocar al solvente (en nuestro caso agua) y el precursor en un sistema cerrado a temperaturas por encima de los 100°C, para aumentar la presión y así facilitar la síntesis del material. Se utilizaron como precursores:

- Fosfato de amonio monobásico $NH_4H_2PO_4$.
- Cloruro de calcio hexahidratado $CaCl_2 \cdot 6H_2O$
- Trizma $NH_2C(CH_2OH)_3$

Como impurificante se uso:

- Cloruro de Europio hexahidratado $EuCl_3 \cdot 6H_2O$

Ambos, tanto precursores como impurificantes, fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

Primero se pesaron 0.6057 g de trizma $NH_2C(CH_2OH)_3$ (figura 2.2 A) para posteriormente disolverla en 50ml de agua desionizada, posteriormente se divide la solución en dos partes iguales. Se procede a pesar 2.620g de cloruro de calcio hexahidratado $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ y 0.517g de fosfato de amonio $NH_4H_2PO_4$. En las soluciones previamente realizadas de 25mL se van a disolver el cloruro de calcio, y en los otros 25 ml se procede a disolver el fosfato de amonio

Para garantizar la síntesis de Hidroxiapatita en todo momento se debe mantener un pH de las soluciones entre 10.5 y 11; es por ello por lo que el siguiente paso en la síntesis es medirlo y en caso de ser necesario corregirlo con hidróxido de amonio NH_4OH . La solución de trizma con cloruro de calcio normalmente se halla con un pH de 10.2, el cual se logra cambiar a 10.8 con 100 μ L de hidróxido de amonio. Por otra parte, la solución de trizma con fosfato de amonio tiene un pH mucho más básico, de 8, por ello se le añade 6.4mL de hidróxido de amonio para que se corrija a un pH de 10.54. Cabe recalcar que este proceso debe realizarse con un agitador magnético dentro del vaso en el que se hallen las soluciones y en la parrilla, para garantizar la homogenización de dicha solución

Posterior a este proceso se debe colocar en un soporte universal un embudo de goteo, debajo un vaso precipitado con un agitador magnético e inmediatamente abajo es colocada la parrilla, este arreglo debe quedar como se ve en la imagen x.

La solución de trizma con cloruro de calcio se coloca en el vaso precipitado, y la solución de fosfato de amonio se colocada en el embudo como se ve en la figura 2.2 B. El goteo se debe hacer de la manera más lenta posible y la agitación magnética debe de ser la más alta posible, esto para garantizar la formación de nanopartículas. El proceso dura alrededor de 30 min. Una vez terminado el goteo se retira el embudo, se procede a corregir el pH con 3.7 ml de hidróxido de amonio, se tapa la solución y se deja agitando durante otros 30 min.

La siguiente parte de la síntesis consiste en el uso del microondas de Antoon Par como se observa en la figura 2.2 C; dentro de las cápsulas se coloca 15mL de la solución de Hidroxiapatita junto con un agitador magnético. Esta capsula va a ir al microondas durante 15 min, a 220 grados y con una presión de 24bares. Esto se hace hasta que la solución se termine.

Desarrollo experimental

2.1 Síntesis de nanopartícula de hidroxiapatita dopada con Eu por la técnica de hidrotermal.

Finalmente se hacen lavados para eliminar al hidróxido de amonio de la solución. Los lavados se pueden realizar dejando decantar la suspensión o con el uso de la centrifugadora este proceso puede realizarse en un lapso más corto. En esta síntesis se hizo uso del segundo método a 1000 revoluciones durante 5min. Al terminar, se verifica el pH que debe ser de 7 y se coloca en una mufla a 60° C para secar el material y proceder a recolectarlo, como último paso se pasan las muestras al molino durante 2 horas (figura 2.2 D) para homogenizar el tamaño del polvo obtenido.

Para realizar las nanopartículas de hidroxiapatita dopadas con Eu solo se debe pesar el porcentaje de cloruro de europio hexahidratado $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ correspondiente y tomarse a la solución de trizma con cloruro de calcio que se hizo en un principio. Para conocer el dopaje al 1 % molar del cloruro de Europio se deben conocer el peso molar de las sustancias involucradas.

Se hizo uso de cloruro de calcio hexahidratado $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ con un peso molar de 219.08g/mol, donde 40.08g son de calcio (Ca). Por regla de 3 (tabla 2.3), por cada 1g/mol que se tenga de $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ se tienen 0.18g de Ca. Por lo tanto 0.18g representan el 100 % de Calcio en el material por cada 1g/mol y el 0.0018g es el 1 %.

Tabla 2.3: Regla de 3 para el cálculo del dopaje del 1 % de Europio

366.41g/mol	151.96g
0.00434g/mol	0.0018g

Por parte del Europio, se usó cloruro de Europio hexahidratado ($EuCl_3 \cdot 6H_2O$) con un peso molar de 366.41g/mol del cual 151.96g son de Europio. De tal manera que, siguiendo la razón de proporción, si por cada 366.41g/mol de $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ se tienen 151.96g/mol de Eu; entonces para el 1 % de dopaje molar se deben usar 0.00434g/mol cloruro de Europio hexahidratado.

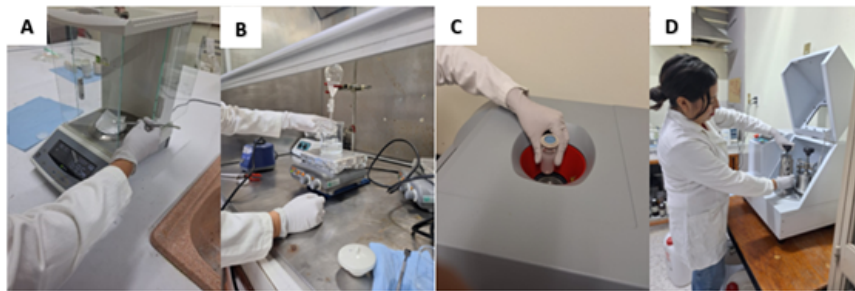


Figura 2.2: Proceso de síntesis de Hidroxiapatita por la técnica de de Hidrotermal.

Al igual que se realizó con la anterior síntesis; se debe de mapear el porcentaje de dopaje óptimo para esta síntesis, que como se recordara, es el porcentaje de dopante en el cual el material tuviera la mayor intensidad en luminiscencia. Usando de base que el 1 % equivale a 0.00434g/mol $EuCl_3 \cdot 6H_2O$, se realizaron 6 muestras de nanopartículas de hidroxiapatita dopada con .5 %, 1 %, 1.5 %, 3 %, 4.5 % y 6 % de las cuales se halló que el porcentaje de dopante óptimo fue del 3 % peso molar.

2.2. Pruebas en el modelo eco toxicológico: *D. magna*

2.2.1. Pruebas agudas

Se realizaron pruebas agudas en ausencia de alimento para la detección de CE50 en grupos de *D. magna*; se alcanzó la concentración máxima y a pesar de ello no decayó la población. Debido a esta situación se optó por abandonar este tipo de prueba y en su lugar realizar pruebas crónicas para analizar la toxicidad de los materiales.

En un principio se realizó un estudio exploratorio crónico, considerando tres concentraciones diferentes, por triplicado, de los compuestos: 400 mg/L, 300 mg/L y 200 mg/L (en ausencia de alimento). Se colocaron diez organismos neonatales en 120 mL de cada concentración y se monitorearon durante un período de 20 días. Este estudio solo mostró impactos en la reproducción de los organismos y una tasa baja de defunciones. A partir de esto, se determinó el uso de 300 mg/L para pruebas posteriores.

2.2.2. Pruebas crónicas

El ensayo crónico considera doce grupos por triplicado de neonatos, de los cuales seis fueron sometidos a una concentración constante (300 mg/L) de los siguientes materiales:

- Fosfato de calcio μm .
- Fosfato de calcio dopada con Er-Yb μm .
- Hidroxiapatita μm .
- Hidroxiapatita dopada con Eu μm .
- Hidroxiapatita nm
- Hidroxiapatita dopada con Eu nm

En conjunto con una dosis mínima de alimento (5 000 células/mL, TetraVeggie™) para evitar que los neonatos eligieran el alimento sobre el material particulado. Adicionalmente, se estudiaron seis grupos más en las mismas condiciones, excepto sin alimento.

Capítulo 3

Análisis de Resultados

3.1. Estructura de los materiales

Posterior a la síntesis del material se analizó su estructura. Para ello se realizaron dos estudios cruciales, la caracterización por difracción de rayos x para determinar si se logró obtener en efecto el material propuesto y por otro lado se realizó un estudio SEM a las muestras para determinar su morfología, este estudio se realizó debido a que los polvos nanoestructurados pueden tener aplicaciones biológicas [3].

3.1.1. RDX de pirofosfato de calcio

El difractograma del pirofosfato de calcio se muestra en la figura 3.1. En esta figura se tiene el patrón de la muestra analizada y la tarjeta de difracción de polvos para el pirofosfato (PDF 33-0297). Las reflexiones más prominentes de la muestra analizada coinciden con los de la tarjeta, así como la mayor parte de ellas, es por ello por lo que podemos asegurar que se obtuvo el material propuesto. También el estudio arrojó que la muestra analizada presenta impurezas debido a que revela reflexiones que pertenecen a otras fases del material como lo es de fosfato de calcio (pdf 11-0039) e Hidroxiapatita (pdf 70-3371). Su estructura es monoclinica.

Con esta caracterización es posible calcular el tamaño del cristalito mediante La fórmula de Scherrer (ecuación 2) donde λ es la longitud de onda de la radiación $\text{CuK}\alpha$ (1,5406 Å), B es el ancho total en la mitad del máximo del pico en 2θ y θ B es el ángulo de Bragg del pico de difracción de rayos X [4].

$$T = \frac{0,9\lambda}{B\cos\theta_B} \quad (3.1)$$

Realizando los cálculos arrojan que el tamaño promedio del cristalito es de 59.4nm.

3.1.2. RDX de hidroxiapatita

En el caso de la Hidroxiapatita el patrón de difracción por rayos x se muestra en la figura 3.2, en el cual se observa que los planos de difracción se alinean perfectamente con la tarjeta PDF 70-3171 correspondiente a la Hidroxiapatita. La reflexión más fuerte está asociada con el plano 221 en conjunción con 122, la estructura es tetragonal, esta unión es muy común y depende de la metodología de síntesis, el patrón de difracción concuerda con lo reportado previamente y lo reportado por el estudio confirma que la estructura es tetragonal que cuenta con dimensiones a=b=6.684 y

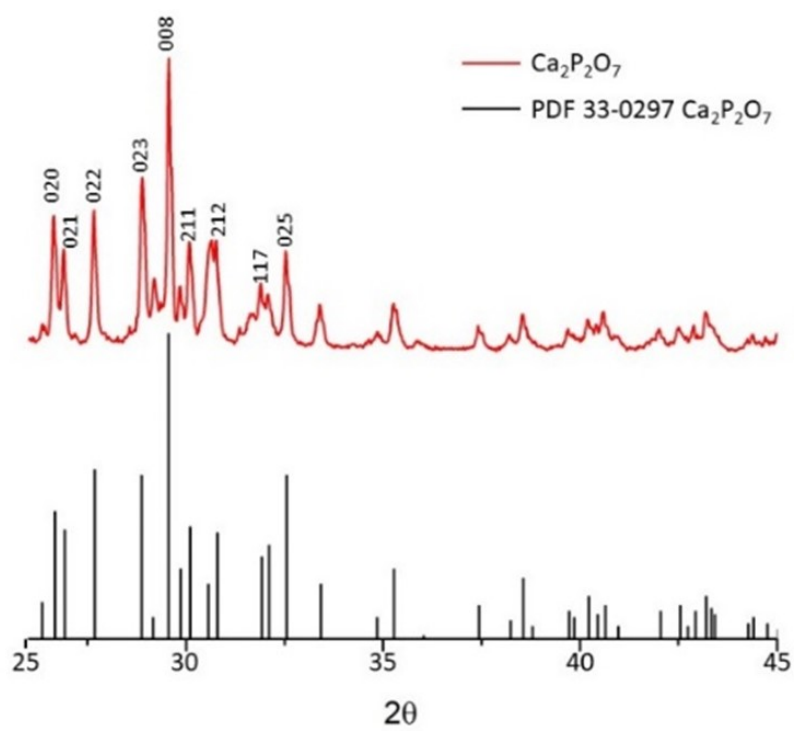


Figura 3.1: Patrón de difracción de rayos x para pirofosfato de Calcio sintetizado por evaporación de solventes.

$c=24.145$ (Cuimiao Zhang, 2009). Usando la ecuación 2 se obtiene un tamaño promedio del cristalito de 11.3nm. Este material a diferencia del anterior no presenta otras fases debido a que tuvo un control de ph a lo largo de su síntesis [36]

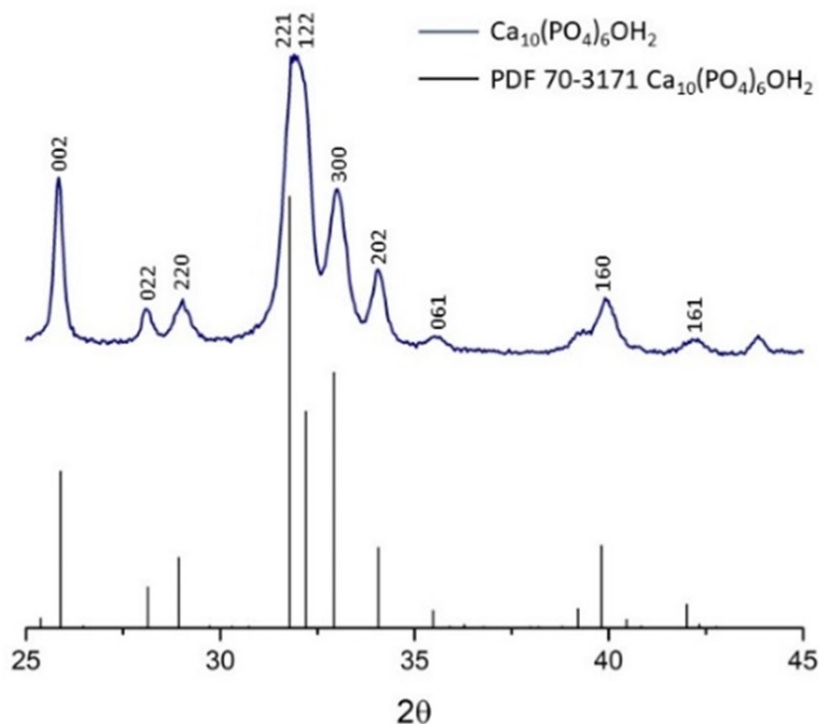


Figura 3.2: Patrón de difracción de rayos x para Hidroxiapatita sintetizada por hidrotermal.

3.1.3. SEM para pirofosfato de calcio

En las imágenes obtenidas por SEM que se muestran en la figura 3.3 se ve una aglomeración del material con forma amorfa, dichas aglomeraciones rondan en tamaños micrométricos, y se le atribuyen al método de síntesis utilizado que fue evaporación. De acuerdo a la reportado en la bibliografía las imágenes SEM coinciden en el tipo de estructura amorfa y tamaño, en ellas se explica que la aglomeración fue provocada por la temperatura que alcanzaron los precursores antes de ser sintetizados.

3.1.4. SEM para Hidroxiapatita

En las imágenes obtenidas por el SEM mostradas en la figura 3.4 se ve primordialmente laminas aglomeradas del material, si bien esto no es lo esperado se puede explicar debido a la técnica de secado usada, que fue en un horno tipo mufla a 100°, también se observan estructuras laminares de un tamaño promedio de 94.5nm, lo cual cabe dentro de los parámetros para llamarlas nano laminas, mientras que por la fórmula de Scherrer se obtiene un tamaño del cristal de 11.3 nm.

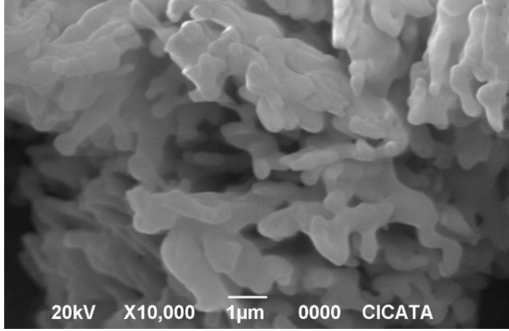


Figura 3.3: Imagen SEM de pirofosfato de Calcio.

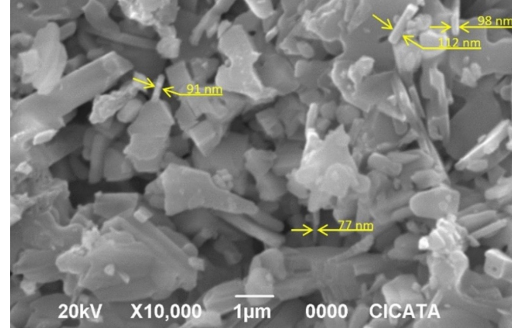


Figura 3.4: Imagen SEM para Hidroxiapatita sintetizada por hidrotermal.

Estos bastoncillos concuerdan con lo reportado en la literatura y es la morfología óptima del material [10].

3.2. Luminiscencia

3.2.1. Luminiscencia en $Ca_2P_2O_7 : Er(III) - Yb(III)$

Para el estudio de luminiscencia de los materiales sintetizados se obtuvieron sus espectros de emisión y excitación, también se analizó el porcentaje de impurificantes que proporcionara mayor intensidad debido a que este no suele ser una relación lineal.

Primero, se analizó el pirofosfato de calcio $Ca_2P_2O_7 : Er(III) - Yb(III)$, en la figura 3.5 se tienen los resultados del estudio de luminiscencia. En la figura 3.5 a se observa el espectro de emisión de fotoluminiscencia bajo una excitación continua de 980 nm, como se logra observar se tienen 3 picos de intensidad significativos, dos de ellos corresponden a la longitud de onda de 520nm (${}^2H_{11/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$) y 548nm (${}^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$) del espectro electromagnético asociados al color verde, ambos pertenecen al proceso de up-conversion. El último y más prominente pico se encuentra en la longitud de onda de 658 nm (${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$) del espectro electromagnético asociado al color rojo.

En el capítulo de desarrollo experimental se mencionó que se realizó un mapeo para encontrar el mejor porcentaje molar de dopante para maximizar la intensidad. Estos mapeos se pueden ver en las figuras 3.5 b y 3.5 c los cuales corresponden al Erblio y al Yterbio respectivamente. En estas gráficas se tiene que el 1.5 % molar para Er (III) y 4.5 % molar para el Yb (III) son los dopantes óptimos. En ambas graficas no se observa un comportamiento lineal, este comportamiento se explica debido a que a concentraciones de dopante más altas, la distancia promedio entre los iones dopantes disminuye significativamente, en consecuencia, estos iones pueden interactuar a través de un proceso eléctrico multipolar, lo que resulta en una migración de energía y una probabilidad elevada de recombinación no radiactiva, induciendo así un efecto de extinción de la concentración.

En la figura 3.5 d se muestran diversos procesos de up-conversion. El fenómeno comienza con la excitación de un electrón que parte de su estado base (${}^2F_{7/2}$) para ir a su estado excitado (${}^2F_{5/2}$) seguido de transferencia de energía a un ion Er (III) adyacente para los niveles ${}^4I_{11/2}$ o ${}^4I_{13/2}$. Después de esta transferencia pueden ocurrir dos procesos en el Yb(III), una absorción de fotones o una transferencia de energía del Yb(III) al Er(III) para el nivel ${}^4F_{7/2}$, lo cual en Er(III) se queda como una transición de (${}^4I_{11/2} \rightarrow {}^4F_{7/2}$) llamada como absorción del estado excitado (ESA por sus siglas en inglés). Er (III) puede entonces relajarse de forma no radiactiva hacia los

niveles ${}^2H_{11/2}$ and ${}^4S_{3/2}$ y radioactivamente al ${}^4I_{15/2}$ a través de emisiones de 520nm y 548 nm, respectivamente. También se presenta que desde los niveles ${}^4F_{7/2}$, ${}^2H_{11/2}$, y ${}^4S_{3/2}$ se puede generar una población del nivel ${}^4F_{9/2}$ a través de relajaciones no radioactivas, lo que da como resultado una emisión radioactiva de 658 nm desde este estado excitado al estado fundamental ${}^4I_{15/2}$. Este comportamiento se puede explicar por la contribución de un segundo proceso ESA desde ${}^4I_{13/2}$, asistido por un segundo fotón de 980 nm, hasta alcanzar el estado excitado ${}^4F_{9/2}$. (después de la relajación no radioactiva), donde se genera la emisión de 658 nm, este comportamiento ya se ha reportado en la literatura [23].

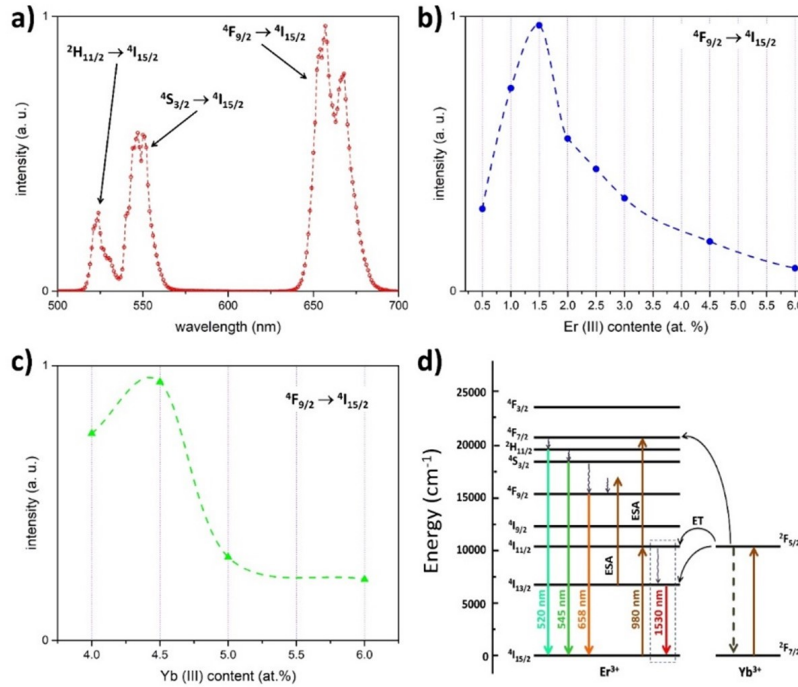


Figura 3.5: Propiedades luminiscentes de up-conversión bajo una onda excitación de 980nm del material: $Ca_2P_2O_7$ Er (III)/Yb (III).

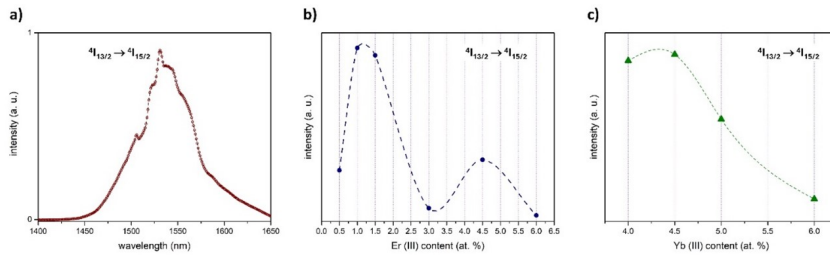


Figura 3.6: Luminiscencia del material $Ca_2P_2O_7$:Er (III)-Yb (III)

En el recuadro azul de la figura 3.5 d se muestran las interacciones de luminiscencia para el $Ca_2P_2O_7$: $Er(III)/Yb(III)$ en la región de infrarrojo. Se tienen dos posibles caminos para la

población del estado ${}^4I_{13/2}$, el primero es la excitación de un electrón desde el estado fundamental del ion Yb (III) ${}^2F_{7/2}$ al estado excitado ${}^2F_{5/2}$, seguido de la transferencia de energía a Er (III) adyacente, poblando el nivel ${}^4I_{13/2}$, el segundo es la excitación directa de un estado fundamental del Er (III) ${}^4I_{15/2}$ seguido de una relajación no radiativa a ${}^4I_{13/2}$ donde la emisión de 1530 nm se origina desde el estado excitado ${}^4I_{13/2}$ al estado fundamental Er(III) ${}^4I_{15/2}$, esto concuerda con estudios previos [78].

El espectro de emisión de $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ Er (III)/Yb (III) en la región del infrarrojo se puede ver en la figura 3.6 a, y de igual manera se tiene la transición ${}^4I_{13/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ como una función del contenido de Er (III) en la figura 3.6 b y como función del contenido de Yb (III) en la figura 3.6c.

Y en el caso de $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$: Er (III)-Yb (III), es notable que las emisiones luminiscentes se produzcan dentro de la primera y tercera ventanas biológicas a través de las transiciones ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ y ${}^4I_{13/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$, respectivamente. Por otro lado, la longitud de onda de excitación de 980 nm se alinea estrechamente con la segunda ventana biológica. Por lo tanto, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 : \text{Er(III)} - \text{Yb(III)}$ se postula como un buen candidato para aplicaciones de imágenes de fluorescencia.

3.2.2. Luminiscencia de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2 : \text{Eu(III)}$

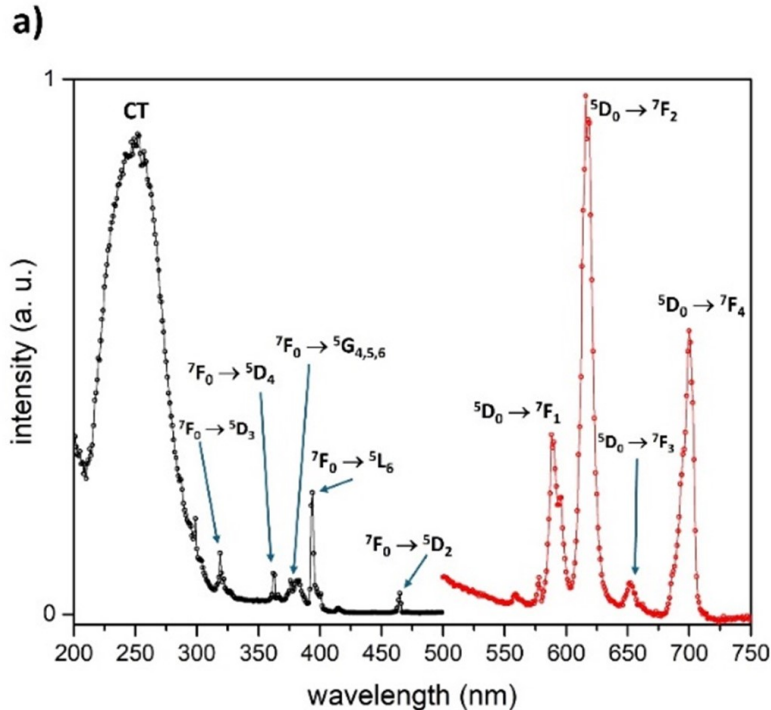


Figura 3.7: Fotoluminiscencia de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2 : \text{Eu(III)}$ en el espectro de excitación y emisión

Para la hidroxiapatita impurificada con Eu (III) se obtuvo su espectro de excitación y de emisión. El espectro de excitación se muestra en la figura 3.7 a (línea negra) se obtuvo por la

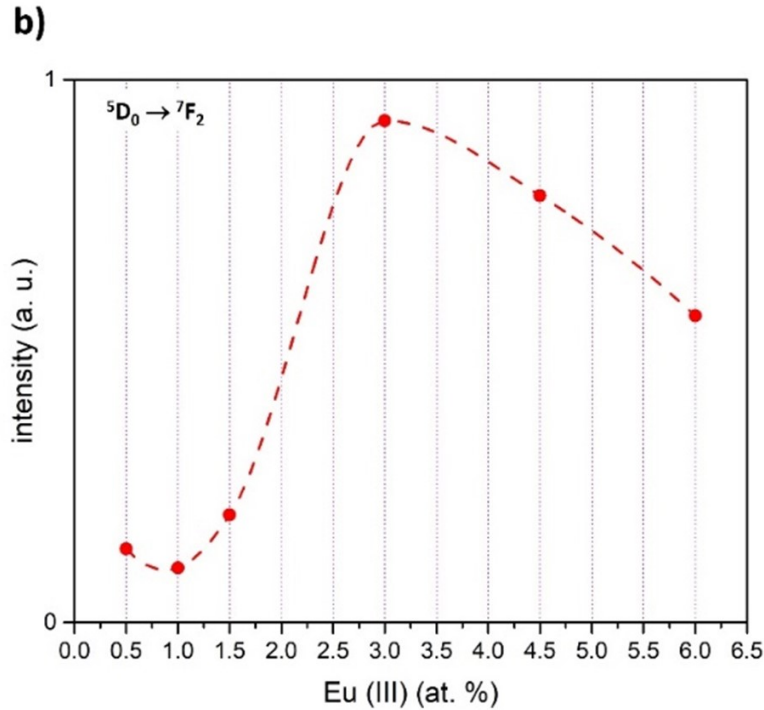


Figura 3.8: Luminiscencia de Hidropxiapatita dopada con Eu(III) como función del porcentaje de Europio..textbf

transición Eu (III) ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ a 616 nm, está compuesto por picos agudos distintos que se originan de las transiciones f-f de Eu (III) y una banda ancha centrada en 246 nm, esta banda se atribuye comúnmente a una transferencia de carga (CT) del orbital 2p de O^{2-} a un orbital 4f vacío de Eu (III) ($O^{2-}(III)$), las longitudes de onda más largas de las transiciones f-f de Eu (III) son más débiles que la banda CT y surgen de la excitación directa del estado fundamental de Eu (III) en niveles más altos dentro de la configuración, $4F^6$ estas transiciones se pueden asignar a ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_3$ (320 nm), ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_4$ (365 nm), ${}^7F_0 \rightarrow {}^5G_{4,5,6}$ (382 nm), ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_6$ (398 nm), and ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_2$ (454 nm) respectivamente.

El espectro de emisión está en la figura 3.7 (línea roja) se obtuvo bajo la excitación de una longitud de onda de 246nm y este compuesto por cuatro bandas 590 nm, 616nm, 653nm y 700nm del espectro electromagnético que corresponden a las transiciones ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1, {}^7F_2, {}^7F_3, {}^7F_4$, siendo la banda a 616 nm la más intensa, produciendo la emisión roja característica de los fósforos basados en Eu (III). Es interesante también el comportamiento de la transición ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$ (a 700 nm), comúnmente esta transición es muy débil, a veces en el nivel de ruido, sin embargo en algunos materiales esta transición es muy alta dominando el espectro de emisión y en otros casos como en el presente reporte esta emisión es más alta que la mitad de la transición ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ este comportamiento se debe a que se presentan dos o más centros de emisión diferentes en el fósforo (Tang, 2017). La intensidad de la fotoluminiscencia demuestra una correlación directa con el aumento de la concentración de dopaje de Eu (III) (ver la figura 3.8), alcanzando su pico hasta 3 at. %.

3.3. Efecto tóxico de los compuestos micrométricos y nanométricos sobre *Daphnia magna*

Parte importante del objetivo de este trabajo fue identificar la toxicidad de los materiales a base de calcio a través de un ensayo crónico que evidencia la dinámica poblacional de *D. magna*, utilizando las tasas de supervivencia y fertilidad como parámetros que describen el comportamiento poblacional. La tabla 3.1 muestra los efectos sobre estos parámetros. En términos de reproducción, se observó un retraso significativo en el primer evento reproductivo para todos los tratamientos en comparación con el grupo control

Los ensayos de toxicidad agua se efectuaron bajo lo dispuesto en la NMX-AA-087-SCFI-2010, de tal que la concentración idónea del material micrométrico y nanométrico se estableció a partir de pruebas de toxicidad aguda y crónica. El ensayo agudo se condujo en consideración a datos recabados en la literatura; no obstante, se advirtió la ausencia de una CE_{50} a las 48 horas. De lo anterior, se elaboró un estudio exploratorio crónico considerando tres diferentes concentraciones, por triplicado, de ambos materiales: 4.52 mg/ml, 2.26 mg/ml y 1.13 mg/ml (en ausencia de alimento) y cuyos resultados de mortalidad se ven en la figura 3.9.

Una particularidad de esta prueba es el hecho de que se observa la ausencia de reproducción en los organismos e impactos en el ciclo de muda. Este efecto se atribuye a la deficiencia energética; se sabe *D. magna* se alimentan por filtración, lo que les permite consumir pequeñas partículas flotantes con diámetros que van desde 1 m hasta 50 μ m. Así, esta característica de *D. magna* fue ventajosa para el diseño del presente estudio, ya que se observó la presencia de ambos materiales en los intestinos de los organismos. Por lo tanto, en ausencia de alimento, los daphnidos priorizan la limitada energía almacenada para los procesos de mantenimiento y supervivencia, mientras que omiten los procesos reproductivos. Finalmente, debido a la supervivencia, por encima del 45 % en todos los grupos, se seleccionó una concentración de 300 mg/L para el ensayo crónico posterior (a una concentración de 5.000 células/mL de *Spirulina* y levadura).

3.4. Dinámica poblacional de *Daphnia magna* bajo exposición crónica a materiales a base de calcio.

De igual forma, se evaluó la reproducción total (es decir, el número total de nacimientos en 20 días), y se observaron diferencias significativas en todos los grupos en comparación con el control y entre ellos. El menor impacto se observó en los grupos expuestos a una concentración constante de 300 mg/L de $Ca_2P_2O_7$: $Er(III) - Yb(III)$ y $Ca_2P_2O_7$, donde el número total de neonatos fue solo un 21.9% y del 16.4% menor en comparación con el grupo control; estas disminuciones coinciden con la disminución de la fertilidad observada en los ensayos. Así, el número promedio de neonatos por hembra grávida a lo largo del estudio también se redujo.

Estos efectos sobre la dinámica reproductiva están respaldados por el “Principio de Asignación”, que establece que la energía obtenida por un organismo se utiliza equitativamente para satisfacer las necesidades de mantenimiento, crecimiento y reproducción. Por lo tanto, un gasto excesivo de energía adicional en cualquiera de los requerimientos antes mencionados dará como resultado una menor energía disponible para los otros dos. Se infiere que la alteración en los procesos reproductivos es consecuencia de la energía extra invertida en el mantenimiento y supervivencia de los organismos [43].

Por otra parte, se observó una disminución en la supervivencia poblacional, alrededor del 30 %,

3.4 Dinámica poblacional de *Daphnia magna* bajo exposición crónica a materiales a base de calcio.

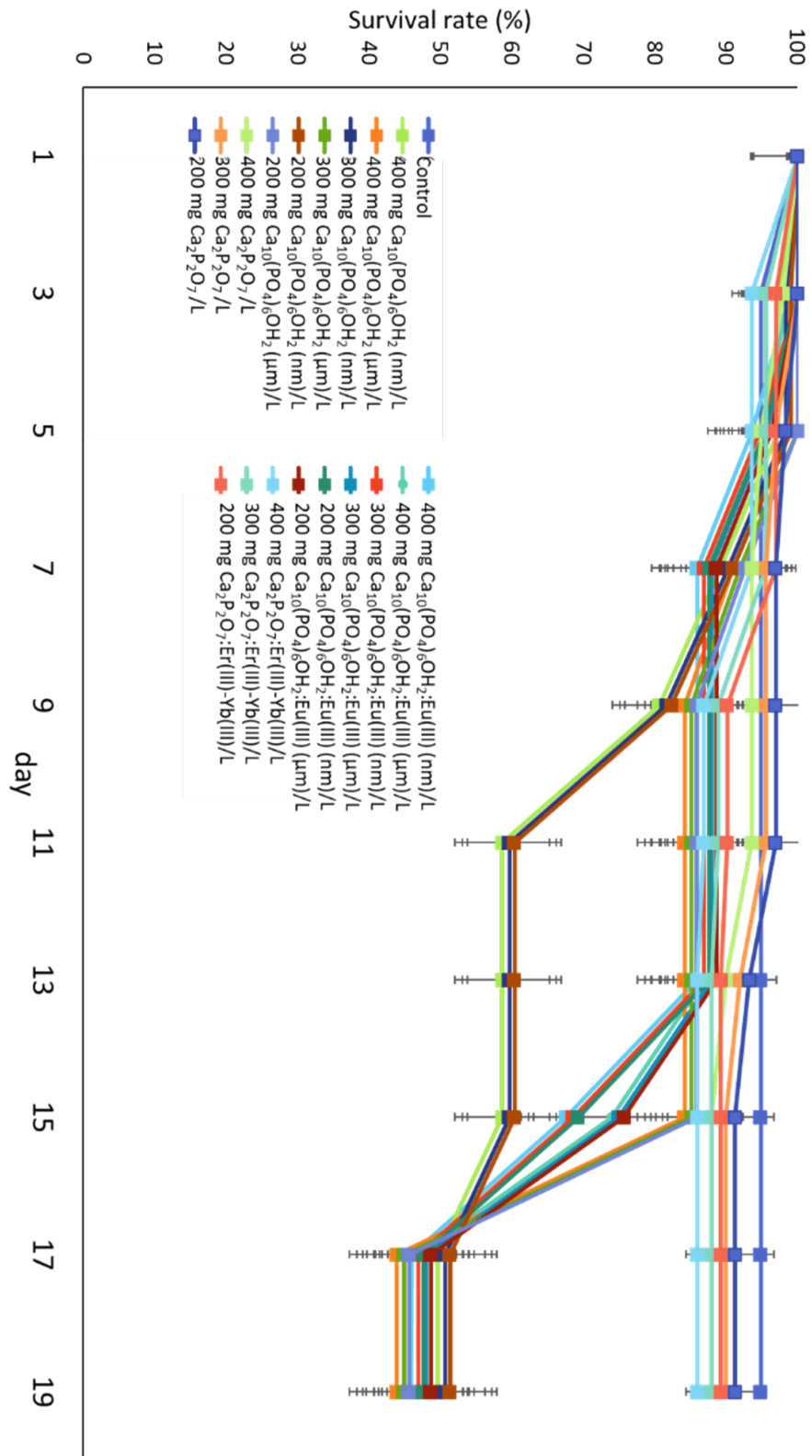


Figura 3.9: Supervivencia del Organismo *D. Magna* a lo largo del estudio agudo.

Análisis de Resultados

3.4 Dinámica poblacional de *Daphnia magna* bajo exposición crónica a materiales a base de calcio.

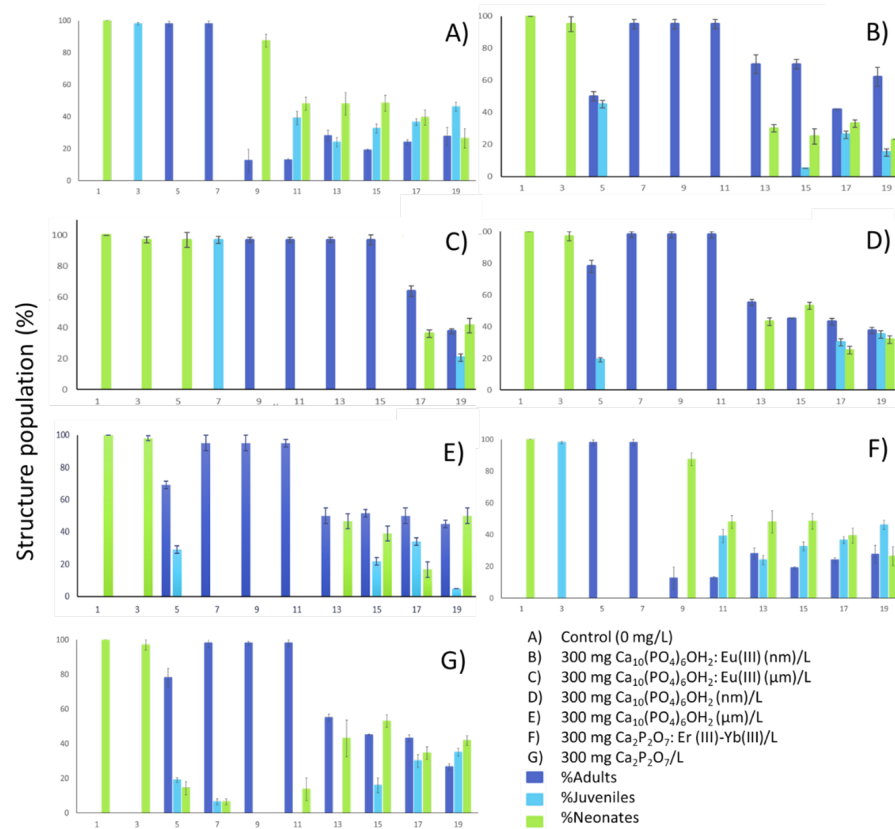


Figura 3.10: Distribución de las poblaciones de *D. magna* en tres grupos de edad tras 20 días de tratamiento (valor medio \pm desviación estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

para los grupos expuestos a $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2 : Eu(III)$ micrométrico y nanométrico en relación al control, pero no para el grupo bajo regímenes $Ca_2P_2O_7 : Er(III) - Yb(III)$ y $Ca_2P_2O_7$ donde la supervivencia fue 13% y 10% menor respectivamente, en comparación con el control. Estas observaciones son comparables a las descritas por la tasa de crecimiento poblacional finita, que presenta valores positivos indicativos de una población relativamente estable. El grupo control el que presentó el mejor valor para este parámetro, ya que la tasa de mortalidad nunca superó la tasa de natalidad [20].

De lo anterior, se puede inferir cierto efecto benéfico sobre las poblaciones tratadas con los materiales, principalmente bajo los regímenes de $Ca_2P_2O_7 : Er(III) - Yb(III)$, $Ca_2P_2O_7$ y $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$, ya que parámetros como la supervivencia y el crecimiento poblacional son comparables al grupo control, lo que indica la biocompatibilidad que presentan los daphnidos con estos materiales. Estudios recientes han demostrado que compuestos como la hidroxiapatita forman parte del exoesqueleto de los crustáceos. Asimismo, estos efectos sobre la dinámica poblacional pueden atribuirse al consumo de energía. *Daphnia magna*, como organismo que se alimenta por filtración, puede manejar cantidades variables de alimento, lo que también afecta la absorción de ciertos nutrientes como Ca y P en su metabolismo. El costo energético por la absorción de estos compuestos, a concentraciones diferentes a las reportadas en su hábitat, contribuyó a aumentar la vulnerabilidad de los daphnidos, lo que ciertamente impacta en la estructura poblacional [19].

article booktabs multirow

Parámetro	Día de maduración sexual (d)	Número total de neonatos	Neonatos por hembra grávida	Supervivencia (%)	PGR
Control	9.67 ± 0.57^a	135.28 ± 9.31^a	6.81 ± 0.22^a	95.54 ± 1.47^a	0.16 ± 0.004^a
HaP:Eu(III)	14.26 ± 4.55^a	34.66 ± 2.30^b	3.32 ± 1.18^b	73.23 ± 1.73^b	0.05 ± 0.002^b
nm					
HaP:Eu(III)	13.53 ± 5.12^b	32.66 ± 2.31^b	3.31 ± 1.03^b	71.14 ± 0.001^b	0.05 ± 0.001^b
μm					
HaP: nm	13.66 ± 1.15^b	75.33 ± 2.51^c	4.00 ± 0.09^b	85.15 ± 3.09^c	0.06 ± 0.005^b
HaP μm	13.66 ± 1.14^b	77.33 ± 1.52^c	4.53 ± 0.76^b	81.35 ± 2.22^d	0.05 ± 0.003^b
Ca ₈ P ₂ O ₇ : Er/Yb	13.00 ± 0.00^b	105.66 ± 19.52^d	3.80 ± 0.52^b	82.91 ± 4.14^c	0.07 ± 0.005^b
Ca ₈ P ₂ O ₇	11.33 ± 0.57^a	112.78 ± 4.31^d	3.95 ± 1.03^b	91.85 ± 4.88^c	0.07 ± 0.001^b

Tabla 3.1: Tabla con parámetros evaluados en diferentes tratamientos.

La figura 3.10 ofrece una visión general de los cambios en el porcentaje de neonatos, juveniles y adultos a lo largo del estudio. Se espera que una población estable esté compuesta mayoritariamente por organismos neonatos y juveniles que aseguren una reproducción continua. Asimismo, se acentúan las diferencias significativas entre los grupos y el control; además, se observa una recuperación a partir del día 15 para los tratamientos antes mencionados, con indicios de una estructura poblacional estable mediante la introducción de neonatos y juveniles a la población. Este efecto es menos notorio en los grupos tratados con $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2 : Eu(III)$.

A la postre, los materiales sintetizados en esta investigación: $Ca_2P_2O_7$, con tamaño promedio de partícula de 59.4 nm e hidroxiapatita, con un tamaño promedio del cristal de 11.3 nm, tienden a aglomerarse y, por lo tanto, y por lo tanto, a crear partículas de mayor tamaño que pueden verse en el SEM. En este estudio se obtuvieron partículas micrométricas y de 94.5nm para el piro fosfato de calcio y la hidroxiapatita respectivamente.

En el caso de la luminiscencia, resalta la característica de $Ca_2P_2O_7Er(III)Yb(III)$ que, al ser excitado en el infrarrojo, emite dentro de las ventanas biológicas I y III, lo que permite perfilarlo como un buen biomarcador. Para la hidroxiapatita impurificada con Eu (III) su emisión se alinea con la primera ventana biológica, solo que al ser excitada con luz ultravioleta no es viable como biomarcador y solo se procede a usarlo para explorar su distribución en *D. magna*.

Los efectos de consumo en *D. magna* resultaron viables para la vida, debido a que en las pruebas crónicas exploratorias la supervivencia estuvo por encima del 45 % con todos los materiales creados, aun con ausencia de comida. En un segundo estudio crónico, donde además de analizarse la tasa de supervivencia, se estudió su capacidad de reproducción con la edad de maduración sexual y cantidad de neonatos. En este segundo estudio, se observó que, $Ca_2P_2O_7 : Er(III)Yb(III)$ y $Ca_2P_2O_7$, son los materiales con menor tasa de mortalidad y reproducción favorable [19].

Conclusión

3.5. Conclusiones generales

Recapitulando, se tenía como objetivo principal la elaboración de un fosforo a base de Calcio que pudiera ser usado como biomarcador con excitación en el infrarrojo. El fosforo creado fue pirofosfato de Calcio dopado con Er(III) e Yb(III) el cual efectivamente tiene excitación en el infrarrojo y emisión en el espectro visible, de manera más específica, dentro de las ventanas biológicas. También a fin de estudiar sus efectos secundarios y comprender la propagación del material en el organismo D. magna se realizaron bioensayos de eco-toxicidad tanto aguda como crónica lo que permitió evaluar que el compuesto creado para este fin no tiene toxicidad aguda.

Por otra parte, también se propuso obtener los porcentajes óptimos de dopante óptimo de Er (III) e Yb (III) para el fosfato de calcio con el objetivo de obtener la mayor intensidad de luminiscencia posible para el material. Estos porcentajes fueron expuestos en la parte experimental y son el 1.5 % molar para Er (III) y 4.5 % molar para el Yb (III).

De manera análoga también se buscó el porcentaje de dopante optimo para las nano-láminas de Hidroxiapatita el cual fue al 3 % molar como se tenía reportado en la literatura.

Las dos síntesis que se llevaron a cabo, evaporación e hidrotermal, dieron resultados congruentes en su morfología y tamaño de las partículas lo cual se observó en el análisis SEM. También se obtuvieron los materiales propuestos y se logró corroborar esta información con la caracterización de RDX. En conjunto se logro de esta manera uno de los objetivos propuestos.

Para la parte de toxicidad se tuvieron que realizar dos pruebas, en la primera que fue la aguda y no se logro encontrar un CE_{50} y por tal motivo se procede a realizar una prueba crónica. En esta prueba se logro determinar que los compuestos de pirofosfato de calcio tenían resultados de supervivencia y reproducción similares al grupo control, mientras que los compuestos a base de Hidroxiapatita tenían mayor porcentaje de mortalidad, y menor reproducción. Estos resultados indicaron que el pirofosfato de Calcio es menos toxico a diferencia de Hidroxiapatita.

Por último, su propagación de hidroxiapatita dopado con Eu(III) dentro del organismo D. magna fue explorado y se corrobora que se distribuye en el extracto digestivo y demás organelos.

En conclusión, los objetivos previstos que se tenían para este trabajo de tesis fueron alcanzados, sin embargo durante la investigación surgieron más dudas y propuestas que se dejan como trabajo a futuro.

3.6. Trabajo a futuro

La investigación se fundamentó bajo la socaba de realizar un biomarcador de células cancerígenas. Hasta el momento se logró crear y caracterizar el material, así mismo, se corroboró la nula toxicidad para *D. magna*, como modelo de estudio. En este sentido, como perspectiva a futuro, se propone continuar con la investigación en pos de las siguientes propuestas:

- Funcionalizar el material $Ca_2P_2O_7$.
- Obtener RDX de pirofosfato de Calcio e Hidroxiapatita una vez que ya se hayan dopado.
- Obtener SEM del pirofosfato de Calcio e Hidroxiapatita una vez que ya se hayan dopado.
- Explorar el comportamiento de $Ca_2P_2O_7$ dentro de células de distintos órganos del cuerpo humano.
- Explorar efectos de consumo de $Ca_2P_2O_7$ post exposición a radiación en el organismo *D. magna* debido a su alta resistencia al material.

Apéndice A

Publicaciones

Artículo enviado a Environmental Toxicology and Chemistry el 22 de septiembre de 2024. Esta bajo revisión.

Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales, A.C., awards the present

CERTIFICATE TO:

Guadalupe Genoveva Méndez Ramos, Salvador Carmona Téllez

For the participation in the XVI International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum, with the poster:

55-Synthesis of hydroxyapatite enriched with Er (III) and Yb (III) ions focused on detection in organic media.

The present certificate is issued on September 29th, 2023.



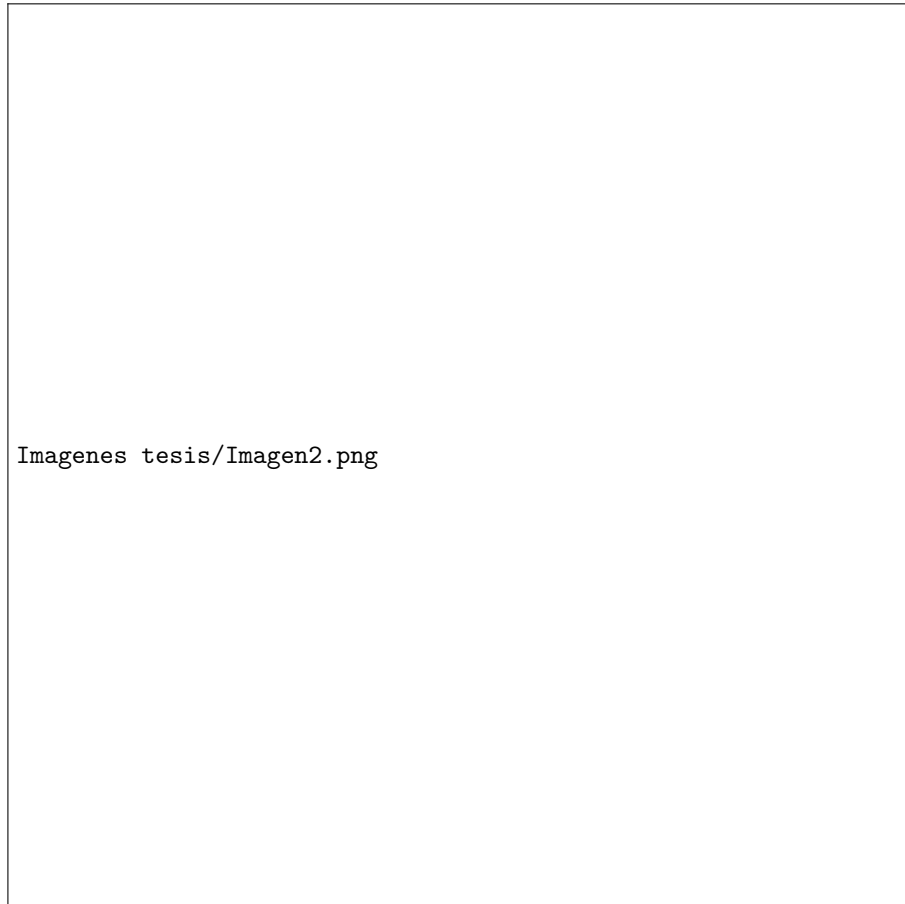
Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales A.C.

Cristo Manuel Yee Rendón
President SMCTSM



Apéndice B

Contribuciones a congresos



Apéndice C

Glosario

D. magna (*Daphnia magna*): Especie de crustáceo plantónico, se le conoce como pulga de agua.

Neonatos: Daphnias entre 0 y 24 horas d vida.

Hembra grávida: Hembra con huevos de una reproducción asexual.

Efipio: Huevo producido por reproducción sexual.

Bioensayo: Experimento que estudia cómo afecta una sustancia a un organismo vivo.

Toxicidad aguda: Reacción adversa que produce un material o sustancia en un organismo tras su exposición a corto plazo.

Toxicidad crónica: Reacción adversa que produce un material o sustancia en un organismo tras su exposición a largo plazo.

Biomarcador: Sustancias que indican un estado biológico, debe ser específico, sensible, predictivo, rápido y económico.

Bibliografía

- [1] Angelika Tkaczyk, A. B. (2021). *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A Review. *Science of the Total Environment*, 1-18.
- [2] Atkins, S. &. (2004). *Química Inorgánica*. Mc Graw Hill.
- [3] B. C. Costa, E. A.-F. (2018). ZnO Nanoparticles with Different Sizes and Morphologies for Medical Implant Coatings: Synthesis and Cytotoxicity. *BioNanoScience*, 587–595.
- [4] B.D. Cullit, S. S. (2001). *Elements of X-Ray Diffraction*. New Jersey: Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs.
- [5] BARAN, E. J. (2007). La Nueva Farmacoterapia Inorgánica. *XVIII Latin American Journal of Pharmacy*, 626-634.
- [6] Bian, J. J. (2003). Microwave dielectric properties of $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$. *Journal of the European Ceramic Society*, 23(14), 2589-2592.
- [7] Branca, C. M. (2002). Hydration study of PEG/water mixtures by quasi elastic light scattering, acoustic and rheological measurements. *The Journal of Physical Chemistry B*, 10272-1027.
- [8] Brouwer, P. (2010). *Theory of XRF*. Almelo: PANalytical B. V.
- [9] Coello Diaz, H. A. (2022). Rehabilitación oral mínimamente invasiva en paciente de 3 años con síndrome colestásico. Lima: Universidad Federal Federico Villareal.
- [10] Cuimiao Zhang, J. Y. (2009). Hydroxyapatite Nano- and Microcrystals with Multiformal Morphologies: Controllable Synthesis and Luminescence Properties. *Crystal Growth & Design*, 2725–27.
- [11] Daniel H. Weingarten, I. M. (2017). Experimental demonstration of photon upconversion via cooperative energy pooling. *Nat Commun*.
- [12] Diana Griesiute, E. G. (2022). Synthesis, structural and luminescent properties of Mn doped calcium pyrophosphate ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) polymorphs. *Scientific Reports*, 12:7116.
- [13] ESTEBAN, A. M. (1992). CARACTERIZACION POR DIFRACCION DE RAYOS X DE ETEROESTRUCTURAS DE SEMICONDUCTORES 111-Y. Madrid, España: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.
- [14] Fernigrini, P. C. (2008). SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS APATITAS. SU UTILIZACION COMO BIOMATERIAL. Asociación Argentina de Materiales.
- [15] GARCIA, C. P. (2006). Estudio de algunos parámetros que determinan la síntesis de hidroxiapatita por la ruta de precipitación. *Dyna*, 9-15.
- [16] Gomez, R. C. (2004). Luminiscencia en polímeros conductores. *Ingenierías*.

- [17] Guzmán, L. (2014). Obtención y caracterización óptica y estructural de polvos luminiscentes de $Tm^{3+}: Y_2O_3$. Mexico DF: CICATA-IPN.
- [18] Hao Dong, L.-D. S.-H. (2013). Basic Understanding of the Lanthanide Related Upconversion Emissions. *Nanoscale*, 5703-5714.
- [19] He X. J., W. W. (2009). Calcium balance in *Daphnia* grown on diets differing in food quantity, phosphorus and calcium. *Freshwater Biology*, 54, 2200-2211.
- [20] Heckmann L. H., C. A. (2007). Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamic. *Toxicology Letters*, 172, 137-145.
- [21] Heckmann L. H., C. A. (2007). Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology Letters*, 137-145.
- [22] HIGUERA VALENZUELA, H. J. (2019). Síntesis de nanopartículas de silicio para la fabricación de recubrimientos en celdas solares. Sonora: Universidad de Sonora.
- [23] Hoang Nhu Van, T. L.-H.-H. (2021). On enhancement and control of green emission of rare earth co-doped hydroxyapatite nanoparticles: synthesis and upconversion luminescence properties. *New Journal of Chemistry*, 751-760.
- [24] Hobaek, A. (1990). Sex determination in *Daphnia magna*. *Ecology*, 71(6), 2255-2268. *Ecology*, 71(6), 2255-2268.
- [25] Shiuli Pujari-Palmer, S. C. (2016). In vivo and in vitro evaluation of hydroxyapatite nanoparticle morphology on the acute inflammatory response. *Biomaterials*, 1-11.
- [26] Itriago, L., Silva, N., Cortes, G. (2013). Cancer en Chile y el mundo: Una mirada epidemiológica, presente y futuro. *Revista Médica Clínica Las Condes*.
- [27] J. Zhou, Q. L. (2015). Upconversion Luminescent Materials: Advances and Applications. *Chemical reviews*, 395-465.
- [28] J Zhou, Z. L. (2012). Upconversion nanophosphors for small-animal imaging. *Chemical Society Reviews*, 1323-1349.
- [29] Jiménez, J. A. (2019). LA CONTRACCIÓN LANTÁNIDA. *Naturaleza y Tecnología*, 15-20.
- [30] Jing Liu a, G. C. (2017). Sub-6 nm monodisperse hexagonal core/shell $NaGdF_4$ nanocrystals with enhanced upconversion photoluminescence. *Nanoscale*, 91-98.
- [31] Kittel, C. (2005). *Introduction to Solid State Physics*. California, United State of America: John Wiley Sons, Inc.
- [32] Kuleshov, N. V. (1997). CW laser performance of Yb and Er, Yb doped tungstates. *Applied Physics B*, 64, 409-413.
- [33] Lin, F. H. (2005). The effects of $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ addition on the mechanical properties of sintered $Ca_2P_2O_7$ bioceramics. *Mater. Chem. Phys*, 110-116.
- [34] LIU, C. (2001). Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11. *Biomaterials*, 301-306.
- [35] Londoño, M. E. (2006). Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. *IEA*, 109-118.
- [36] Manso, M. M.-D. (2002). Aerosol-gel-derived microcrystalline hydroxyapatite coatings. *Journal of materials research*, 17(6), 1482-1489.

- [37] Martínez-Valencia, A. B.-P.-L. (2008). Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis. . *Superficies y vacío*, 18-21.
- [38] McMurry, J. (2012). *Química organica*. Estados Unidos: Cengage Learning.
- [39] Mohammed, A. . (2018). Scanning electron microscopy (SEM): A review. In *Proceedings of the 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatic*. 7-9.
- [40] NMX-AA-087-SCFI-2010, N. M. (2010). ANÁLISIS DE AGUA - EVALUACIÓN DE TOXICIDAD . México: Secretaria de economía.
- [41] Patiño, M. R. (2019). Z= 63, europio, Eu. El metal que inmortaliza al viejo continente. *Anales de Química de la RSEQ*, 115(2), 125-125.
- [42] Pelant, I. . (2012). *Luminescence spectroscopy of semiconductors*. OUP Oxford.
- [43] Pestana J. L., L. S. (2010). Pesticide exposure and inducible antipredator responses in the zooplankton grazer, *Daphnia magna* Straus. *Chemosphere*, 241-248.
- [44] Puche, R. S. (2000). Tierras raras: Materiales avanzados . *Anales de la real sociedad española de química*, 11-26.
- [45] R. Saez Puche, C. C. (2000). Tierras raras: materiales avanzados. *Anales de la real sociedad española de química*, 11-26.
- [46] Rabes, B. d. (2016). *Nanomaterials for bioimaging and therapy in the infrared*. Madrid, España: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.
- [47] Ranby, P. W. (1955). *Brit. J. Appl. Phys*, 18–25.
- [48] Renau-Piqueras, J. . (1994). *Principios básicos del microscopio electrónico de barrido*. Valencia: Sección de Microscopía Electrónica. Centro de Investigación. Hospital "La Fé".
- [49] Reyes-Gasga, M. V.-G. (2006). LA HIDROXIAPATITA, SU IMPORTANCIA EN LOS TEJIDOS. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 90-95.
- [50] Rodríguez, e. c. (2019). ¿El elemento de las comunicaciones cuánticas del futuro? *Anales de la química*, 115-130.
- [51] Londoño, M. E. (2006). Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. *IEA*, 109-118.
- [52] Manso, M. M.-D. (2002). Aerosol-gel-derived microcrystalline hydroxyapatite coatings. *Journal of materials research*, 17(6), 1482-1489.
- [53] Martínez-Valencia, A. B.-P.-L. (2008). Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis. . *Superficies y vacío*, 18-21.
- [54] McMurry, J. (2012). *Química organica*. Estados Unidos: Cengage Learning.
- [55] Mohammed, A. . (2018). Scanning electron microscopy (SEM): A review. In *Proceedings of the 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatic*. 7-9.
- [56] NMX-AA-087-SCFI-2010, N. M. (2010). ANÁLISIS DE AGUA - EVALUACIÓN DE TOXICIDAD . México: Secretaria de economía.

- [57] Patiño, M. R. (2019). Z= 63, europio, Eu. El metal que inmortaliza al viejo continente. *Anales de Química de la RSEQ*, 115(2), 125-125.
- [58] Pelant, I. . (2012). *Luminescence spectroscopy of semiconductors*. OUP Oxford.
- [59] Pestana J. L., L. S. (2010). Pesticide exposure and inducible antipredator responses in the zooplankton grazer, *Daphnia magna* Straus. *Chemosphere*, 241-248.
- [60] Puche, R. S. (2000). Tierras raras: Materiales avanzados . *Anales de la real sociedad española de química*, 11-26.
- [61] R. Saez Puche, C. C. (2000). Tierras raras: materiales avanzados. *Anales de la real sociedad española de química*, 11-26.
- [62] Rabes, B. d. (2016). *Nanomaterials for bioimaging and therapy in the infrared*. Madrid, España: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.
- [63] Ranby, P. W. (1955). *Brit. J. Appl. Phys*, 18-264
- [64] Renau-Piqueras, J. . (1994). *Principios básicos del microscopio electrónico de barrido*. Valencia: Sección de Microscopía Electrónica. Centro de Investigación. Hospital "La Fé".
- [65] Reyes-Gasga, M. V.-G. (2006). LA HIDROXIAPATITA, SU IMPORTANCIA EN LOS TEJIDOS. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 90-95.
- [66] Reyes-Gasga, M. V.-G. (2006). LA HIDROXIAPATITA, SU IMPORTANCIA EN LOS TEJIDOS MINERALIZADOS Y SU APLICACIÓN BIOMÉDICA. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológica*, 90-95.
- [67] Roman L, J. C. (2015). Thermoluminescence of cerium and terbium-doped calcium pyrophosphate.
- [68] Rop, R. (2004). *Luminescence and the solid state*. Studies in Inorganic Chemistry 21. New York: El Servier.
- [69] Sánchez, P. L. (2022). FLUORIMETRÍA DE OXISULFUROS DOPADOS CON Pr³⁺. España: universidad de cantabria.
- [70] Sanjuán, M. A. (2019). Cementos fotoluminiscentes. *Afinidad*.
- [71] Shiuli Pujari-Palmer, S. C. (2016). *n vivo and in vitro evaluation of hydroxyapatite nanoparticle morphology on the acute inflammatory response*. *Biomaterials*, 1-11.
- [72] Shuqing He, J. S. (2018). Crucial breakthrough of second near-infrared biological window fluorophores: design and synthesis toward multimodal imaging and theranostics, . *Chemical Society Reviews*, 4258-4278.
- [73] Solé, J. B. (2005). *An introduction to the optical spectroscopy of inorganic solids*. John wiley Sons.
- [74] Soriano Romero, O. (2015). Obtención y caracterización espectroscópica de un compuesto de cobre. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/9574>.
- [75] Tang, H. Y. (2017). A novel red-emitting Eu³⁺-doped Na₂MgSiO₄ phosphor with high intensity of 5D₀→ 7F₄ transition. *Journal of Alloys and Compounds*, 714,, 263-269.
- [76] Tkaczyk, A. B. (2021). *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. . *Science of the Total Environment*, 143038.
-

- [77] Zeb Barber, C. H. (2007). Lattice-based optical clock using an even isotope of Yb. Barber, Z. W., Hoyt, C. W., Stalnaker, J. E., Lemke, N., Oates, C. W., Fortier, T. M., ... Hollberg, L.(2007, SIIn Time and Frequency Metrology Vol. 6673,. SPIE., 117-125.
- [78] Zhong, Q. W. (2006). Novel stoichiometrically erbium ytterbium cocrystalline complex exhibiting enhanced near-infrared luminescence. *Inorganic chemistry*, 45(11), , 4537-4543.
- [79] RT, D. Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in *Daphnia*. National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, 2005.OCLC: 705948796.