



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

Nanocatalizadores basados en cobre y hierro: síntesis y evaluación como enzimas artificiales en condiciones de interés para terapia contra el cáncer

Copper-Iron oxide based nanocatalysts: Synthesis and performance as enzyme-like surrogates of potential interest for cancer therapy

Autora

Inés Lanz Andrés

Directores

Javier Bonet Aletá

José Luis Hueso Martos

Ponente

Jesús Santamaría Ramiro

Grado en Ingeniería Química

ESCUELA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

2022

## RESUMEN

Actualmente, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Se pronostica, que para el año 2040 habrá un total de 28.4 millones de casos de cáncer, dato muy superior a los 19.3 millones diagnosticados durante el año 2020.

Según la Organización Mundial de la Salud, uno de cada dos hombres y una de cada tres mujeres sufrirán cáncer a lo largo de su vida.

Existen una serie de terapias en el ámbito oncológico que intentan frenarlo o eliminarlo por completo, como son la cirugía, la quimioterapia o la radioterapia, muy conocidas actualmente, al igual que también lo son los efectos secundarios que producen.

Por otro lado, existen nuevas vías en desarrollo como la Nanotecnología. Desde el comienzo del s. XXI se han desarrollado nuevas herramientas y terapias basadas en nanomateriales a partir del estudio e investigación del microambiente tumoral.

El objetivo principal de este trabajo es la síntesis de nanocatalizadores basados en cobre y hierro, así como la evaluación de su respuesta catalítica en las condiciones químicas en las que se encuentran una gran variedad de tumores sólidos. El estudio de la respuesta catalítica se ha llevado a cabo empleando la reacción de oxidación de la molécula de TMB en presencia de peróxido de hidrógeno,  $H_2O_2$ , una molécula encontrada en concentraciones relativamente altas en el microambiente tumoral.

Los catalizadores sintetizados en este trabajo están basados en Cu y Fe, pero dispuestos de distintas maneras. En concreto, se han sintetizado nanopartículas de óxidos mixtos ( $CuFe_2O_4$ ), sulfuros mixtos ( $CuFeS_2$ ), hexacianoferratos mixtos ( $Cu_2Fe(CN)_6$ ) y nanopartículas poliméricas con centros atómicos de Cu y Fe. El fin último de este trabajo es encontrar el catalizador de Cu y Fe cuyas propiedades catalíticas sean más óptimas en las condiciones del microambiente tumoral.

Todos los catalizadores han mostrado un comportamiento catalítico análogo al de una enzima, por lo que ha sido posible obtener parámetros catalíticos típicos de enzimas naturales (Velocidad máxima de reacción,  $V_{Max}$ ; constante de Michaelis-Menten,  $K_M$  y constante catalítica  $k_{cat}$ ) a partir del ajuste de los datos experimentales a las funciones de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk.

Ello ha permitido realizar una comparación exhaustiva de todos los catalizadores en función de la disposición y composición de los centros de Cu y Fe. Este trabajo puede servir de referencia para realizar este tipo de estudios catalíticos sistemáticos con el fin último de aportar nuevo conocimiento sobre el comportamiento de nanocatalizadores heterogéneos en condiciones del microambiente tumoral.

## Índice.

1. INTRODUCCIÓN. ....	5
1.1 El cáncer en la actualidad.....	5
1.1.1 Definición, terapias y limitaciones.....	5
1.1.2 Características principales del microambiente tumoral.....	6
1.2 Descripción del estado del arte del uso de NPs como catalizadores Fenton en el entorno tumoral. ....	7
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO. ....	8
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	10
3.1. Reactivos.....	10
3.2. Síntesis de nanopartículas basadas en cobre y hierro.....	10
3.2.1. Síntesis de nanopartículas de hexacianoferrato de cobre ( $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ , CuFeMOF).10	
3.2.2. Síntesis de nanopartículas de óxido de Cu y Fe ( $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ , $\text{CuFeO}_x$ ).....	11
3.2.3. Síntesis de nanopartículas de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ , CuFeS). ....	11
3.2.4. Síntesis de nanopartículas de polidopamina con Cu y Fe (CuFe-PDA).....	11
3.3. Estudio de la respuesta catalítica.....	12
3.3.1. Reacción estudiada.....	12
3.3.2 Procedimiento experimental.....	12
3.3.3. Determinación de la velocidad inicial de reacción, $V_0$ .....	13
3.3.4. Ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk.....	13
3.3.5 Obtención de la constante catalítica, $k_{\text{cat}}$ .....	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1. Caracterización de los catalizadores basados en Cu-Fe.....	14
4.1.1. Caracterización del catalizador $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ .....	14
4.1.2. Caracterización del catalizador $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ . ....	17
4.1.3. Caracterización del catalizador CuFeS.....	18
4.1.4. Caracterización del catalizador CuFe-PDA.....	21
4.2. Actividad catalítica de los catalizadores basados en Cu-Fe.....	22
4.2.1. Respuesta catalítica de las nanopartículas de $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ .....	22
4.2.2. Respuesta catalítica de las nanopartículas $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ .....	23
4.2.3. Respuesta catalítica de las nanopartículas $\text{CuFeS}_2$ .....	24
4.2.4. Respuesta catalítica de las nanopartículas CuFe - PDA.....	24
4.2.3. Ajuste de los resultados experimentales a la función Michaelis-Menten.....	25
4.2.4. Obtención de $V_{\text{Max}}$ y $K_M$ mediante la ecuación de Lineweaver-Burk. ....	26
4.2.4 Cálculo de la constante catalítica, $k_{\text{cat}}$ . ....	29
5. CONCLUSIONES. ....	30
Bibliografía.....	31
6. ANEXOS.....	33
6.1. Caracterización. Equipos utilizados y preparación de muestra.....	33

6.1.1	Caracterización mediante espectroscopía de emisión atómica de plasma de microondas (Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy, MP-AES).....	33
6.1.2	Caracterización mediante microscopia de transmisión electrónica (Transmission Electron Microscopy, TEM). .....	33
6.3.3.	Caracterización estructural por difracción de rayos X (X-ray diffraction, XRD). ....	33
6.3.4	Caracterización por espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR). .....	34

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1 El cáncer en la actualidad.

### 1.1.1 Definición, terapias y limitaciones.

El cáncer constituye una de las principales causas de mortalidad en el mundo y actualmente es considerada como la segunda causa de muerte en España (1). La aparición de este tipo de enfermedad es más habitual a partir de los 65 años, tanto en hombres como en mujeres.

De manera natural, un organismo está constituido por un gran número de células, las cuales envejecen, se inactivan y mueren, siendo reemplazadas mediante el proceso de división celular dando lugar a otras nuevas (2). Las células cancerígenas pierden la capacidad para inactivarse y comienzan a dividirse de forma masiva e incontrolada, generando tal número de células que acaban formando masas, denominadas tumores benignos o neoplasias.

Si esta masa acaba adquiriendo la capacidad para invadir otros tejidos, recibe el nombre de tumor maligno, el cuál puede derivar en la conocida metástasis si viaja a zonas del organismo que se encuentran más alejadas de su origen. (3)

Refiriéndonos a la mortalidad originada por esta enfermedad, se podrían evitar entre el 30 y el 50% de estas muertes mediante una detección temprana, lo que su vez provocaría una mayor probabilidad de éxito en la aplicación de tratamientos (4) - (5). Ello junto al desarrollo de terapias más efectivas y selectivas, no sólo conseguiría lograr una mayor eficiencia terapéutica, sino también reducir los efectos secundarios provocados por las terapias aplicadas actualmente.

En el S XX la terapia más utilizada era la cirugía, la cual ha evolucionado mucho y ha llegado a ser mínimamente invasivo ante el paciente. Hoy en día, la radioterapia y la quimioterapia son las terapias más utilizadas para tratar esta enfermedad. No obstante, estas terapias poseen limitaciones las que incluyen (i) elevado daño a células sanas (especialmente en el caso de la quimioterapia) y (ii) resistencia por parte de las células cancerígenas a estos tratamientos. (1) Debido a investigaciones basadas en el microambiente tumoral, se han desarrollado una serie de terapias que ya se encuentran en funcionamiento, pero con diversas limitaciones, como la inmunoterapia, la terapia hormonal, el trasplante de células madre, la terapia génica y diversas terapias personalizadas, resumidas en la Figura 1.

Sin embargo, siguen existiendo limitaciones como por ejemplo la baja focalización en el caso de la terapia mediante células madre o la inmunoterapia en el caso de la (6). Ello hace que las terapias más utilizadas sigan siendo la quimioterapia y la radioterapia, aun con todos los impedimentos que potencialmente presentan. De este punto surge la necesidad de seguir investigando en terapias alternativas. En el grupo de investigación donde se ha realizado el presente Trabajo de Fin de Grado se desarrollan nanomateriales con propiedades catalíticas para llevar a cabo reacciones químicas de manera selectiva en células tumorales. Este nuevo tipo de terapia en desarrollo se conoce como terapia quimiodinámica (*ChemoDynamic Therapy*, CDT) y basa su eficacia en las diferencias químicas que presentan las células cancerígenas en su microambiente tumoral, en comparación con las células sanas, descritas en el siguiente apartado.

Por todo esto y más, una de las metas en los objetivos de desarrollo sostenible (ODS), denominado “Salud y Bienestar”, está enfocado en reducir en al menos un tercio de la mortalidad prematura por ese tipo de enfermedades.

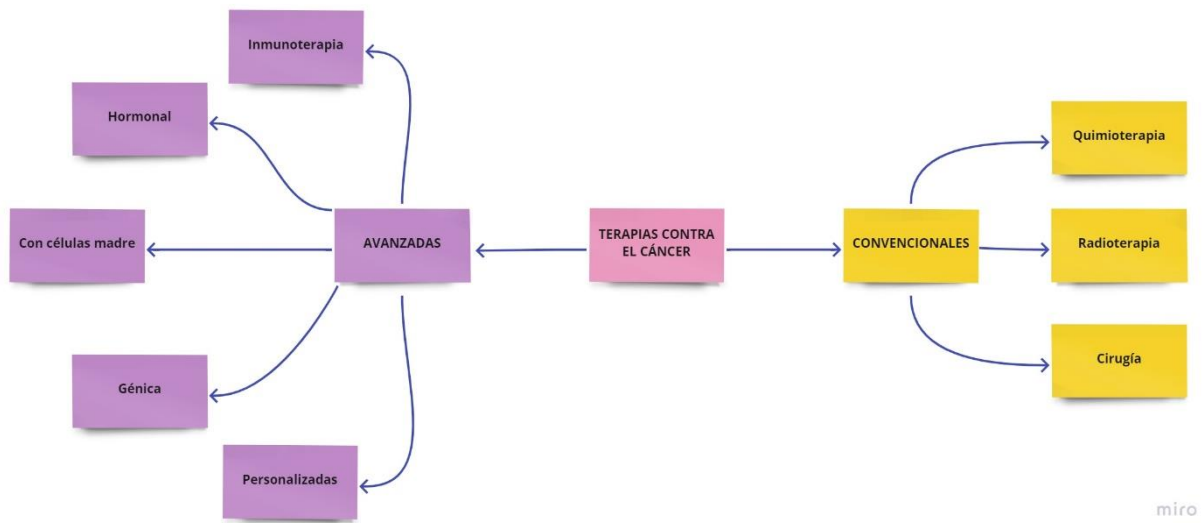
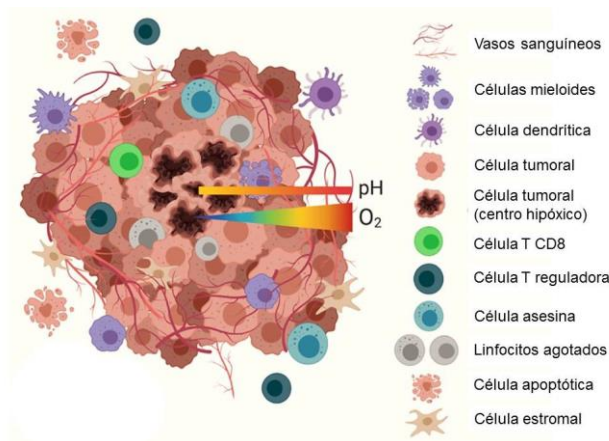


Figura 1: Esquema-resumen de las principales terapias contra el cáncer.

### 1.1.2 Características principales del microambiente tumoral.

El microambiente tumoral (en inglés *Tumor MicroEnvironment*, *TME*) se define como el conjunto de células, vasos sanguíneos, diferentes moléculas o sustancias acumuladas pasivamente en un tumor, junto con una matriz extracelular que actúa como soporte (Figura 2). Este microambiente influye en la evolución del tumor, por ejemplo, provocando que éste desarrolle resistencia a agentes terapéuticos, remitiendo o llegando a la metástasis. De hecho, ciertas áreas de los microambientes celulares previos al tumor pueden cambiar sus características para proporcionar un lugar donde éste pueda comenzar a crecer (7).



Una vez que se invaden los tejidos, se liberan factores inductores, que caracterizan el microambiente tumoral y desencadenan el proceso de angiogénesis. La angiogénesis se define como la formación de vasos sanguíneos alrededor de un tejido (8), en este caso el tejido tumoral. La rápida proliferación de las células tumorales conlleva una formación de vasos sanguíneos de forma desordenada y por tanto, el  $O_2$  transportado por el sistema circulatorio tiene problemas para difundir a todas las

Figura 2: Componentes del TME como son células tumorales heterogéneas, estromales y una variedad de células inmunitarias que se encuentran infiltradas en el tumor.

células que forman el tumor. Esto provoca finalmente, una baja concentración de O<sub>2</sub> en las células cancerígenas. (9).

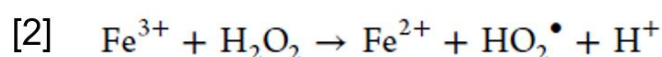
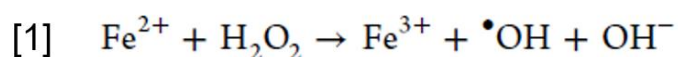
Otro factor importante presente en los tumores es el conocido Efecto *Warburg* (10). Los tumores consumen 200 veces más de glucosa que las células normales. Éstas, incluso con un aporte pleno de oxígeno, pueden reprogramar su metabolismo de la glucosa, y con ello limitar su metabolismo energético realizando la glicólisis anaeróbica en el citosol, en vez de la fosforilación oxidativa (procesar el dióxido de carbono en la mitocondria). Este aumento de la glicólisis anaeróbica conlleva una acumulación de lactato en el tejido extracelular (puesto que es el producto final de dicha ruta metabólica). La sobreproducción de este ácido carboxílico conlleva una disminución en el pH extracelular con valores entre 6.0-7.0, más bajos en comparación con el pH fisiológico habitual de 7.4. (11)

La ligera acidez presente en las células tumorales puede ser aprovechada por nanomateriales basados en Cu y Fe, metales de transición activos en la reacción Fenton, para producir Especies Reactivas de Oxígeno (*Reactive Oxygen Species, ROS*), puesto que esta reacción está favorecida a pH ácido, como se explicará en el siguiente apartado. El objetivo final de esta producción de ROS por parte de los catalizadores nanoestructurados es inducir selectivamente a las células tumorales en situación de estrés oxidativo que provoque su entrada en el mecanismo de apoptosis, y finalmente acaben siendo eliminadas. (12)

## 1.2 Descripción del estado del arte del uso de NPs como catalizadores Fenton en el entorno tumoral.

Las condiciones químicas presentes en las células tumorales descritas previamente hacen el uso de catalizadores nanoestructurados basados en metales de transición, como Cu y Fe, candidatos ideales para llevar a cabo la reacción de Fenton dentro de las células cancerígenas. Este tipo de estrategia se conoce como terapia quimiodinámica (*Chemodynamic Therapy, CDT*), como se ha indicado en el apartado 1.1.1.

La reacción catalítica de Fenton, mediante la cual se genera la especie radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se presenta en la Ecuación 1. El ciclo catalítico posee dos pasos: [1] El Fe<sup>2+</sup> es capaz de descomponer el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en  $\cdot\text{OH}$  y OH<sup>-</sup>, a su vez transformándose en Fe<sup>3+</sup> al donar un electrón al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y [2] regeneración de la especie activa, Fe<sup>2+</sup>. En este caso, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa como agente reductor donando un electrón al ion Fe<sup>3+</sup>. La etapa limitante de la reacción es el paso [2] al tener una constante cinética mucho más elevada que el paso [1] ( $k_1 = 40\text{-}80 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  frente a  $k_2 = 9\cdot 10^7 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (13)

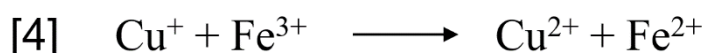
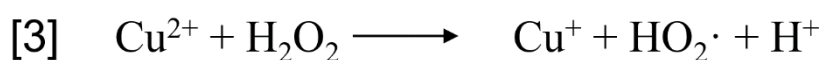


*Ecuación 1: Reacción tipo Fenton catalizada por la especie Fe<sup>2+</sup> para descomponer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y generar  $\cdot\text{OH}$ , los cuales inducirán a la célula en un estado de estrés oxidativo.*

No obstante, existen algunos inconvenientes en esta reacción, como la gran cantidad necesaria de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o el estrecho rango de pH. Concretamente, haciendo referencia al pH, el Fe<sup>2+</sup> forma Fe(OH)<sub>2</sub> cuando **pH >3** y alcanza su máximo a **pH 4**, en cambio, el Fe<sup>3+</sup> genera oxihidróxidos inactivos, lo que dificulta la continuación del ciclo.

El microambiente tumoral presenta características únicas, como se ha explicado anteriormente respecto al pH y a la concentración intratumoral de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necesario para llevar a cabo la reacción Fenton se acumula en las células y en los tejidos tumorales con concentraciones muy elevadas en comparación a las células sanas. (13)

Considerando la química de la reacción Fenton, una de las estrategias para mejorar su velocidad consiste en la introducción de un co-catalizador que aumente la velocidad de reacción del paso [2]. En concreto, diversos estudios han introducido Cu en catalizadores basados en Fe con el objetivo de regenerar la especie activa en la reacción Fenton, Fe<sup>2+</sup>, mediante su reacción con Cu<sup>+</sup>, siguiendo la reacción mostrada en la Ecuación 2.



*Ecuación 2.: Papel del Cu<sup>2+</sup> en la regeneración de especies de Fe<sup>2+</sup>, altamente activas en la reacción Fenton. (14)*

En el presente trabajo se han sintetizado y caracterizado diferentes catalizadores nanoestructurados basados en Cu y Fe, (Cu<sub>2</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, CuFeO<sub>x</sub>, CuFeS y CuFe-Polidopamina-PDA). A su vez, se ha empleado la reacción de oxidación de 3,3,5,5-tetrametilbencidina (TMB) para estudiar la actividad catalítica de todos ellos en diferentes condiciones. Los pHs evaluados en este trabajo han sido 4.5 y 6.5. El primero corresponde al pH que puede encontrarse en los lisosomas (15) y dado que algunas nanopartículas son capaces de internalizar en la célula a través de lisosomas (15), su estudio posee un alto interés. El segundo, 6.5, es el pH en el que potencialmente se encuentran las células tumorales, siguiendo la descripción del TME presentada en la sección 1.1.2.

Por último, se han calculado los parámetros catalíticos de cada material, (K<sub>M</sub>, V<sub>max</sub>, K<sub>cat</sub>), a partir de los datos obtenidos asumiendo los modelos de ajuste cinético de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk, respectivamente. El estudio sistemático y comparativo de estos parámetros nos ha permitido evaluar la actividad de los diferentes catalizadores y establecer cuál presenta mayor respuesta en condiciones químicas análogos al microambiente tumoral.

## 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

Este Trabajo de Fin de Grado, llevado a cabo en el grupo de Películas y Partículas Nanoestructuradas (NFP) se integra dentro del proyecto CADENCE (ERC-Catalytic Dual-Function Devices Against Cancer), y el objetivo principal consiste en desarrollar nuevos catalizadores nanoestructurados basados en Cu y Fe que presenten una respuesta catalítica para la conversión de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en especies reactivas oxidantes (ROS) y evaluar la posible sinergia de la coexistencia de ambos metales de transición como catalizadores tipo Fenton.

Para ello, se plantea un Plan de Trabajo que incluye la fabricación, caracterización y evaluación catalítica de distintos materiales nanoestructurados que contengan Cu y Fe como elementos comunes, pero de naturaleza química diferente, incluyendo desde estructuras de composición inorgánica hasta estructuras de conformación orgánica mayoritaria. Asimismo, se plantea un estudio sistemático que permita valorar la eficacia de cada catalizador evaluado en condiciones análogas a las del entorno tumoral. La distribución de tareas a desarrollar se divide en 4 bloques:

### SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS

- En este caso, síntesis en fase líquida de NanoPartículas de  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CuFeS}_2$ ,  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$  y  $\text{CuFePDA}$ .

### CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

- Determinación de la cantidad de Cu y Fe en la nanopartícula mediante Microwave Plasma-Assisted Emission Spectroscopy (MP-AES)
- Caracterización morfo-química por microscopía electrónica avanzada., TEM, STEM-EDS, para obtener información acerca de la morfología, tamaño las características de la composición elemental de la muestra.
- Caracterización estructural por XRD, detallando la estructura cristalográfica además de las fases presentes en las muestras.
- Caracterización espectroscópica por FT-IR y para estudiar el estado de oxidación, los enlaces presentes e identificación de grupos funcionales.

### ENSAYOS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALITICA

- Estudios catalíticos preliminares con TMB como sustrato modelo, monitorizando la absorbancia frente al tiempo.
- Reacción de los nanocatalizadores a diferentes pH.
- Influencia de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  empleada.
- Verificación de la cinética de Michaelis Menten, además de la obtención de las diferentes constantes cinéticas con la ecuación de Lineweaver Burk y su posterior comparación.

## 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

### 3.1. Reactivos.

Los reactivos utilizados en este trabajo son los siguientes:

Cloruro de hierro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 97%), acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $\geq 99.0\%$ ), etilenglicol (EG,  $\geq 99.5\%$ ), cloruro de cobre (II) dihidratado ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99.0\%$ ), Polyvinylpyrrolidone (PVP,  $M_w$ : 40 000 g/mol), Azufre (99.5-100.5%), Polyethylene glicol (PEG,  $M_w$ : 6 000 g/mol), Etanol, Agua Destilada, albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA,  $\geq 98.0\%$ ), Hidróxido de amoníaco ( $\text{NH}_3\text{OH}$ , 28-30%,  $\text{NH}_3$  basis), 2-propanol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{OH}$   $\geq 99.5\%$ ), Clorhidrato de dopamina (DA·HCl), Dimetilsulfóxido ( $\text{CH}_3\text{SOCH}_3$   $\geq 99.5\%$ ), Ácido 2-etanosulfónico (MES hydrate), Ácido Cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$   $\geq 99.5\%$ ), Hexacianoferrato de potasio (III) ( $\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6$ ), Sulfato de cobre (II) pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), hidróxido de sodio (NaOH), disolución salina tamponada con fosfato (PBS), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 33% en volumen), 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB,  $\geq 95\%$ ), ácido clorhídrico (HCl, 37%), ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ , 65%), Polietilenglicol (PEG,  $M_w$ : 40 000 g/mol), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ , 99%). Indicar la casa comercial donde compramos los reactivos (Sigma).

### 3.2. Síntesis de nanopartículas basadas en cobre y hierro.

#### 3.2.1. Síntesis de nanopartículas de hexacianoferrato de cobre ( $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ , CuFeMOF).

Este tipo de nanopartículas se han preparado utilizando como referencia los procedimientos experimentales descritos por Dongdong Wang, Huihui Wu y su grupo de trabajo. (16)

En primer lugar, se pesan todos los compuestos a utilizar; Ácido cítrico (300 mg), Hexacianoferrato de potasio (III) (36.8 mg) y Sulfato de cobre (II) pentahidratado (35 mg). A continuación, en un matraz disolvemos el ácido cítrico y el Hexacianoferrato de potasio (III) en 20 mL de agua destilada, y colocamos este matraz en una placa agitadora, con su correspondiente agitador magnético. En un tubo Falcon disolvemos el Sulfato de cobre (II) pentahidratado en 10 mL de agua destilada, y lo añadimos gota a gota con una pipeta Pasteur a la disolución del matraz. Una vez preparada la disolución final, la dejamos agitando durante 24 horas a temperatura ambiente y obtuvimos producto con un color final naranja oscuro.

Posteriormente, se realiza el proceso de centrifugación (10 000 rpm, 10', 2 ciclos). Cada vez que se obtiene la muestra centrifugada, nos quedamos con el pellet formado y volvemos a disolverlo en 20 mL de agua, ultrasonificando después para facilitar la disolución de los metales y de los posibles agregados a la mezcla. Finalmente, el pellet obtenido se disuelve en 5 mL de agua destilada, para así, lograr una mayor concentración de las NPs y eliminar el exceso del resto de componentes.

### 3.2.2. Síntesis de nanopartículas de óxido de Cu y Fe (CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, CuFeO<sub>x</sub>)

Las nanopartículas de CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> se han preparado siguiendo los trabajos previos del grupo NFP. En primer lugar, se disuelve la BSA (250 mg) en 2.5 mL de agua destilada empleando agitación magnética durante 15 min. Luego, se añaden de forma secuencial 12.5 mL de EG 275 mg de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 85 mg de CuCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O y 375 mg de CH<sub>3</sub>COONa manteniendo agitación fuerte durante 2 h.. La disolución se somete a un proceso de ultrasonificación tras la adición de cada compuesto para facilitar la disolución de los metales y de los posibles agregados en la mezcla. Después la mezcla se introduce en un autoclave de teflón y se lleva a una mufla a 180°C durante 24 h. Pasado este tiempo, el autoclave se deja en un baño de agua fría y se recupera el sólido mediante un proceso de centrifugación, (12 000 rpm, 20', 2 ciclos). Eliminamos el sobrenadante y disolvemos el pellet en 20 mL de agua destilada en cada ciclo de centrifuga, y, finalmente se resuspende en 10 mL.

### 3.2.3. Síntesis de nanopartículas de calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>, CuFeS).

En primer lugar, se prepara una disolución con EG (30 mL) en atmósfera inerte de N<sub>2</sub>. A continuación, añadimos todos los componentes en el siguiente orden, PVP (1.4 g), FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (95 mg), CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (25 mg), CH<sub>3</sub>COONa (3,75 g) y 100 mg de S. Después de cada adición, agitamos en el baño de ultrasonidos para conseguir una disolución total de cada componente y una mezcla homogénea, además de someterla a una corriente de N<sub>2</sub>. Después la mezcla se introduce en un autoclave de teflón y se lleva a una mufla a 180°C durante 24 h. El producto se purifica mediante un proceso de centrifugación (10000 rpm durante 10 min, 4 ciclos). Los disolventes empleados en los ciclos de centrifuga son: EtOH, EtOH: H<sub>2</sub>O (1:1) y H<sub>2</sub>O. Finalmente, el sólido se resuspende en 5 mL de H<sub>2</sub>O-miliQ.

El sólido inicial resultante no presenta gran estabilidad coloidal en agua por lo que resulta necesario almacenarlo en etanol o funcionalizarlo con PEG. Para ello se precipita el sólido mediante centrifugación, sustituyéndolo por agua destilada (10 mL), y añadiendo PEG (30 mg). Finalmente, se centrifuga para eliminar el PEG no unido a la nanopartícula (10.000 rpm, 2 ciclos, 10') y el catalizador se resuspende en 10 mL de H<sub>2</sub>O miliQ.

### 3.2.4. Síntesis de nanopartículas de polidopamina con Cu y Fe (CuFe-PDA)

En primer lugar, se prepara una disolución compuesta por agua miliQ(90 mL), 2- Propanol (45 mL) y NH<sub>4</sub>OH (3.4 mL), mezclando todos los componentes por agitación magnética un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente. En un tubo de centrifuga disolvemos Dopamine Hydrochloride (DA·HCl) (500 mg) en agua destilada (10 mL), y se agita magnéticamente hasta alcanzar homogeneidad. Una vez que tenemos las dos disoluciones preparadas, añadimos gota a gota la disolución de DA·HCl a la otra disolución. Posteriormente, las nanopartículas de PDA se purifican mediante un proceso de centrifugación (12 000 rpm, 10', 3 ciclos) Finalmente, el sólido se resuspende en 10 mL de H<sub>2</sub>O miliQ.

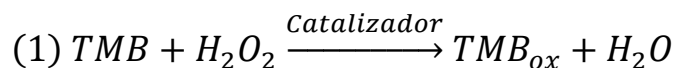
Por otro lado, preparamos la disolución de metales, en el cual se preparan dos disoluciones por separado, en la primera se disuelven 500 mg de DA·HCl en 10 mL de agua destilada. En otro recipiente de 250 mL con agitación magnética se añaden 90 mL de agua destilada y 45 mL de

Isopropanol ( $C_3H_8O$ ), posteriormente se añaden 1.75 mL de la solución de Hidróxido de Amonio ( $NH_4OH$ ), y se deja en agitación 30 minutos. Por último, se mezclan las disoluciones añadiendo gota a gota los 10 mL de dopamina, y se observa que el color cambia de amarillo a marrón oscuro. (17)

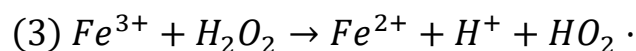
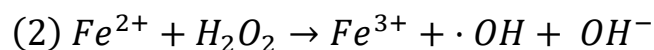
### 3.3. Estudio de la respuesta catalítica.

#### 3.3.1. Reacción estudiada

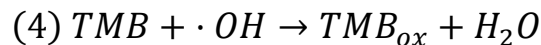
La actividad catalítica de los nanomateriales sintetizados previamente se ha estudiado empleando la reacción de TMB (Ecuación 3) con los radicales  $\cdot OH$  (Ecuación 5) generados mediante la reacción Fenton, catalizada por las nanopartículas de CuFe (Ecuación 4). El producto generado,  $TMB_{ox}$  presenta un pico de absorbancia a  $\lambda = 650$  nm, por lo que puede seguirse fácilmente por espectroscopía UV-vis, con un sistema UV-2600 Shimadzu.



*Ecuación 3: Reacción del TMB con el  $H_2O_2$ .*



*Ecuación 4: Catálisis de la reacción Fenton mediante Cu y Fe. (18)*



*Ecuación 5: Generación de radicales  $\cdot OH$ .*

Por otro lado, durante todo el proyecto trabajamos con esta reacción catalizada en una zona de pHs ácidos, debido a que el  $H_2O_2$  se une al metal, y al hacerlo se generan radicales OH. Si aumentamos el pH, se generan iones hidróxido ( $OH^-$ ) los cuales unen al centro metálico, evitando que el  $H_2O_2$  pueda adsorberse y posteriormente descomponerse en  $\cdot OH$ . Por lo que a pH altos la velocidad de reacción se ve disminuida.

#### 3.3.2 Procedimiento experimental.

Para llevar a cabo los diversos experimentos, hay que seguir un orden de adición y unas cantidades precisas, las cuales vamos a clasificar por catalizador sintetizado.

En la metodología empleada se añade en primer lugar el Buffer MES (2.33 mL, 0.0466 M). Después, añadimos 10  $\mu L$  de una disolución 20.80 mM de TMB (en DMSO), y a continuación, añadimos  $H_2O_2$ , (se evalúan el rango de concentraciones adecuado para cada catalizador, Tabla 1) Por último, se añaden el catalizador a la reacción hasta alcanzar una  $[Fe] = 0.01$  mg/L. Se trabaja tanto a pH 4.5 como a pH 6.5.

Tabla 1: Rango de concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para cada catalizador según el pH deseado.

	Cu <sub>2</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	CuFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	CuFeS <sub>2</sub>	CuFe-PDA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (pH 4.5)	1 a 16 mM	1 a 16 mM	1 a 350 mM	1 a 16 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (pH 6.5)	4 a 11 μM	4 a 38 μM	4 a 38 μM	1 a 16 mM

Todos estos ensayos han sido monitorizados y analizados mediante el equipo de UV-Vis, a un rango de longitud de onda concreta, (640-670 nm), y durante un intervalo de tiempo de 13-15 minutos. También en algunos se han realizado ensayos de 20 minutos para concluir si seguía habiendo variación de las diferentes variables estudiadas.

### 3.3.3. Determinación de la velocidad inicial de reacción, V<sub>0</sub>.

La velocidad inicial de la reacción se define como la cantidad de TMB que se ha oxidado con el tiempo en el transcurso inicial de la reacción. Para cada experimento de catálisis, se determina la velocidad inicial (V<sub>0</sub>, mM·s<sup>-1</sup>) a partir de la pendiente de la curva (TMB)<sub>oxidado</sub> frente al tiempo en los instantes iniciales de reacción. La concentración TMB<sub>oxidado</sub> con el tiempo se obtiene mediante la ecuación de Lambert - Beer, que presentamos a continuación (Ecuación 6)

$$[TMB]_{ox} = \frac{Absorbance}{\epsilon \cdot l}$$

Ecuación 6: Ecuación de Lambert-Beer.

Dónde ε = coeficiente de extinción molar = 39 000 (L/mol·cm) y l = longitud de la cubeta= 1 (cm) y Absorbance es la absorbancia obtenida en los experimentos.

### 3.3.4. Ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk.

En primer lugar, aplicamos la ecuación de Michaelis Menten, caracterizada por representar la velocidad máxima de la reacción frente a la concentración de peróxido utilizada. Esta velocidad fue obtenida como la pendiente de representar la Ecuación 7.

$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [H_2O_2]}{K_M + [H_2O_2]}$$

Ecuación 7: Ecuación de Michaelis Menten.

Dónde (-V<sub>0</sub>) es la velocidad de la transformación de un reactivo/producto, como el TMB oxidado con el tiempo, K<sub>M</sub> es la constante de Michaelis Menten, que es la concentración de sustrato necesaria para que la enzima alcance una velocidad igual a la mitad de su velocidad máxima (V<sub>Max</sub>).

Esta constante también refleja la sensibilidad del catalizador, es decir, cómo de selectiva es la reacción. Si los datos experimentales se ajustan en buena medida a esta ecuación, significa que la actividad catalítica de los nanomateriales sintetizados puede estudiarse de igual modo a la actividad de un enzima natural. Si la  $K_M$  es baja, significa que hay mayor afinidad entre el sustrato, en este caso  $H_2O_2$  y el catalizador (19). A continuación, aplicamos la ecuación de Lineweaver-Burk, para obtener tanto  $K_M$  como  $V_{Máx}$ . Para ello, se representa el inverso de la velocidad inicial de reacción frente al inverso de la concentración de  $H_2O_2$ , obteniéndose una recta de cuya ordenada en el origen puede calcularse  $V_{Máx}$  y de su pendiente,  $K_M$ , siguiendo la Ecuación 8.

$$\frac{1}{(-V_0)} = \frac{K_M}{V_{máx}} \cdot \frac{1}{[H_2O_2]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

*Ecuación 8: Ecuación de Lineweaver Burk.*

### 3.3.5 Obtención de la constante catalítica, $k_{cat}$

La constante catalítica,  $k_{cat}$  (o número de recambio, *turnover number*) se define como el máximo número de moléculas de sustrato que una molécula de enzima puede convertir en producto por unidad de tiempo. Se calcula siguiendo la Ecuación 9.

$$k_{cat} = \frac{V_{máx}}{[Fe]} = \frac{\left(\frac{[mmol]}{[L \cdot s]}\right)}{\frac{mmol}{L}} = s^{-1}$$

*Ecuación 9: Obtención de la constante catalítica.*

Donde  $V_{máx}$  es la obtenida en la ecuación de Lineweaver-Burk, y  $[Fe]$  es la concentración de Fe utilizada experimentalmente en la reacción de oxidación de TMB.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1. Caracterización de los catalizadores basados en Cu-Fe

#### 4.1.1. Caracterización del catalizador $Cu_2Fe(CN)_6$

Las imágenes de TEM obtenidas revelan nanopartículas de un tamaño promedio de  $60.8 \pm 11$  nm, con una morfología cúbica y una distribución de tamaños homogénea (Figura 3). Mediante el análisis por STEM-EDS puede detectarse una distribución homogénea en cada partícula de todos los elementos que la componen: Fe, Cu y N, perteneciente a los grupos  $-C \equiv N-$ , que actúan como *linkers* de los átomos de Fe y Cu (Figura 4). El espectro de DRX (Figura 5 A) muestra una alta cristalinidad de la muestra, cuyos picos se ajustan bien al patrón JCPDS #02-0381 (20), correspondiente con  $Cu_2[Fe(CN)_6]$ . En este tipo de estructura, el Fe se encuentra unido al grupo  $-C \equiv N-$  a través del átomo de C, mientras que el Cu se encuentra unido a través del átomo de N, ocupando ambos átomos metálicos sitios de carácter octaédrico. Finalmente, el análisis de FTIR (Figura 5 B) permite identificar la presencia del enlace  $-C \equiv N-$  a  $2170 \text{ cm}^{-1}$  inalterado tras el

proceso de síntesis, y otra segunda banda que corresponde al modo de vibración del enlace O-H a  $1612\text{ cm}^{-1}$ .

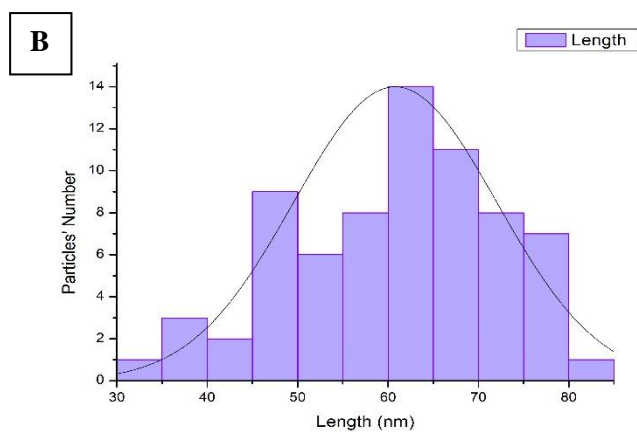
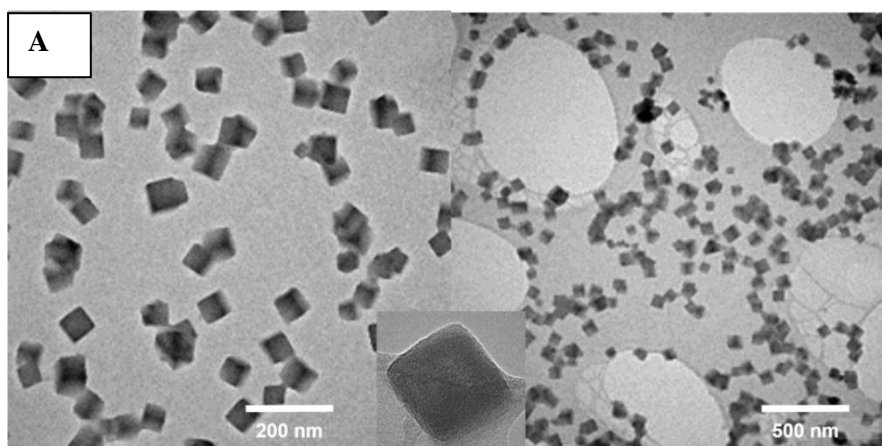


Figura 3: A) Imagen TEM de nanopartículas  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ . Inset: imagen de una partícula de  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$  individual, Escala : 20 nm. Escala de las otras imágenes restantes: 200 nm y 500 nm. B) Histograma de la distribución de tamaños presentes en el catalizador  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ .

Como se puede observar, el catalizador  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$  tiene partículas mucho más homogéneas que el resto de catalizadores, además de tener cierta separación entre ellas, lo que hace que disminuya la aglomeración, algo que está favorecido por la adición de ácido cítrico.

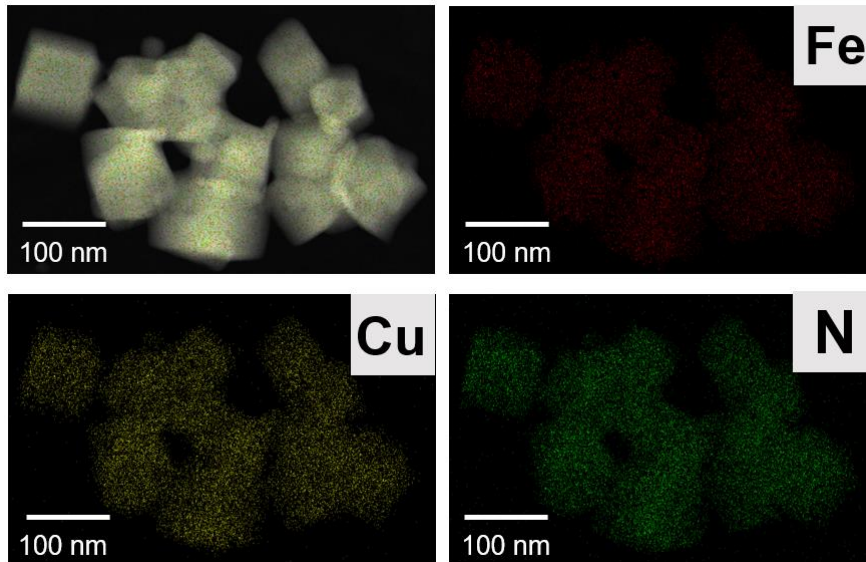


Figura 4: Imagen STEM-EDS de las partículas  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ . Escala: 100nm.

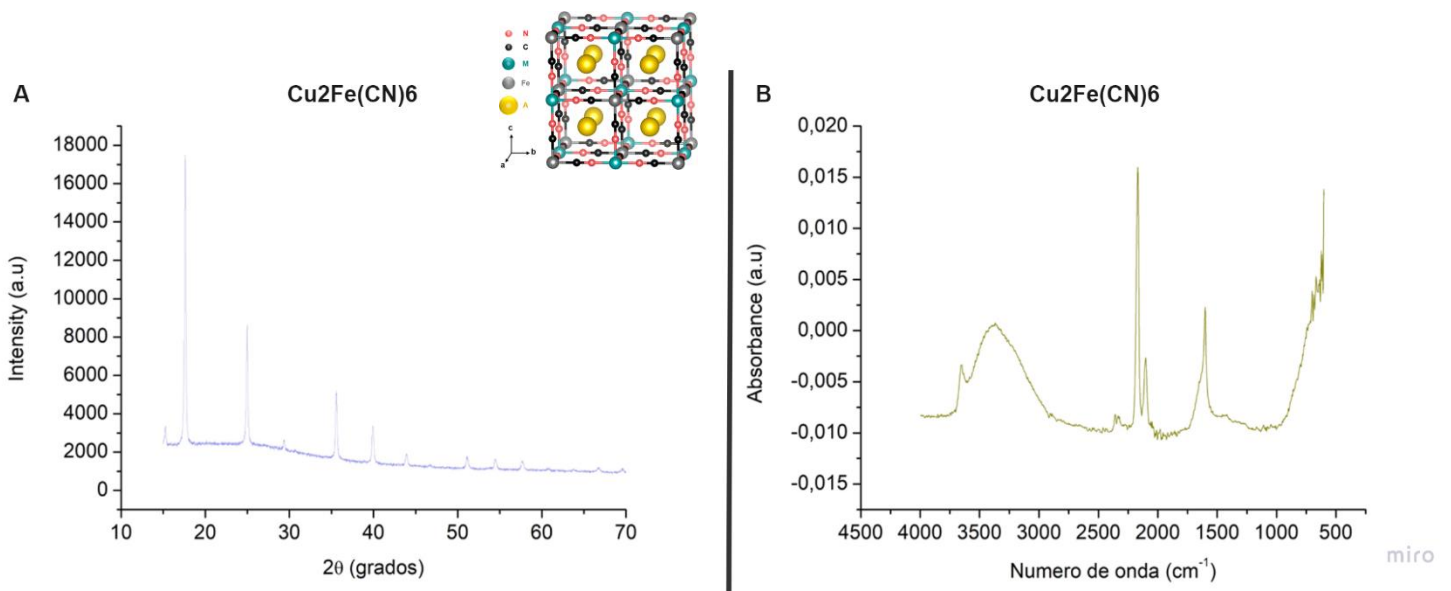


Figura 5: A) Difractograma de las partículas de  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ ; B) Espectro FTIR correspondiente a las partículas de  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ . Inset: Estructura tridimensional del  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$  con los planos cristalinos más relevantes de su composición.

#### 4.1.2. Caracterización del catalizador $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ .

En el caso del resultado de la síntesis de las nanopartículas de  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ , las imágenes TEM muestran una morfología pseudoesférica junto con un tamaño promedio de  $8.42 \pm 7$  nm. Esta alta desviación estándar se debe a la presencia de algunas pocas partículas de tamaño mayor en el rango de 20 a 35 nm. El análisis mediante STEM-EDS muestra una distribución homogénea en cada partícula de los elementos Cu, Fe y O (Figura 7). El análisis mediante DRX muestra un buen ajuste con el patrón JCPDS-25-0283, correspondiendo la estructura obtenida a una cuproespinela (Figura 8 A). Finalmente, el análisis por FTIR muestra la presencia de grupos característicos de la BSA como C-H a  $3300\text{ cm}^{-1}$ , o presentando bandas de absorción a  $2950$ ,  $1655$  y  $1395\text{ cm}^{-1}$  que pueden atribuirse a modos de estiramiento (*stretching*) de los grupos Csp<sup>3</sup>-H, C=O C-N, demostrando su presencia después de la síntesis (Figura 8 B) (21).

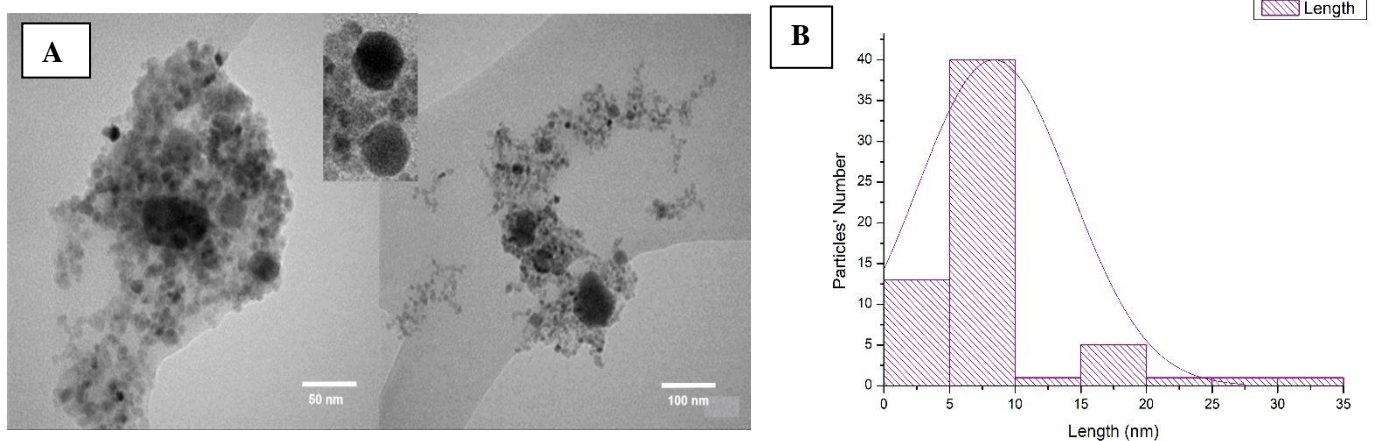


Figura 6: A) Imagen TEM de las nanopartículas partículas  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ . Escala: 100 nm y 50 nm. Inset: imagen de una partícula de  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$  individual. Escala: 50 nm. B) Histograma de la distribución de tamaños presentes en el catalizador  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ .

El  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ , presenta las partículas muy aglomeradas, además de con diversos tamaños, es decir no homogéneas.

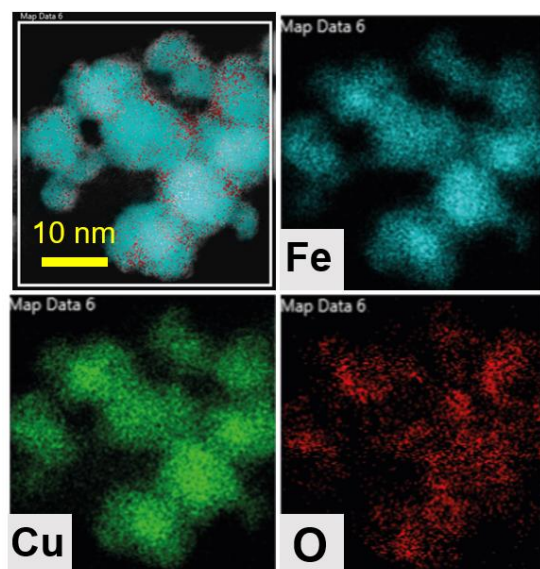


Figura 7: Imagen STEM-EDS de las partículas  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ . Escala: 10nm. Y,

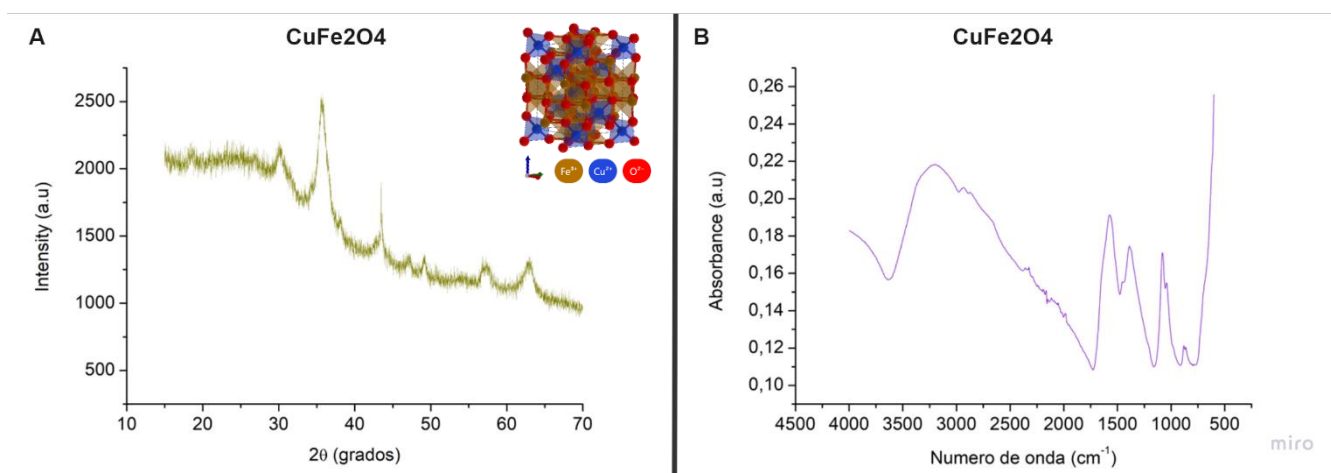


Figura 8 : A) Difractograma de las partículas de  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ ; B) Espectro FTIR correspondiente a las partículas de  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ . Inset: Estructura tridimensional del  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$  con los planos cristalinos más relevantes de su composición.

#### 4.1.3. Caracterización del catalizador $\text{CuFeS}$ .

Las imágenes de TEM correspondientes al catalizador  $\text{CuFeS}_2$  se muestran en la Figura 9. De manera similar a las partículas  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ , estas presentan una estructura pseudoplana pero con un mayor tamaño promedio ( $20.0 \pm 7.0$  nm). El análisis mediante STEM+EDS de estas partículas (Figura 10) muestra una distribución homogénea de Fe, Cu y S en un conjunto de partículas. se puede observar el análisis realizado para este catalizador, así como su escala. El espectro de DRX (Figura 11 A) coincide con el espectro característico de la calcopirita (PDF 98-000-0156), (22) donde cada átomo metálico se encuentra en posiciones tetraédricas rodeado por cuatro átomos de S. Finalmente el espectro de FTIR revela la identificación de bandas de absorción significativas

para las NPs de  $\text{CuFeS}_2$  en  $720$  y  $651\text{ cm}^{-1}$ , que se atribuyen a las frecuencias de estiramiento Cu-S y Fe-S (Figura 11 B).

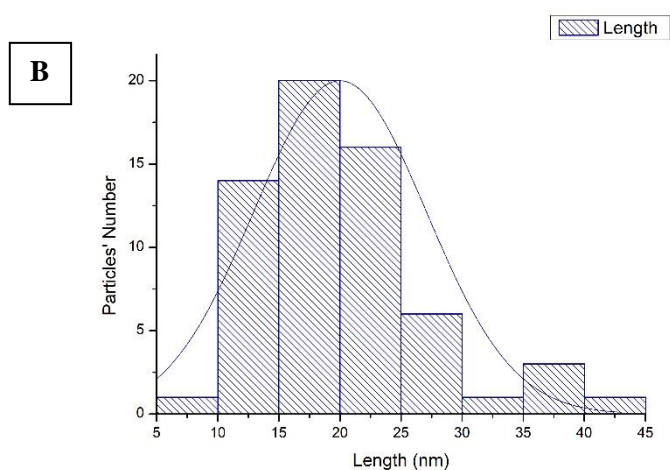
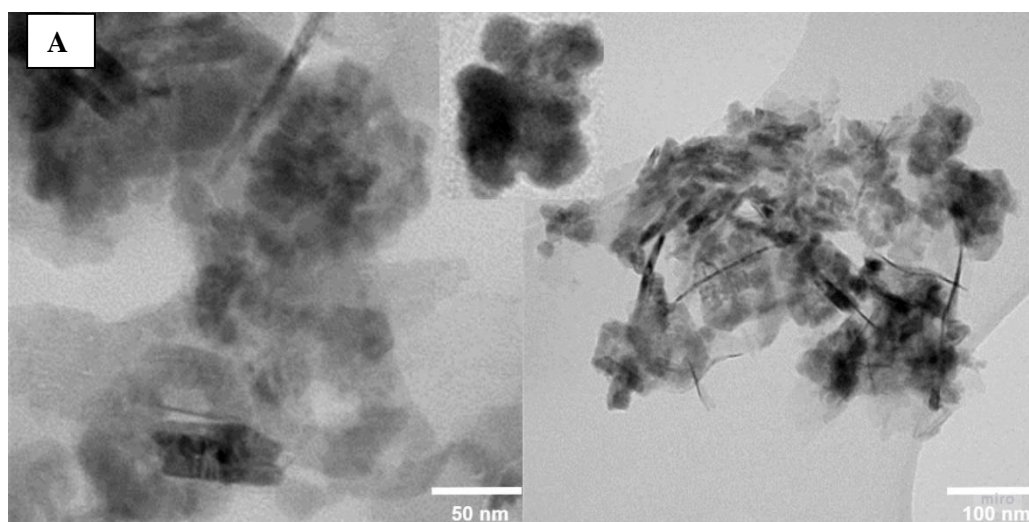


Figura 9: A) Imagen TEM de las nanopartículas  $\text{CuFeS}_2$ . Escala: 100 nm y 50 nm. Inset: imagen de una partícula de  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$  individual. Escala: 20 nm. Como se puede ver, presentan una gran aglomeración entre partículas. B) Histograma de la distribución de tamaños presentes en el catalizador  $\text{CuFeS}_2$

En el  $\text{CuFeS}_2$  sus partículas apenas tienen forma a parte de presentar mucha aglomeración y poca homogeneidad en la cantidad de muestra.

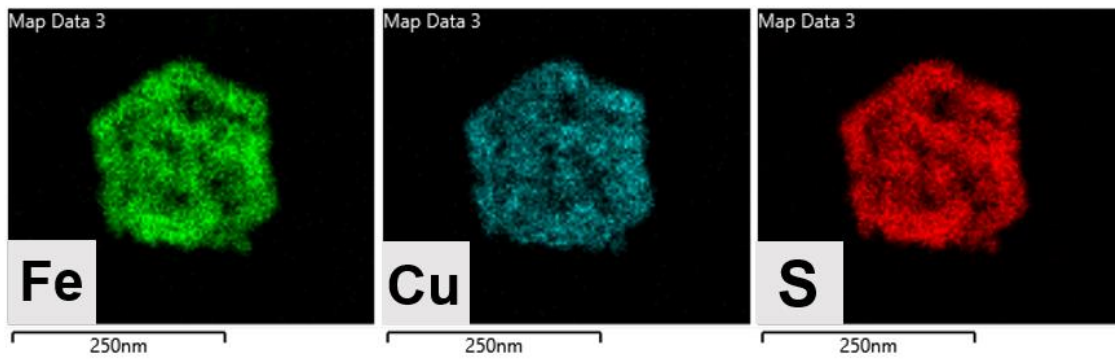


Figura 10: Imagen STEM-EDS de las nanopartículas CuFeS<sub>2</sub>. Escala: 250 nm

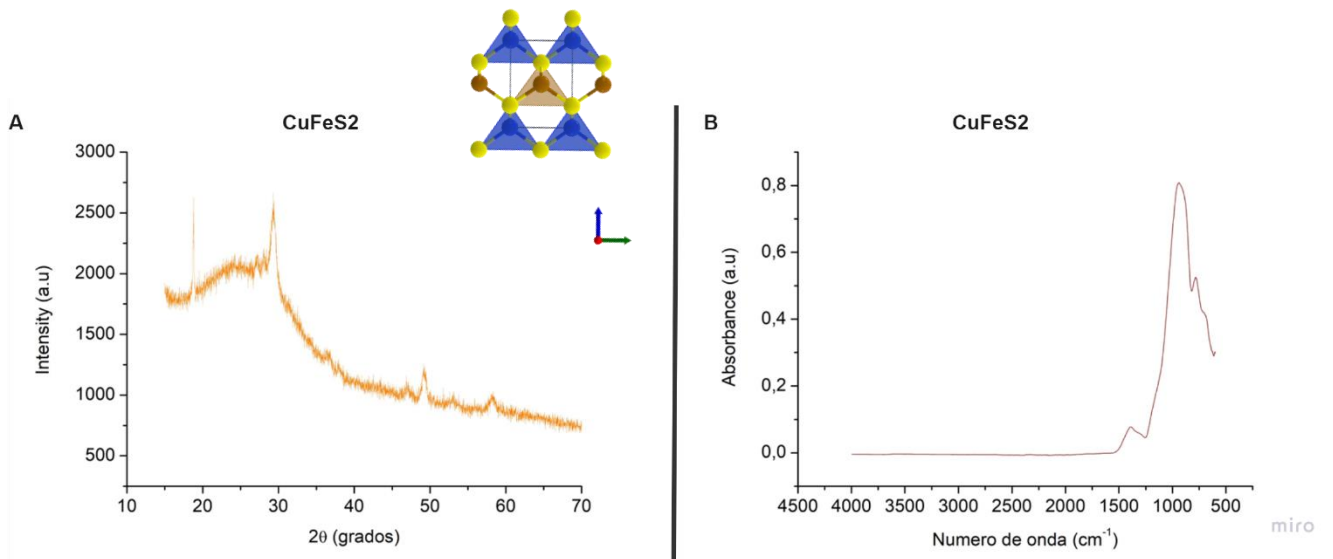


Figura 11: A) Difractograma de las partículas de CuFeS<sub>2</sub>; B) Espectro FTIR correspondiente a las partículas de CuFeS<sub>2</sub>. Inset: Estructura tridimensional del CuFeS<sub>2</sub> con los planos cristalinos más relevantes de su composición.

#### 4.1.4. Caracterización del catalizador CuFe-PDA

Las imágenes TEM de las nanopartículas de CuFePDA muestran una morfología completamente esférica, con un tamaño promedio de  $198 \pm 24$  nm (

Figura 12). El análisis de las mismas mediante STEM-EDX revela una distribución homogénea de átomos de Cu y Fe sobre la superficie del núcleo de la PDA (Figura 13). Finalmente, el análisis por FTIR (23) - (24) muestra una banda de absorción a unos  $1510\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de cizallamiento del N-H, indicando la presencia de revestimientos de PDA. (Figura 14)

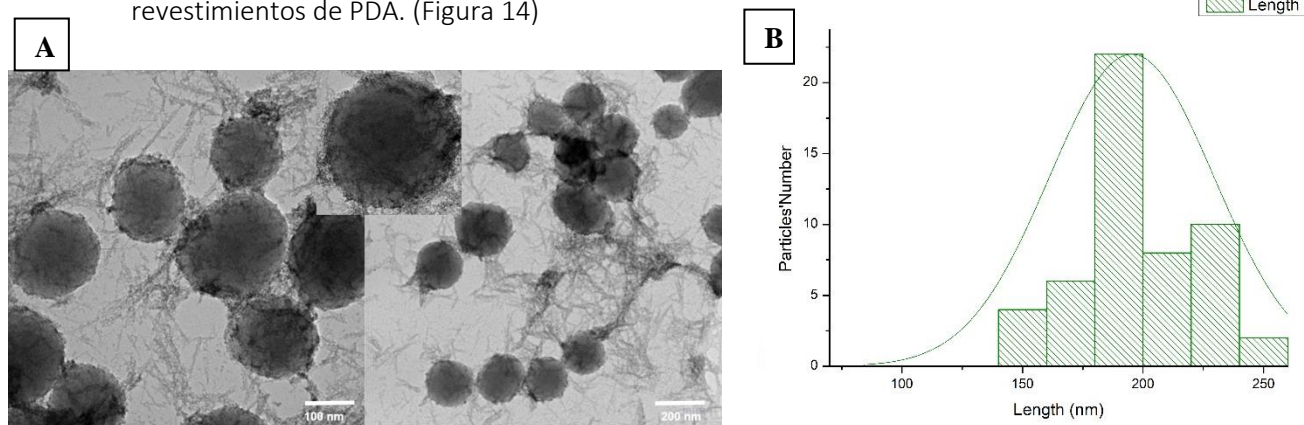


Figura 12: A) Imagen TEM de las nanopartículas CuFe-PDA. Inset: imagen de una partícula de CuFe-PDA individual, Escala: 50 nm. La nanopartícula de PDA individual constituye el núcleo de la nanoestructura. El resto de las escalas de las diferentes figuras son 100nm y 200 nm. B) Histograma de la distribución de tamaños presentes en el catalizador CuFe-PDA.

El CuFe-PDA, aunque presenta bastante disolución orgánica, sus partículas tienen una forma definida, sí juntas, pero no aglomeradas del todo y homogéneas.

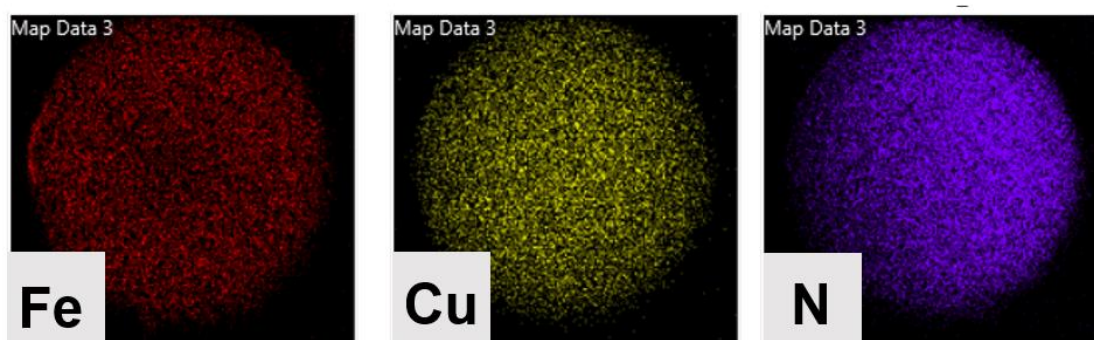


Figura 13: Imagen STEM-EDS de las partículas CuFe-PDA. Se puede observar la homogeneidad de los diferentes componentes, así como su similaridad, de una partícula individual del núcleo.

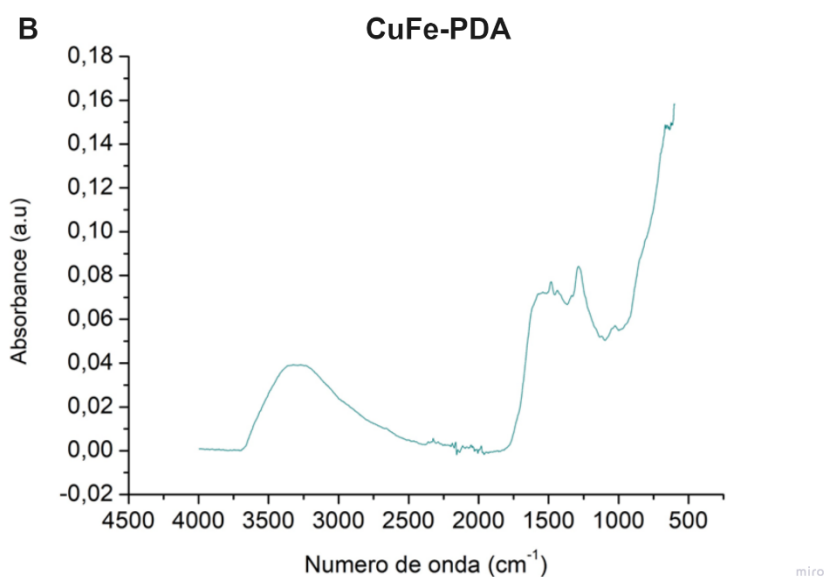


Figura 14: Espectro de FTIR correspondiente a las partículas del CuFePDA donde podemos observar las bandas de absorción de los diferentes grupos funcionales que la componen.

No se hace caracterización por XRD en este caso debido a que por su carácter polimérico no presenta orden cristalino que satisfaga las condiciones de periodicidad de la difracción de Bragg-Brentano.

## 4.2. Actividad catalítica de los catalizadores basados en Cu-Fe.

El estudio de la actividad catalítica de los nanomateriales sintetizados en el presente trabajo se llevó a cabo empleando la reacción de oxidación de TMB, tal y como se detalla en el apartado 3.3.1. Los catalizadores desarrollados poseen la capacidad de descomponer  $H_2O_2$  en  $\cdot OH$ , una especie con una elevada capacidad oxidante que puede reaccionar con el TMB para generar un producto que presenta una coloración azul y cuya concentración puede monitorizarse fácilmente mediante espectroscopía UV-vis, ya que presenta un espectro de absorción con un máximo a  $\lambda = 650$  nm.

Se hicieron una serie de ensayos para encontrar las condiciones óptimas con el fin de obtener la mayor absorbancia posible, el mayor TMB oxidado y la constante catalítica más grande. A continuación, haremos una comparativa entre los diferentes catalizadores utilizados, a distintas condiciones de pH y concentración de  $H_2O_2$  diferentes.

### 4.2.1. Respuesta catalítica de las nanopartículas de $Cu_2Fe(CN)_6$ .

La actividad catalítica para el material  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$  a pH 6.5 se muestra en la Figura 15 A, la reacción de oxidación de TMB tiene lugar tras la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ya que aumenta la absorbancia a 650 nm como consecuencia de la generación de TMB oxidado. Esto significa que el catalizador se mostró activo en la reacción de oxidación de TMB a pH 6.5 utilizando un rango de concentraciones de 4  $\mu\text{M}$  a 11  $\mu\text{M}$ . Por otro lado, la actividad catalítica a pH 4.5 se muestra en la Figura 15 B.

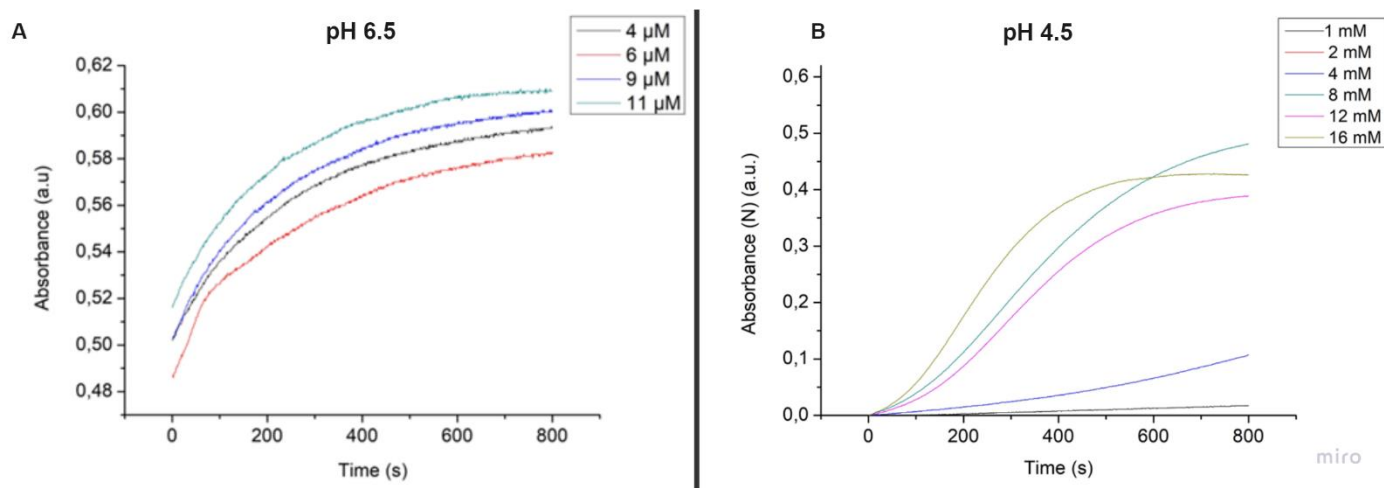


Figura 15: Variación de la absorbancia frente al tiempo del catalizador  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ : A) a pH 6.5, B) a pH 4.5. a diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y en un rango de longitud de onda de 640 a 670 nm.

El catalizador se mostró activo también en la reacción de oxidación de TMB a pH 4.5, como se puede ver en la Figura 15 B, utilizando un rango de concentraciones de 1 a 16 mM, pero se mostraba inactivo a un pH 4.5 con la disolución z de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por otro lado, a pH 4.5 funciona mejor que a pH 6.5, tal y como se explica en la sección 1.2, la reacción tipo Fenton funciona mejor a pH menores.

#### 4.2.2. Respuesta catalítica de las nanopartículas $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ .

En primer lugar, vamos a describir la actividad catalítica a pH 6.5 como se puede observar en la Figura 16 A, en este caso no hay reacción, lo que provoca que no se produzca la oxidación del TMB, por lo tanto, el catalizador se mostró inactivo en la reacción de oxidación de TMB a pH 6.5 utilizando un rango de concentraciones de 4  $\mu\text{M}$  a 38  $\mu\text{M}$ , es decir, no funcionó.

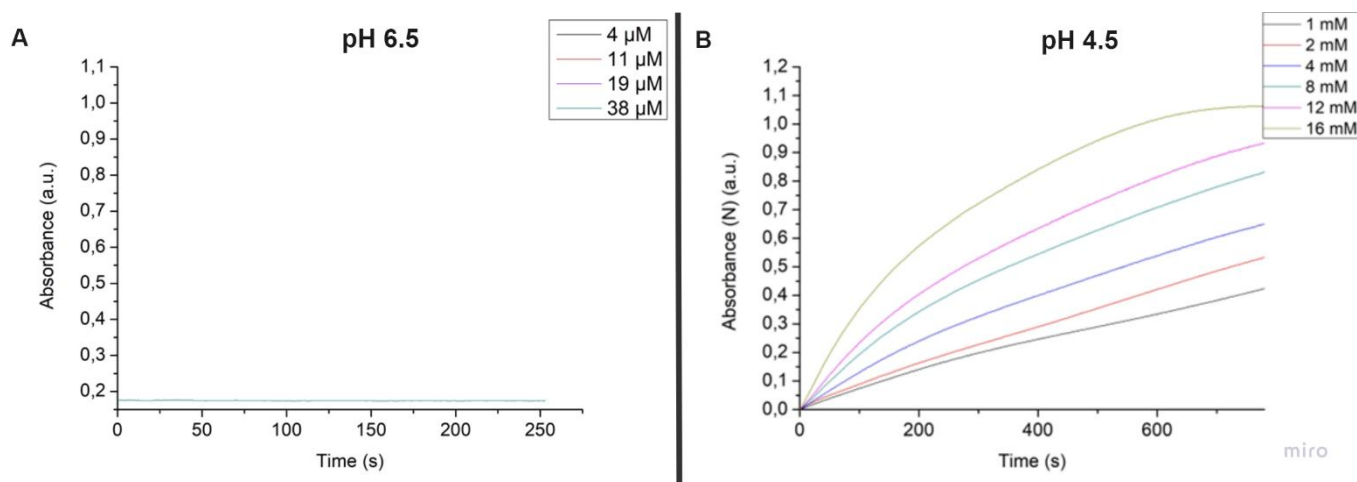


Figura 16: Variación de la absorbancia frente al tiempo del catalizador  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$  : A) a pH 6.5, B) a pH 4.5. a diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$

Por otro lado, para analizar la actividad catalítica a pH 4.5 nos fijaremos en la Figura 16 B, el catalizador se mostró completamente activo en un rango de concentraciones de 1 mM a 16 mM, produciendo la oxidación del TMB.

Como se puede observar, el catalizador  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ , funciona mejor a pH's ácidos y esto se debe a que la reacción Fenton es más favorable a pH ácido, como se describe en el apartado 1.2 del trabajo.

#### 4.2.3. Respuesta catalítica de las nanopartículas $\text{CuFeS}_2$ .

Analizamos la actividad catalítica a pH 4.5 nos fijaremos en la Figura 17 B, el catalizador se mostró completamente activo en un rango de concentraciones de 1 mM a 349 mM, con diversas repeticiones, produciendo la oxidación del TMB. Por el contrario, la respuesta catalítica a pH mayores fue nula para los distintos rangos de concentraciones evaluados. Esta diferencia de funcionamiento se debe a que el catalizador reacciona de manera tan favorable debido a que la reacción Fenton funciona mejor a pH ácido.

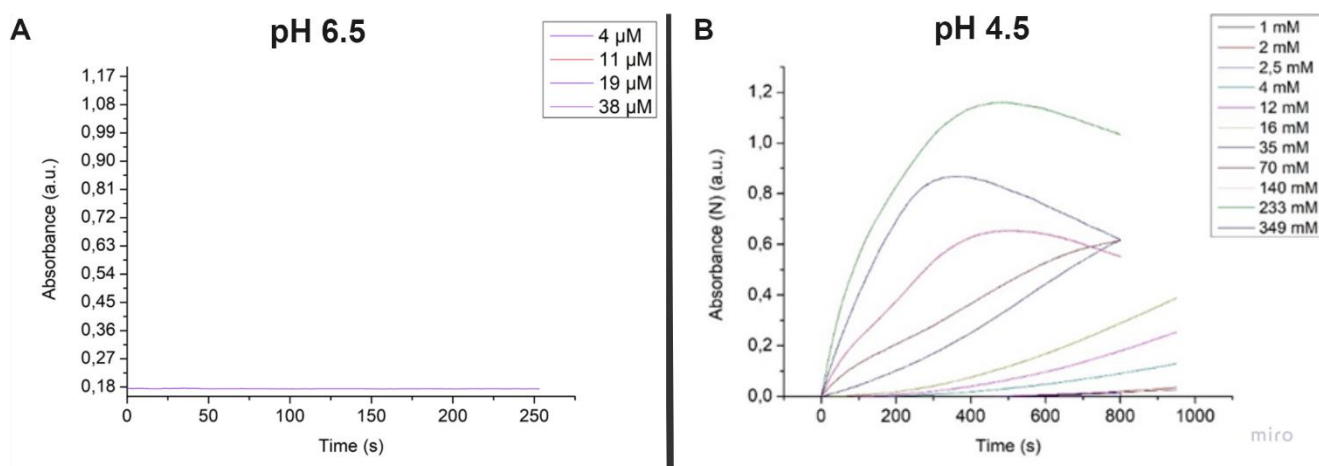


Figura 17: Variación de la absorbancia frente al tiempo del catalizador  $\text{CuFeS}_2$  : A) a pH 6.5, B) a pH 4.5. a diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La actividad catalítica a pH 6.5 como se puede observar en la Figura 17 A, en este caso no hay reacción, lo que provoca que no se produzca la oxidación del TMB, por lo tanto, el catalizador se mostró inactivo en la reacción de oxidación de TMB a pH 6.5, debido a que las reacciones tipo Fenton están más desfavorecidas a pH's menos ácidos.

#### 4.2.4. Respuesta catalítica de las nanopartículas $\text{CuFe} - \text{PDA}$ .

Como se puede observar en la Figura 18, tenemos dos figuras que se diferencian claramente, en la Figura 18 A, trabajamos ante un pH 6.5 con una disolución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.22 M, la cual tiene un rango de concentraciones de 1 a 16 mM. En este caso sí hay reacción, y con ello oxidación del TMB, por lo que existe actividad del catalizador en la reacción.

Por otro lado, para analizar la actividad catalítica a pH 4.5 nos fijaremos en la Figura 18 B, con un rango de concentraciones de 1 mM a 16mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sí tenemos reacción, y por lo tanto el catalizador se muestra activo en la reacción de oxidación del TMB.

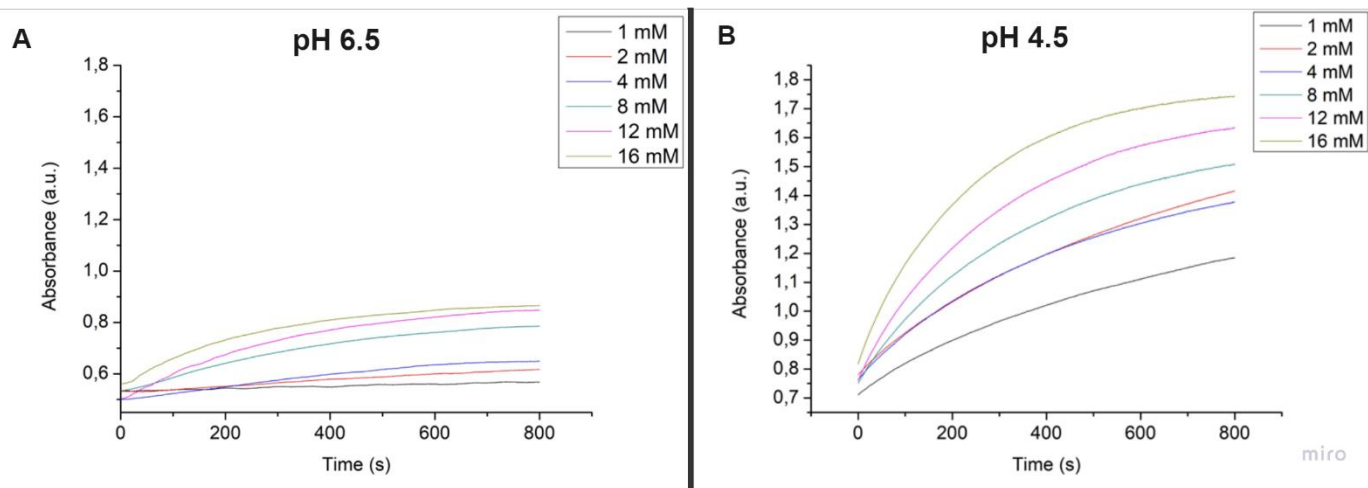


Figura 18: Variación de la absorbancia frente al tiempo del catalizador CuFe-PDA a pH 6.5 y con las condiciones óptimas a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> A) A pH 6.5. y B) A pH 4.5.

Además, si nos fijamos en las gráficas a diferentes pHs, a un pH más ácido, se alcanzan mayores niveles de absorbancia y por lo tanto TMB<sub>ox</sub> con el tiempo, por lo que son condiciones más óptimas para el transcurso de la reacción, lo cual se puede atribuir probablemente a que la reacción Fenton es más favorable en medio ácido (sección 1.2).

#### 4.2.3. Ajuste de los resultados experimentales a la función Michaelis-Menten.

Tras estudiar la generación de TMB oxidado en función del pH (6.5 y 4.5) y de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadida (sección 4.2.1), se determinan las V<sub>0</sub> de cada experimento siguiendo la metodología descrita en la sección 3.3.3. Ajustando los datos obtenidos de V<sub>0</sub> frente a [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] a la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 7, sección 3.3.4.) Todos los catalizadores cuya respuesta fue positiva tanto a pH = 4.5 (Figura 19 A-D) como a pH = 6.5 (Figura 20 A-B) mostraron un buen ajuste a esta función, con R<sup>2</sup> > 0.945 en casi todos los casos.

Es por ello que la actividad catalítica de estos nanomateriales posee un comportamiento análogo al de un enzima natural: (25) a concentraciones elevadas de sustrato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la V<sub>0</sub> de la reacción permanece constante puesto que todos los centros activos del catalizador están ocupados llevando a cabo la catálisis, es decir, el catalizador está saturado. Además, existen diferencias acerca de la [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] a la que el catalizador se satura en función del pH. Dado que, tal y como se ha explicado en la sección 1.2, la reacción Fenton está favorecida a un pH inferior, la [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] de saturación será mucho mayor a pH 4.5 que a pH 6.5, al haber más Fe disponible y no estar acomplejado por los OH<sup>-</sup> presentes a pH 6.5.

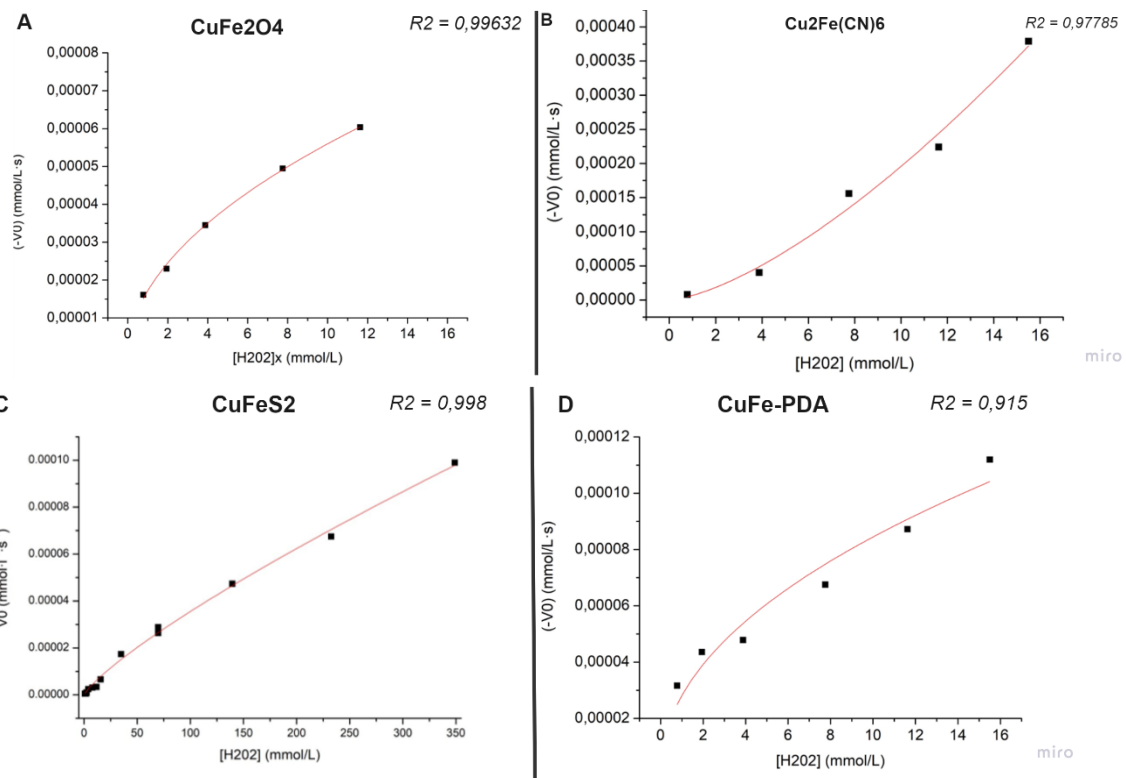


Figura 19: Ecuación de Michaelis Menten con la obtención de los ajustes con un valor de  $R^2$  : para a) Catalizador  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$  con  $R^2$  : 0,99332, b) Catalizador  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$  con  $R^2$ : 0,97785, c) Catalizador  $\text{CuFeS}_2$  con  $R^2$  : 0,998, d) Catalizador  $\text{CuFe-PDA}$  con  $R^2$  : 0,915.

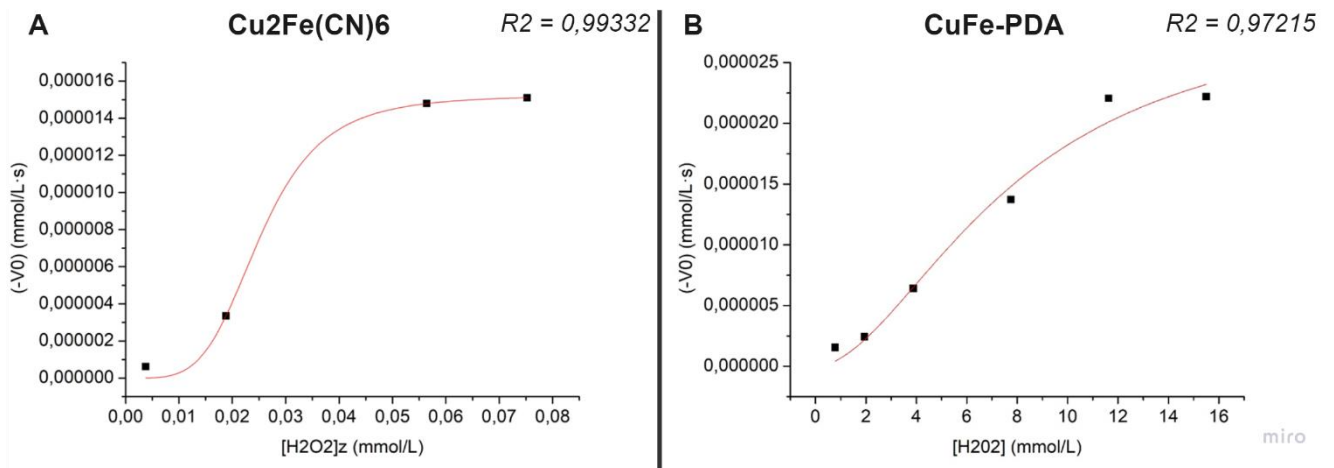


Figura 20: Ecuación de Michaelis Menten con la obtención de los ajustes con un valor de  $R^2$  : para a) Catalizador  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$  con  $R^2$  : 0,99332, b) Catalizador  $\text{CuFe-PDA}$  con  $R^2$  : 0,97215..

#### 4.2.4. Obtención de $V_{\text{Max}}$ y $K_{\text{M}}$ mediante la ecuación de Lineweaver-Burk.

Para obtener  $V_{\text{Max}}$  y  $K_{\text{M}}$  de cada catalizador se ajusta el parámetro obtenido experimentalmente,  $V_0$ , al modelo de Lineweaver-Burk explicado previamente en la sección 3.3.4., ecuación 6. Para ello, se representa  $1/V_0$  frente a  $1/\text{H}_2\text{O}_2$  y se ajustan los puntos obtenidos a la ecuación de una recta, de cuya pendiente y ordenada en el origen se determinan  $K_{\text{M}}$  y  $V_{\text{Max}}$ , respectivamente.

Las gráficas de Lineweaver-Burk obtenidas para los catalizadores a pH 4.5 se muestran en la Figura 21 (A-D), mientras que las obtenidas para pH 6.5 en la Figura 22 (A-B).

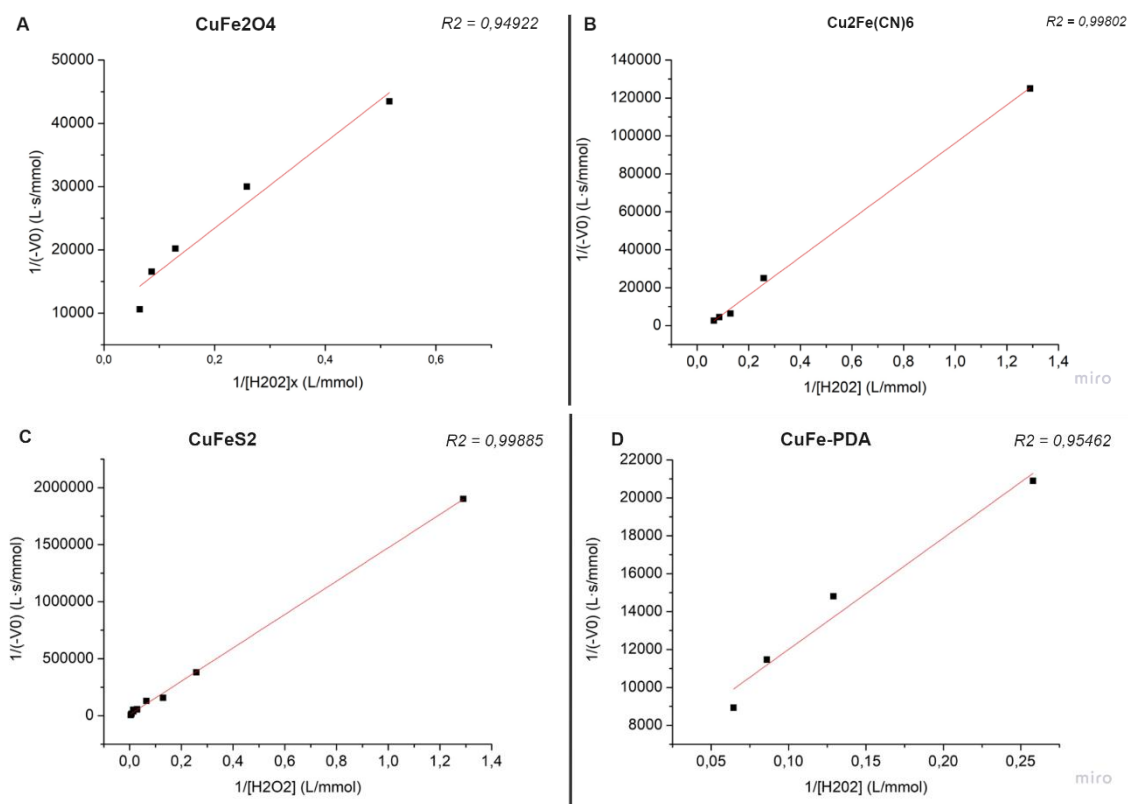


Figura 21: Ecuación de Lineweaver Burk a pH 4.5 para obtener y comparar las diferentes constantes catalíticas, ajustes y lineabilidad. a) Catalizador  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$  con  $R^2 : 0,94922$ , b) Catalizador  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$  con  $R^2 : 0,99802$ , c) Catalizador  $\text{CuFeS}_2$  con  $R^2 : 0,99885$ , d) Catalizador  $\text{CuFe-PDA}$  con  $R^2 : 0,95462$ .

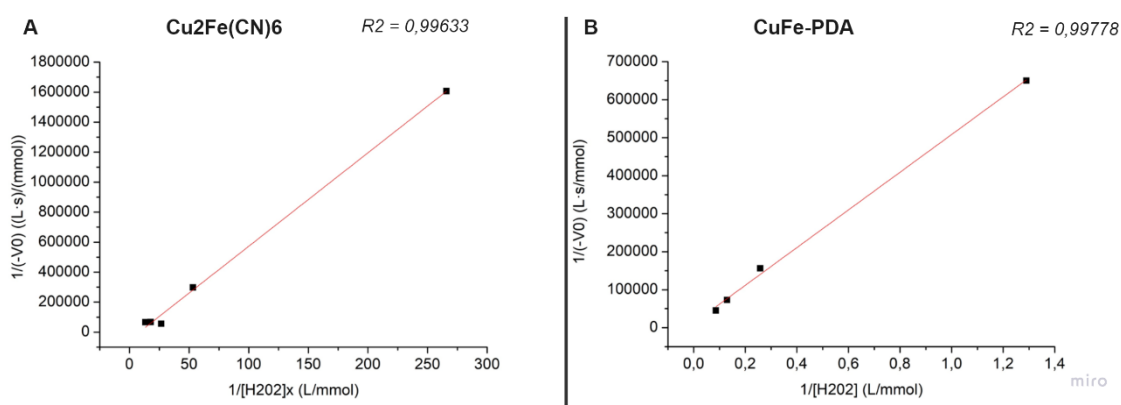


Figura 22: Ecuación de Lineweaver Burk a pH 6.5 para obtener y comparar las diferentes constantes catalíticas, ajustes y lineabilidad. a) Catalizador de  $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$  con un  $R^2 = 0,99633$ . b) Catalizador  $\text{CuFe-PDA}$  con un  $R^2 : 0,99778$ .

Los valores de  $K_M$  y  $V_{Max}$  obtenidos para los catalizadores  $CuFe_2O_4$ ,  $CuFeS$  y  $CuFe-PDA$  a  $pH = 4.5$  y para los catalizadores  $Cu_2Fe(CN)_6$  y  $CuFe-PDA$  a  $pH = 6.5$  se muestran en la Tabla 2 y Tabla 3, respectivamente.

Tabla 2: Valores de las constantes catalíticas a  $pH 4.5$  para los diferentes catalizadores.

Catalizador	$V_{m\acute{a}x}$ (mmol/L·s)	$K_m$ (mmol/L)	[Fe] (mmol/L)
$CuFe_2O_4$	1,01E-04	7	0,1788
$Cu_2Fe(CN)_6$	2,55E-04	25,55	0,1788
$CuFeS$	5,67E-05	56,72	0,1788
$CuFe-PDA$	1,63E-04	9,59	0,1788

#### $K_M$ y $V_{max}$ obtenidas a $pH = 4.5$ :

Los catalizadores que posee una  $K_M$  más baja, y por tanto presenta una mejor afinidad con el sustrato ( $H_2O_2$ ), son el  $CuFe_2O_4$  y  $CuFe-PDA$ . Esto puede deberse a que en el proceso de síntesis de los catalizadores  $Cu_2Fe(CN)_6$  y  $CuFeS$  se emplean ligando estabilizadores que potencialmente pueden ejercer un impedimento estérico sobre la adsorción de  $H_2O_2$  en la superficie del catalizador, dando lugar a una peor interacción catalizador-sustrato. Esta hipótesis cobra sentido atendiendo al tamaño de los ligandos empleados en los demás catalizadores: el catalizador funcionalizado con PEG;  $CuFeS$ , presenta la peor afinidad con el  $H_2O_2$  como consecuencia de un potencial impedimento estérico causado por el ligando.

La mayor  $V_{max}$  la presenta el catalizador  $Cu_2Fe(CN)_6$ . Sugerimos que ello puede deberse a un mayor % de Cu en la nanopartícula que actúe como co-catalizador para regenerar la especie activa en la reacción Fenton,  $Fe^{2+}$ , siguiendo el modelo descrito en la sección 1.2. No obstante, los valores de  $V_{max}$  de  $CuFe-CN$  y  $CuFe-PDA$  son del mismo orden de magnitud, por lo que la contribución de este efecto no es grande. En el caso del catalizador  $CuFe-PDA$ , aun logrando la mejor interacción con el sustrato, no se logran alcanzar  $V_{max}$  tan elevadas debido al menor % de Cu depositado, medido mediante MP-AES. El catalizador  $CuFe-S$  mostró ser el peor tanto en  $V_{Max}$  como en  $K_M$ .

Tabla 3: Valores de las constantes catalíticas a  $pH 6.5$  para los diferentes catalizadores.

Catalizador	$V_{m\acute{a}x}$ (mmol/L·s)	$K_m$ (mmol/L)	[Fe] (mmol/L)
$Cu_2Fe(CN)_6$	1,99E-05	0,12	0,1788
$CuFe-PDA$	7,97E-05	3,950	0,1788

#### $K_M$ y $V_{max}$ obtenidas a $pH = 6.5$ :

En primer lugar, el elevado valor de  $pH$  en el que se lleva a cabo la reacción hace que la actividad de los catalizadores  $CuFe_2O_4$  y  $CuFeS_2$  sea inexistente. El catalizador más sensible al  $H_2O_2$  fue el  $Cu_2Fe(CN)_6$  al mostrar la  $K_M$  más baja. Esto puede deberse a que, aun teniendo el ligando ácido cítrico sobre la superficie, los centros metálicos están bien protegidos del acomplejamiento con los iones  $OH^-$  presentes a  $pH = 6.5$ .

De manera opuesta, la ausencia de ligandos en el catalizador  $CuFe-PDA$  hace que los iones  $OH^-$  puedan acomplejar fácilmente a los átomos de Fe y Cu depositados sobre la superficie del

catalizador. No obstante, la  $V_{\max}$  alcanzada en el caso del catalizador CuFe-PDA es la mayor. La justificación puede radicar en las propiedades electrónicas de la PDA. Este polímero es rico en densidad electrónica que puede donar a los iones de  $Fe^{3+}$  para facilitar su reducción a  $Fe^{2+}$  la especie activa en la reacción Fenton. Además, experimentalmente se observó que un alta  $[H_2O_2]$  inhibía la actividad del catalizador CuFe-CN, presumiblemente debido a una descomposición del catalizador, ya que a altas  $[H_2O_2]$  se observaba la aparición de un precipitado macroscópico.

En cualquier caso, está claro que los catalizadores clásicos basados en óxidos y sulfuros sufren una desactivación muy fuerte a pH 6.5 y es necesario el uso de catalizadores con elementos estructurales, como los grupos -CN- o el *core* de PDA, más complejos.

#### 4.2.4 Cálculo de la constante catalítica, $k_{cat}$ .

La constante catalítica se calcula empleando la Ecuación 9, descrita en el apartado 3.4.5 del trabajo, donde  $V_{\max}$  es la velocidad obtenida en la ecuación de Michaelis Menten, y  $[Fe]$  es la cantidad normalizada utilizada para sacar los diferentes volúmenes de catalizador.

Tabla 4: Valores de la constante cinética de los catalizadores según el pH que favorece la reacción para cada uno de ellos. A) A pH 4.5, B) A pH 6.5.

pH 4.5	
Catalizador	$k$ (s-1)
$CuFe_2O_4$	5,66E-04
$Cu_2Fe(CN)_6$	1,43E-03
$CuFeS$	3,17E-04
$CuFe-PDA$	9,12E-04

pH 6.5	
Catalizador	$k$ (s-1)
$Cu_2Fe(CN)_6$	1,11E-04
$CuFe-PDA$	4,46E-04

Las  $k_{cat}$  obtenidas a pH 4.5 y 6.5 se muestran en la Tabla 4 A y B, respectivamente. Si comparamos los valores de la constante cinética para cada catalizador, observamos que su orden es el siguiente de mayor a menor,  $k_{Cu_2Fe(CN)_6} > k_{CuFe-PDA} > k_{CuFe_2O_4} > k_{CuFeS}$ . Puesto que los ensayos se hicieron a concentraciones de Fe equivalentes, el orden de las constantes catalíticas obtenidas es el mismo al de las  $V_{\max}$  calculadas. La constante indica la cantidad de veces que ocurre la reacción por segundo, y cuanto mayor es, más rápida es la reacción.

Por otro lado, el catalizador menos eficaz es a la hora de transformar el sustrato en producto es el  $CuFeS_2$ , lo cual también se refleja en el valor de la  $K_M$  y se observa que la afinidad entre el  $H_2O_2$ . Una hipótesis razonable es que debido a la baja estabilidad coloidal y la necesidad de emplear PEG para estabilizarlo es el principal problema respecto a la actividad catalítica de  $CuFeS$ .

Como se puede observar a pH 6.5 la  $k_{Cu_2Fe(CN)_6}$  es menor que a pH 4.5 lo cual se debe a que como se explicó en el apartado 1.1.2, a un pH cercano a 4, la reacción alcanza su máxima formación de Fe (OH) y con ello el catalizador favorece una velocidad de reacción más rápida.

Por otro lado, a pH de 6.5  $k_{Cu_2Fe(CN)_6} < k_{CuFe-PDA}$  y esto se debe a que el  $Cu_2Fe(CN)_6$  no es capaz de transformar tanto  $H_2O_2$  como el  $CuFe-PDA$ , el cual funciona mejor con una disolución más concentrada

## 5. CONCLUSIONES.

Durante el desarrollo del trabajo se hicieron una serie de ensayos y comparativas entre los diferentes catalizadores nanoestructurados basados en cobre y hierro sintetizados con diferente composición, y organización estructural con el objetivo principal de evaluar la sinergia de ambos metales de transición para regenerar la especie activa de la reacción, es decir  $\text{Fe}^{2+}$  y encontrar las condiciones óptimas para la reacción Fenton trabajada (con Fe y Cu, los cuales, al estar presentes a la vez en la reacción, cooperan mediante reacciones de reducción-oxidación).

La evaluación del comportamiento de los distintos catalizadores se ha realizado de manera sistemática mediante la monitorización de una única reacción basada en la oxidación de TMB. Estos ensayos se hicieron a pH 4.5 (pH presente en los lisosomas) y 6.5 (pH presente de las células tumorales). Los catalizadores que mostraron los resultados más prometedores a ambos pH fueron los sistemas híbridos de CuFe-CN y CuFe-PDA. Para pH = 4.5, CuFe-CN presentó la mayor  $k_{\text{cat}}$  y para pH =6.5, fue el catalizador CuFe-PDA.

El catalizador más eficiente para llevar a cabo la reacción Fenton dependerá de la ruta de internalización celular y posterior acumulación que siga cada catalizador, en función de la línea celular. En un hipotético escenario donde el catalizador CuFe-CN tienda a acumularse en lisosomas dentro de células tumorales, la reacción Fenton será más eficiente empleando este catalizador. Es por ello que como trabajo futuro se señalan los posibles estudios biológicos en células sanas/celulares empleando los catalizadores CuFe-CN y CuFe-PDA.

Parece por lo tanto importante destacar que al menos para reacciones específicas en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  la mayor accesibilidad de los sitios activos de Cu y Fe de los sistema híbridos y poliméricos es preferible a las estructuras tridimensionales más organizadas propias de los óxidos y calcogenuros híbridos. Asimismo, también se puede concluir que la estabilidad coloidal es otro factor de gran importancia y que la presencia de un exceso de agentes estabilizantes puede influir negativamente en la respuesta catalítica final en el entorno del tumor.

## Bibliografía

1. **Sociedad Española de Oncología Médica.** Las Cifras del Cáncer en España. [En línea] 2022. [www.seom.org](http://www.seom.org).
2. **Puente, Javier Dr y De Velasco, Guillermo Dr.** Sociedad Española de Oncología Médica. [En línea] 16 de Diciembre de 2019. <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>.
3. **Institute, National Cancer.** National Cancer Institute. [En línea] 5 de May de 2021. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
4. —. National Cancer Institute. [En línea] 23 de Agosto de 2022. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>.
5. **Society, American Cancer.** American Cancer Society. [En línea] <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento.html>.
6. *New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives.* **Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T.** 12 de Agust de 2021.
7. *El microambiente tumoral.* **Roche.**
8. *Angiogenesis.* **Adair, Thomas H. y Montani, Jean-Pierre.** San Rafael : Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.
9. *The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy.* **Muz, Barbara, y otros.** Washington University School of Medicine in St Louis, MO, USA : s.n., 11 de December de 2015 , National Library of Medicine.
10. *Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation.* **Vander Heiden, Matthew G, Cantley, Lewis C. y Thompson, Craig B. .** Boston, MA 02115, USA and Philadelphia, PA 19104, USA : s.n., 22 de May de 2019, National Library of Medicine.
11. *Tumor pH and its measurement.* **Zhang , Xiaomeng, Lin, Yuxiang y Gillies, Robert J .** Biomedical Engineering Program, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA. : s.n., 21 de Julio de 2010, National Library of Medicine.
12. *Strategies for enhancing cancer chemodynamic therapy performance.* **Jana, Deblin y Zhao, Yanli .** 7 de March de 2022, Exploration.
13. *Chapter 9 - Recent developments of iron-based nanosystems as enzyme-mimicking surrogates of interest in tumor microenvironment treatment.* **Bonet-Aleta, Javier, Calzada-Funes, Javier y Hueso, José L.** Zaragoza, Madrid. : s.n., 14 de January de 2022, Science Direct.
14. *Glutathione-Triggered catalytic response of Copper-Iron mixed oxide Nanoparticles. Leveraging tumor microenvironment conditions for chemodynamic therapy.* **Bonet-Aleta, Javier, y otros.** 19 de Marzo de 2022, Science Direct, Vol. 617, págs. 704-717.
15. **Forbes, Michael S.** *Liver Physiology and Energy Metabolism.* Fourth Edition. s.l. : Academic Press, 2022. págs. 67-83.
16. *Tumor Microenvironment-Enabled Nanotherapy.* **Wang, Liying, y otros.** Shanghai, China. : National Library of Medicine, 28 de December de 2017, Advanced Healthcare Materials.
17. *Regulating the absorption spectrum of polydopamine.* **Zou, Yuan, y otros.** China : s.n., 4 de September de 2020, National Library of Medicine.

18. *Biomedicine Meets Fenton Chemistry*. **Tang, Zhongmin, y otros**. 25 de January de 2021, ACS Publications.
19. **Nelson, David L, Lehninger, Albert L y Cox, Michael M.** *Lehninger Principles of Biochemistry*. Ilustrada. Wisconsin-Madison. : W. H. Freeman, 2008, 2008. pág. 1158.
20. *Structure and magnetic properties of copper(II)*. **Ng, C.W., y otros**. Singapore : Elsevier, 8 de September de 2000, Journal of Physics and Chemistry of Solids., págs. 767-775.
21. *All-in-One Theranostic Nanoagent with Enhanced Reactive Oxygen Species Generation and Modulating Tumor Microenvironment Ability for Effective Tumor Eradication*. **Liu, Yang, y otros**. s.l. : ACS Publications, 4 de May de 2018, ACS NANO, págs. 4886–4893.
22. *Structural, optical, and hole transport properties of earth-abundant chalcopyrite (CuFeS<sub>2</sub>) nanocrystals*. **Bastola, Ebin, y otros**. 4 de July de 2018, Springer Link, págs. 970-978.
23. *Long-Lasting Reactive Oxygen Species Generation by*. **Ding, Tao, y otros**. s.l. : Advanced Functional Materials.
24. *Mutual Benefit between Cu(II) and Polydopamine for Improving*. **Zhang, Wen-Xin , y otros**. s.l. : ACS Publications, 4 de August de 2021, ACS Applied Materials and Interfaces.
25. *Nanozymes: Classification, Catalytic Mechanisms, Activity Regulation, and Applications*. **Huang, Yanyan, Ren, Jinsong y Qu, Xiaogang**. s.l. : ACS Publications, 25 de February de 2019, Chemical Reviews.

## 6. ANEXOS.

### 6.1. Caracterización. Equipos utilizados y preparación de muestra

#### 6.1.1 Caracterización mediante espectroscopía de emisión atómica de plasma de microondas (Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy, MP-AES)

Utilizamos el MP-AES, en un sistema Agilent Technologies 4100, para obtener las cantidades de metales de interés presentes en las muestras, de cara a obtener la cantidad de cobre y de hierro que hay en cada una de ellas. Además de preparar una serie de patrones para dar lugar a la recta de calibrado a usar. Este análisis se ha hecho mediante una digestión ácida de las nanopartículas con agua regia A un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de muestra, se añaden 180  $\mu\text{L}$  de (3:1 HCl:HNO<sub>3</sub>), mezcla la cual deberá mantenerse a una temperatura de 60°C durante un tiempo de digestión de al menos 8h). Al pasar las muestras por el equipo los átomos se excitan de tal forma que permite cuantificar la cantidad de metal exacta que contienen las alícuotas de las muestras.

#### 6.1.2 Caracterización mediante microscopía de transmisión electrónica (Transmission Electron Microscopy, TEM).

La morfología y tamaño de los nanocatalizadores se determinaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un sistema FEI TECNAI T20 (Tecnai, Eindhoven, Países Bajos) operado a 200 kV. Las muestras se prepararán depositando 5  $\mu\text{L}$  de una disolución diluida de la nanopartícula sobre una rejilla de níquel con un depósito de carbono tipo *Holey* (*Electron Microscopy Sciences*, Hatfield, PA, EE. UU.). También se tomaron imágenes mediante el modo de microscopía electrónica de transmisión de barrido acompañada de fluorescencia de rayos X por energías dispersivas (STEM-EDS) para obtener información estructural y de composición química de nanoestructuras individuales a nivel atómico con ayuda de un Microscopio Electrónico Tipo Titán con lentes de corrección de aberración.

Para analizar el tamaño de las partículas de los diferentes catalizadores en TEM, se utilizó el programa de Image J, además del programa OriginPro 8, para representar gráficamente el número de partículas y su diámetro.

#### 6.3.3. Caracterización estructural por difracción de rayos X (X-ray diffraction, XRD).

La estructura cristalina de los catalizadores inorgánicos se determinaron mediante Difracción de Rayos X (XRD), con una fuente de irradiación CuK(Alpha). La muestra se prepara depositando la disolución de la nanopartícula sobre un porta-muestras de borosilicato  $\varnothing = 9 \text{ mm}$ , 100 pcs), suspendiéndola mediante la adición de una gota con una pipeta Pasteur y, posteriormente, dejándola secar a temperatura ambiente.

#### 6.3.4 Caracterización por espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR).

En el caso de la identificación de los grupos funcionales se utiliza la espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR), en un equipo Vertex 70, cuyas muestras se preparan depositando la disolución de la nanopartícula sobre un porta-muestras de borosilicato  $\varnothing = 9$  mm, 100 pcs), suspendiéndola mediante la adición de una gota con una pipeta Pasteur y, posteriormente, dejándola secar a temperatura ambiente.