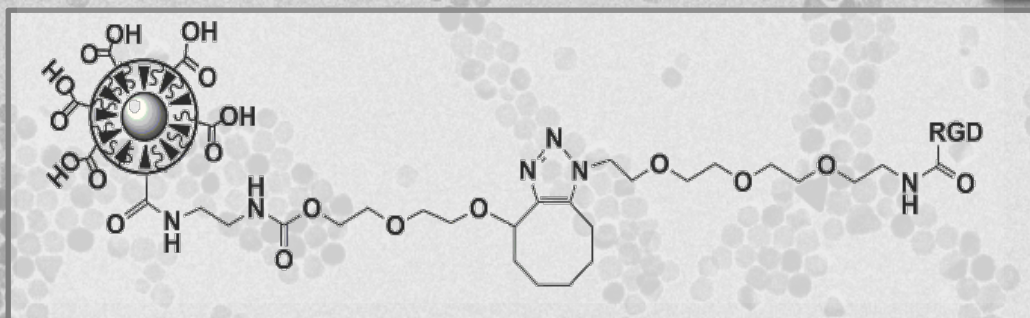
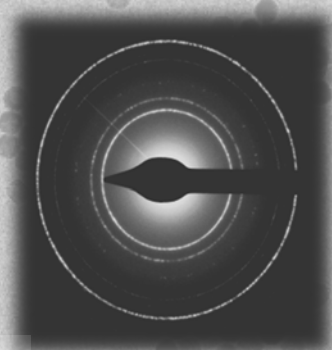




Funcionalización y estudio de nanopartículas de magnetita para su aplicación en terapias de hipertermia magnética



Memoria que presenta
Oihane K. Arriortua Llarena
Para optar al grado de Doctora

Noviembre, 2015

A mis padres...

AGRADECIMIENTOS

Una vez llegas hasta aquí y echas la vista atrás te das cuenta de la cantidad de personas que te han apoyado y cuyos granitos de arena se encuentran entre estas páginas. Algunos de ellos se cruzaron en mi vida una única vez y, sin embargo, su ayuda y conocimientos quedaron impresos para siempre. Otros muchos han estado a mi lado estos cuatro años (e incluso más) prestándome su apoyo y confianza para que pudiese llegar hasta este momento.

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. Maite Insausti y al Prof. Luis Lezama, por estar ahí durante estos cuatro años cada vez que me bloqueaba y por su dedicación y enorme paciencia como directores. Y no sólo eso, ya que al final de la licenciatura hicieron que recobrara mi ilusión por la química con sus clases y, desde entonces, me han guiado de la mejor manera posible. Les estaré eternamente agradecida.

También quisiera agradecer al Prof. Teófilo Rojo el permitirme formar parte de su grupo de investigación y por todas las facilidades y apoyos que ofrece a cada uno de sus componentes, favoreciendo nuestro crecimiento profesional y la labor investigadora. Por otro lado, quisiera dar las gracias al Ministerio de Ciencia e Innovación la concesión de una beca predoctoral que me ha dado la oportunidad de comenzar una etapa en el campo de la investigación.

Me siento también enormemente agradecida por toda la ayuda prestada y su gran dedicación a la Dra. Izaskun Gil de Muro y al Dr. Iñaki Orue, no solo en la parte experimental sino también en la interpretación de las medidas de Microscopía Electrónica de Transmisión y Magnetometría, respectivamente, una parte fundamental de este trabajo.

Asimismo, me gustaría dedicarles un agradecimiento especial al Prof. Fernando Plazaola, al Prof. Jesús María Aizpurua, al Dr. José Javier Echevarría Uruga, al Prof. Jose Angel García, al Prof. Néstor Etxebarria, al Dr. Ignacio García-Alonso, al Dr. Eneko Garaio, a Maialen Sagartzazu, a Mireia Irazola y a Borja Herrero por su esfuerzo y dedicación en la colaboración entre diversos departamentos de la UPV/EHU que ha dado lugar

a una prometedora línea de investigación de carácter interdisciplinar, parte de cuyos resultados han quedado manifiestos en esta memoria.

Al Dr. Jesús Martínez de la Fuente, investigador del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA), y a la Dr. María del Puerto Morales, del Instituto de Ciencias de Materiales de Madrid (ICMM) les agradezco enormemente su grandísima aportación en el desarrollo del apartado de transferencia a fase acuosa y conjugación de péptidos de esta investigación. Además, quisiera agradecerles profundamente la invitación a sus laboratorios, mediante la cual he aprendido estrategias sintéticas de gran importancia; agradecerles asimismo, su atención y disposición a la hora de comentar los resultados y de resolver mis dudas.

También quiero dar las gracias a todas las personas que han colaborado en las medidas aquí presentadas. En general, a todos los miembros de los Servicios Generales de Investigación (SGIker), comenzando por su directora la Prof. Maribel Arriortua, por aportar su apoyo profesional y cercano; y particularmente, al Dr. Luis Bartolomé por las medidas de análisis elemental y a los Dres. Javier Sangüesa y Aitor Larrañaga por las medidas de DRX.

Por otra parte, también quiero dar las gracias a todos mis compañeros de departamento (Xabi, Javi Salado, Vero, las dos Paulas, Beñat, Aroa, Iñigo, Mónica, Javi Cepeda, Sonia,...) y a todos los que pasaron por este despacho y dejaron una gran huella (Ricardo, Idoia, Omar, Maider, Aritza, Nahima, Manu, Isaen, Xabi, Imanol...). Gracias de verdad por compartir tantas horas conmigo, los lunes se vuelven felices con vosotros. Idoia, tú me ayudaste a dar mis primeros pasitos en este laboratorio y tu entusiasmo se me contagió desde el minuto uno. Paula y Vero, gracias por poner la cordura en este laboratorio pero siempre con una sonrisa. Paulita, aunque no te veo mucho cada vez que vienes me llenas de alegría y, no sé cómo lo haces, pero solo tienes palabras acertadas. Omar, a pesar de nuestras riñas fingidas eres el mejor MacGyver que podría pedir. Maider y Aritza, gracias por vuestras tertulias y consejos y por estar ahí cuando os necesito aún sin expresarlo en voz alta. Nahimita, gracias por complementarme tan bien en el laboratorio y por acompañarme siempre en mis bromas, aunque sean nefastas. Y cómo no, dar las gracias a Xabi y a Laura que, desde que realizaron la licenciatura

conmigo, me han prestado siempre su hombro tanto para reír como para llorar en los momentos menos buenos. Me llevo grandes amigos y recuerdos de todos ellos.

También quería agradecer enormemente a todos los que me acogieron y me ayudaron tanto en mi estancia en el INA de Zaragoza como en el ICMM de Madrid. A mis compañeros (Sara, María, Yulan, Inés, Graz, Mari Carmen, Rocío, Marzia, Gelines, Iván, Violeta, Rubén,...) por hacerme sentir feliz y apoyada y ayudarme en todo momento, a estar como en casa. Sara y María, gracias por ser mis guías durante las dos estancias que hice en Zaragoza, por todo lo que me enseñasteis y vuestro cariño. Gracias a Mari Carmen y a Inés, porque sin vosotras no habría sido igual. Rocío, aunque estés lejos me llevé una gran amiga y mejor mentora. Gelines, Marzia, Violeta e Iván, gracias por incluirme en vuestros planazos madrileños, lo mejor para la rutina. Y a ti Rubén, por alegrarme todos los días de la estancia con tus chichadas, eres genial. Volvería a visitaros una y mil veces.

Indudablemente quería agradecer de corazón el apoyo de mis amigas de toda la vida (Desi, Olaia, Ene, Vir, Mai, Amayita,...). Desi y Olaia, gracias por hacerme valorar lo que llevo realizando estos cuatro años, por compartir todos mis momentos de frustración y alegría. Todas vosotras lleváis a mi lado desde hace mucho tiempo y no cambiaría ni un solo minuto de vuestra amistad. Gracias por todas las noches divertidas y días de puesta en común, y los que quedarán. Mary y Yure, aunque estemos separadas durante largo tiempo al encontrarnos vuelvo a sentir lo mismo que cuando teníamos diez años y jugábamos a cocinitas a orillas del mar castreño. Estas son las amigas de verdad, las que permanecen ahí por mucho que llueva y no se van con la marea.

Quisiera finalmente agradecer a toda mi familia (los que están y los que no) por su cariño y apoyo sin límites, por sus charlas y consejos, por ser mi familia. A mis primos (Maite, Josu, Eneko, Borja, Iraia y Paula) que a falta de hermanos han ocupado su lugar. Gracias en especial a mis tías Itxaro, Elena, Tate y Bego que siempre velan por lo mejor para mí y me socorren siempre que lo necesito. A mi tía Maribel, este trabajo es en gran parte por y para ti, tú me transmitiste desde pequeña el amor y curiosidad por la esencia de lo que

nos rodea. Desde que me regalaste aquel pequeño juego de geología te convertiste en uno de mis ejemplos a seguir.

Y, por supuesto, doy las gracias a mis padres, que me han ofrecido lo más importante en esta vida que no es otra cosa que su presencia. Y sin conformarse con eso, me han dado todo su amor y comprensión, sin condiciones. Ellos me han enseñado que el amor y el esfuerzo con que haces las cosas es lo que las define. Pero lo más importante, que cada átomo que conforma nuestra existencia tiene un plan para nosotros.

Introducción	3
<i>Bibliografía</i>	21
Objetivo del trabajo	27
Capítulo I. Química Preparativa	
<i>I.1. Introducción</i>	31
<i>I.2. Obtención de NPs de Fe₃O₄</i>	39
<i>I.3. Traslferencia a fase acuosa</i>	46
<i>I.3.1. Intercambio de ligando con DMSA</i>	46
<i>I.3.2. Recubrimiento con TEOS</i>	48
<i>I.3.3. Recubrimiento con TESPMA</i>	49
<i>I.3.4. Recubrimiento de las NPs con PMAO</i>	51
<i>I.4. Funcionalización con el péptido RGD modificado</i>	52
<i>I.5. Bibliografía</i>	60
Capítulo II. Caracterización	
<i>II.1. Difracción de Rayos X (DRX)</i>	69
<i>II.2. Análisis Termogravimétrico (TGA)</i>	72
<i>II.3. Espectroscopia Infrarrojo (F-TIR)</i>	76
<i>II.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)</i>	83
<i>II.5. Difusión Dinámica de Luz (DLS)</i>	96
<i>II.6. MALDI-Espectroscopia de Masas</i>	101
<i>II.7. Resonancia Magnética Electrónica (RME)</i>	107
<i>II.8. Magnetometría</i>	120
<i>II.9. Hipertermia Magnética</i>	132

II.10. Discusión 144

II.11. Bibliografía 147

Capítulo III. Ensayos Preclínicos

III.1. Ensayos in vitro 157

III.1.1. Procedimiento experimental 163

III.2. Ensayos in vivo 167

III.2.1. Procedimiento experimental..... 170

*III.2.2. Hipertermia magnética en ratas infundidas con NPs por
inyección directa tumoral* 173

*III.2.3. Estudio de la distribución de las nanopartículas en tejido
hepático* 175

*III.2.4. Hipertermia magnética en ratas infundidas con NPs por vía
intrarterial* 180

III.3. Discusión 184

III.4. Bibliografía 188

Conclusiones 195

ANEXO A.

Técnicas Experimentales 199

A.1. Análisis Termogravimétrico (TGA)..... 200

A.2. Espectroscopía Infrarrojo (IR)..... 201

A.3. Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis) 204

A.4. Difracción de Rayos X 207

A.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) 208

A.6. Dispersión Dinámica de Luz (DLS) 213

<i>A.7. Espectroscopia de Masas-MALDI</i>	216
<i>A.8. Resonancia Magnética Electrónica (RME)</i>	220
<i>A.9. Magnetometría</i>	224
<i>A.9.1. Magnetómetro Tipo SQUID (Superconducting Quantum Interference Device)</i>	225
<i>A.9.2. Magnetómetro de Muestra Vibrante (VSM)</i>	227
<i>A.9.3. Curvas ZFC/FC</i>	228
<i>A.9.4. Imanación en Sistemas de Partículas Monodominio</i>	233
<i>A.10. Hipertermia Magnética</i>	235
<i>A.11. Bibliografía</i>	244

ANEXO B.

Reactivos y Disolventes	247
--------------------------------------	-----

ANEXO C.

Información Suplementaria	253
--	-----

INTRODUCCIÓN

Introducción

El profundo estudio y conocimiento de los materiales a escala atómica, ha originado el espectacular desarrollo de la nanotecnología en las últimas décadas. La posible descomposición de los materiales en sustancias simples, a pesar de ser un factor limitante en el descubrimiento de grandes innovaciones es, sin embargo, el punto de partida de la nanociencia, un área interdisciplinar que promete dar respuesta a gran número de problemas y necesidades de la sociedad actual (Figura 1).

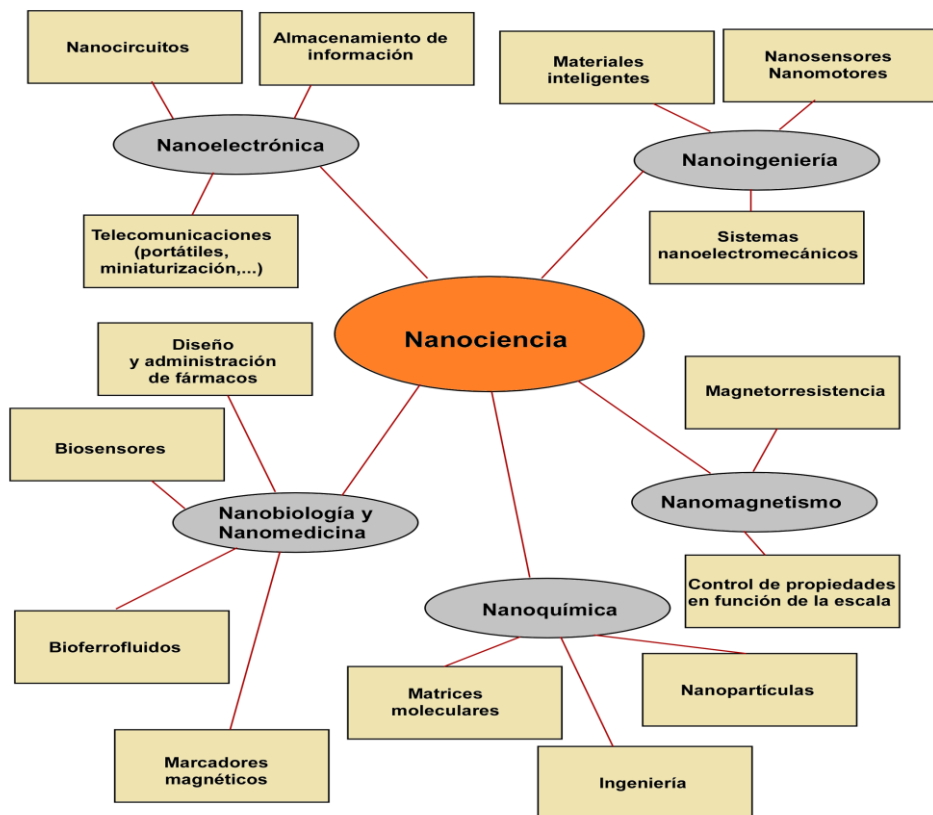


Figura 1. Diagrama de las diferentes disciplinas relacionadas con la nanociencia.

El comienzo de esta andadura nanotecnológica se sitúa en 1959 cuando el estadounidense Richard Feynman, premio Nobel de Física en 1965, se dirigió a la American Physical Society con la conferencia premonitrice

Introducción

“There’s plenty of room at the bottom”¹ destacando los beneficios que aportaría a la sociedad la capacidad de trabajar con átomos y moléculas y fabricar dispositivos con una precisión de unos pocos nanómetros. Años más tarde, una vez desarrolladas las técnicas experimentales que permiten caracterizar y manipular la materia a escala nanométrica, la nanotecnología irrumpió definitivamente en la comunidad científica². Dado que las propiedades estructurales y electrónicas de un sólido determinan el comportamiento físico-químico del mismo, al reducir el tamaño del material por debajo de un tamaño crítico, aparecen variaciones en las propiedades (magnéticas, ópticas, térmicas, conductoras, mecánicas o catalíticas...) de los mismos³ debido a los efectos de confinamiento cuántico y de superficie.

En el caso de las partículas magnéticas, la reducción de volumen condiciona el cambio de comportamiento magnético del material ya que sufre una transición del estado ferro o ferrimagnético a superparamagnético donde, por efecto de la energía térmica, el momento magnético de cada partícula fluctúa de dirección siendo el momento magnético neto igual a cero⁴.

Para que una partícula macroscópica tenga todos los spines alineados sería necesaria una elevadísima anisotropía cristalina que compensara la tendencia espontánea de la partícula a reducir su energía magnetostática mediante la creación de dominios magnéticos, separados por paredes de Bloch. Sin embargo, si el tamaño de partícula se reduce por debajo del tamaño típico de dominio magnético, la formación de estos dominios se vuelve energéticamente desfavorable, ya que la formación de una pared de Bloch desestabiliza más el sistema que la propia energía magnetoestática, de modo que en este caso la interacción de canje predomina en el sistema. Es entonces cuando se forma un monodominio magnético (un superespín), cuyo comportamiento magnético depende críticamente de la temperatura.

Considerando un conjunto de nanopartículas (NPs) monodominio, con anisotropía uniaxial, cada una con un momento magnético $\mu = M_S V$, siendo M_S

¹ Feynman, R. P. *Engineering and Science* (1959): 1-8.

² Gatteschi, D.; Fittipaldi, M.; Sangregorio, C.; Sorace, L. *Angew. Chem.* 51 (2012): 4792-4800.

³ Xia, Y.; Xiong, Y.; Lim, B.; Skrabalak, S. E. *Angew. Chem.* 48, no. 1 (2009): 60-103.

⁴ Ho, D.; Sun, X.; Sun, S. *Changes* 29, no. 10 (2012): 997-1003.

la imanación de la partícula y V el volumen de cada partícula, en estas nanopartículas monodominio uniaxiales la imanación se dirige paralela o antiparalelamente a una dirección concreta llamada *eje fácil*. Este eje es el resultado de las diferentes contribuciones anisotrópicas debido a la forma de la partícula, tensiones, estructura cristalina, etc, que dan lugar, en general a una anisotropía efectiva de carácter uniaxial. De esta manera cada nanopartícula tiene una energía de anisotropía, $E = KV \sin^2 \theta$, donde K es la constante de anisotropía y θ es el ángulo entre el momento magnético, μ , y el eje fácil. Para una nanopartícula concreta, la barrera de energía, $E_{\max} - E_{\min} = KV$ es la energía que separa los dos mínimos o estados de fácil imanación que aparecen a $\theta = 0$ y 180° , los cuales corresponden a los casos en los que la imanación de la nanopartícula se sitúa paralela o antiparalelamente al eje fácil.

L. Néel ya indicó en 1949⁵ que si las nanopartículas monodominio eran lo suficientemente pequeñas, la barrera de energía, KV , se volvería tan pequeña que las fluctuaciones de la energía térmica podrían superarla y hacer que la imanación de una nanopartícula se invirtiera espontáneamente de un sentido de fácil imanación a otro en ausencia de campo magnético aplicado.

$$L(x) = \coth(x) - \frac{1}{x} \quad (1)$$

Si el sistema de nanopartículas está suficientemente diluido y no existen, por tanto, interacciones apreciables entre las mismas, se puede aplicar la teoría clásica del paramagnetismo. Entonces la curva de la imanación del conjunto de nanopartículas, M , frente al campo magnético, H , se puede representar por una *función de Langevin*, cuya forma se presenta en la Figura 2.

⁵ Néel, L. *Comptes Rendus* 228 (1949): 664–666.

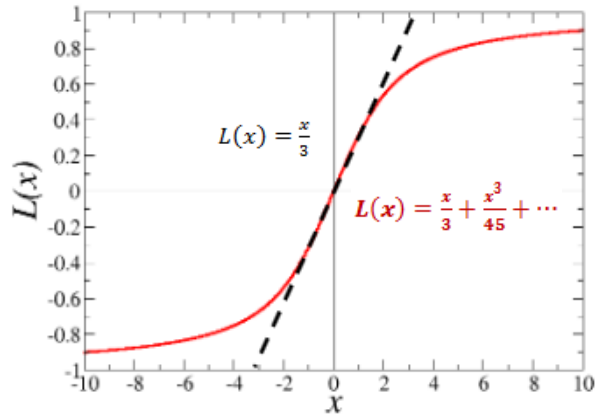


Figura 2. Función de Langevin que describe el para o superparamagnetismo clásico. La recta de color negro es la aproximación a campos bajos o temperaturas altas $x \ll 1$.

donde $x = \mu H / k_B T$, siendo k_B la constante de Boltzmann. El término x describe la competencia entre la energía magnética, que tiende a alinear el momento con el campo, y la energía térmica, que tiende a desalinarlo. Para campos bajos esta función es aproximadamente $\mu H / 3k_B T$, mientras que para campos altos cerca de la saturación es igual a $1 - k_B T / \mu H$.

De esta manera, la imanación de un conjunto de nanopartículas idénticas vendrá dada por la expresión:

$$M = n\mu L(x) \tag{2}$$

siendo n el número de nanopartículas por unidad de volumen, μ el momento magnético de cada una de ellas, y $L(x)$ la función de Langevin.

Debido al elevado momento magnético μ , de las nanopartículas, el valor de x puede llegar a ser bastante apreciable incluso a valores reducidos de campo aplicado (y a temperatura ambiente), al contrario de lo que suele ocurrir en sistemas paramagnéticos ordinarios. Fue en 1959 cuando Bean y Livingston⁶ bautizaron este tipo de comportamiento con el nombre de *superparamagnetismo*, *SPM*. De modo que este sistema de nanopartículas diluido se dice que se encuentra en estado superparamagnético cuando se cumplen las siguientes condiciones:

⁶ Bean, C. P.; Livingston, J. D. *J. App. Phys.* 30, no. 120 (1959).

- 1- Las curvas de imanación, $M(H)$, medidas a distintas temperaturas se solapan cuando se representa M frente a H/T .
- 2- No aparece histéresis alguna, de manera que la coercitividad y la remanencia son nulas.

La histéresis aparece y el superparamagnetismo desaparece cuando partículas de un cierto tamaño se enfrían hasta una temperatura en particular, o cuando, para una temperatura concreta, el tamaño de las partículas aumenta por encima de un cierto diámetro. Para determinar estos valores críticos de la temperatura y del tamaño, ha de analizarse la manera en la que el sistema se aproxima al equilibrio térmico.

No obstante, en todos los sistemas de nanopartículas magnéticas existen diferentes tipos de interacciones entre las mismas, cuya intensidad varía en función del volumen, el momento de dichas partículas, la existencia o no de contacto entre ellas, y el ordenamiento de corto y medio alcance del conjunto de partículas, como pueden ser las interacciones dipolares. Estas singularidades en el comportamiento magnético han originado que el campo del nanomagnetismo haya experimentado un importante apogeo en las últimas décadas.

Este hecho, unido a que la escala de tamaños de estas nanopartículas magnéticas es similar a las unidades básicas biológicas, como componentes celulares, ADN, cromosomas,... (Figura 3) conlleva a que estos sistemas, a partir de los años 90, comenzaran su incursión en el área de Biomedicina, adquiriendo una especial relevancia.

Introducción

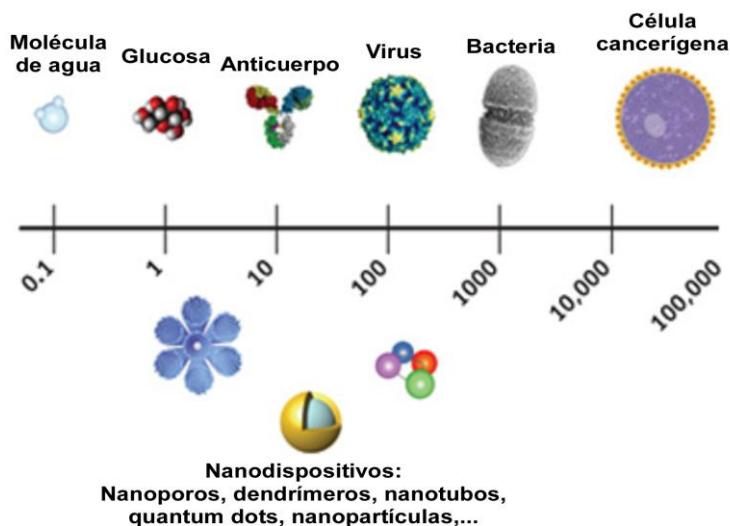


Figura 3. Representación esquemática de diferentes especies biológicas en comparación con los nanodispositivos.

Entre las partículas magnéticas de interés biológico se encuentran las nanopartículas de óxido de hierro (magnetita o maghemita) en dispersiones acuosas⁷, que ya se están utilizando como prometedores agentes de detección y análisis, o en diferentes terapias (Tabla 1). El hecho de que los óxidos de hierro sean fácilmente metabolizados dentro del organismo, que su superficie pueda ser modificada para su funcionalización mediante biomoléculas de interés, que las partículas posean un elevado momento magnético y que las líneas de campo puedan atravesar el cuerpo humano, convierte a las nanopartículas de óxido de hierro en materiales prometedores a corto plazo en medicina⁸.

⁷ Tartaj, P.; Morales, M. P.; Gonzalez-Carreño, T.; Veintemillas-Verdaguer, S. Serna, J. C. Ad. Func. Mater. 23 (2011): 5243–5249.

⁸ Roca, A. G.; Costo, R.; Rebolledo, A. F.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Tartaj, P.; González; Carreño, T.; Morales, M. P.; Serna, C. J. J. Phys. D 42 (2009): 224002.

Tabla 1. Diferentes aplicaciones en biomedicina de las nanopartículas magnéticas; mecanismos de acción y requisitos de las partículas.

Tratamiento	Mecanismo	Requisitos
Diagnóstico (MRI)	-Reducción de los tiempos de relajación de los H ⁺ del organismo.	- Biocompatibles
Transporte de fármacos	-Liberación del fármaco mediante campo magnético externo.	- Superparamagnéticas - Elevado momento magnético - Funcionalización específica
Hipertermia magnética	- Unión a las células tumorales y calentamiento mediante aplicación de campo magnético externo.	- Inertes

Así, las nanopartículas magnéticas han emergido como eficaces agentes de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI)⁹ debido a su capacidad para reducir los tiempos de relajación de los protones presentes en el organismo, a partir de los cuales se genera la imagen. El empleo de agentes que aumenten el contraste en tejidos específicos permite aumentar la sensibilidad de la técnica en cuanto a la diferenciación de tejidos dañados y de tejidos sanos.

Otra de las aplicaciones de las nanopartículas magnéticas es la liberación controlada de fármacos¹⁰. El concepto de “magnetic targeting” (o focalización magnética) consiste en inyectar nanopartículas magnéticas, enlazadas con moléculas-fármaco, en el cuerpo y guiarlas mediante campos externos localizados a regiones específicas, manteniéndolas en la zona hasta que la terapia se haya completado¹¹. La liberación controlada de fármacos tiene la ventaja de poder transportar grandes cantidades de fármaco a un lugar

⁹ (a) Niemirowicz, K.; Markiewicz, K. H.; Wilczewska, A. Z.; Car, H. *Advances in Medical Sciences* 57, no. 2 (2012): 196–207. (b) Kenouche, S.; Larionova, J.; Bezzi, N.; Guari, Y.; Bertin, N.; Zanca, M.; Lartigue, L.; Cieslak, M.; Godin, C.; Morrot, G.; Goze-Bac, C. *Powder Technology* 255 (2014): 60–65.

¹⁰ (a) Oka, C.; Ushimaru, K.; Horiishi, N.; Tsuge, T.; Oka, C.; Ushimaru, K.; Horiishi, N.; Tsuge, T.; Kitamoto, Y. *J. Magn. Magn. Mater.* 381 (2015): 278–284. (b) Oka, C.; Ushimaru, K.; Horiishi, N.; Tsuge, T.; Kitamoto, Y. *Nanomedicine* 9, no. 7 (2013): 961–971.

¹¹ Ye, F.; Barrefelt, Å.; Asem, H.; Abedi-Valugerdi, M.; El-Serafi, I.; Saghafian, M.; Abu-Salah, K.; Alrokayan, S.; Muhammed, M.; Hassan, M. *Biomaterials* 35, no. 12 (2014): 3885–3894.

Introducción

determinado evitando daños y efectos adversos en zonas del organismo no afectadas¹²(Figura 4). Existen diversos ejemplos de técnicas de control para la liberación de medicamentos: bombas con diferentes velocidades de flujo, polímeros sensibles al pH o a la temperatura, moléculas donde la liberación del fármaco se activa por una reacción química, por un disolvente o enzima, por difusión, y sistemas que liberan el fármaco en respuesta a un estímulo externo como ultrasonidos, estímulos eléctricos, fotoirradiación o a un campo magnético. En este último caso, el objetivo de las NPs magnéticas es dirigir el fármaco a una zona determinada mediante un campo magnético externo y mediante pequeñas vibraciones (mediante un campo alterno, AC) poder liberarlo, de esta forma el magnetismo del sistema puede ser moderado.

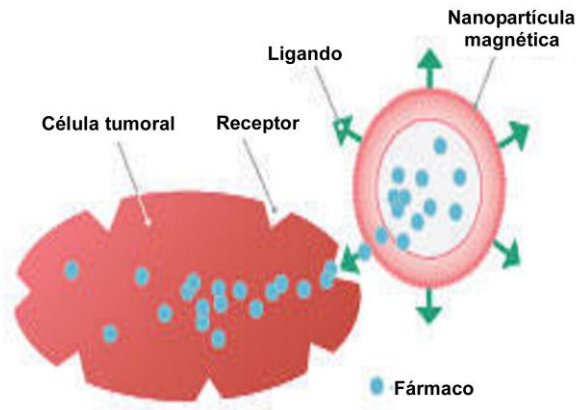


Figura 4. Esquema representativo de la focalización de NPs en el tumor.

Las nanopartículas magnéticas también presentan potenciales aplicaciones en terapias como la hipertermia magnética. La terapia por hipertermia se basa en el hecho de que las células tumorales son más termosensibles que las células sanas, de manera que aumentando la temperatura hasta un valor determinado se podrían dañar selectivamente las células tumorales¹³. No obstante, los tejidos sanos circundantes al tumor también suelen ser afectados por la inducción de calor. El Instituto Nacional

¹² Marszall, M. P. *Pharm. Res.* 28, no. 3 (2011): 480–483.

¹³ Van der Zee, J. *Annals of Oncology* 13, no. 8 (2002): 1173–1184.

del Cáncer reconoce tres tipos diferentes de tratamientos de hipertermia. Con la hipertermia local se calienta un área muy pequeña, por lo general el tumor en sí. En algunos casos, el objetivo es eliminar el tumor "cocinándolo", sin dañar a las células saludables de alrededor. El calor se puede generar con energía de ultrasonido, microondas, radiofrecuencia, o el uso de hipertermia magnética. Dependiendo de la localización del tumor, el calor puede aplicarse en la superficie del cuerpo o en lo profundo del tejido mediante el uso de agujas o sondas. Un tipo bastante común es la ablación por radiofrecuencia de tumores pequeños¹⁴. Este hecho es más fácil de lograr cuando el tumor se encuentra en una parte superficial del cuerpo, y se denomina hipertermia superficial, o cuando las agujas o las sondas se introducen directamente en el tumor, lo que se denomina hipertermia intersticial¹⁵.

Mediante el concepto de hipertermia regional, se calienta una superficie mayor del cuerpo, como un órgano completo, o una extremidad. Por lo general, el objetivo es debilitar a las células cancerosas de manera que sean más propensas a ser destruidas por la radiación y los medicamentos de quimioterapia. Este tipo de hipertermia puede utilizar las mismas técnicas que se usan en el tratamiento de la hipertermia local, o puede utilizar una técnica de perfusión sanguínea¹⁶. En este último caso, la sangre se extrae momentáneamente del cuerpo del paciente, se calienta, y es retornada a los vasos sanguíneos que conducen directamente a la parte del cuerpo a tratar. Normalmente, se administran medicamentos de quimioterapia al mismo tiempo. Un caso particular sería la perfusión peritoneal de hipertermia continua (CHPP), utilizada para tratar cánceres difíciles de abordar dentro de la cavidad peritoneal (abdomen), como el mesotelioma peritoneal primario o el cáncer de estómago. Los medicamentos de quimioterapia calientes se administran directamente en la cavidad peritoneal para eliminar las células cancerosas¹⁷.

¹⁴ Dollinger, M. *Everyone's Guide to Cancer Therapy*, 5th ed. (Kansas City, Missouri: Andrews McMeel Publishing, 2008).

¹⁵ Falk, M.; Issels, R. D. *International Journal of Hyperthermia* 17, no. 1 (2001): 1-18.

¹⁶ Wust, P.; Hildebrandt, B.; Sreenivasa, G. *The Lancet Oncology* 3, no. 8 (2002): 487-497.

¹⁷ Dewhurst, M. W.; Gibbs, F. A.; Roemer, R. B.; Samulski, T. V. *Hyperthermia*, 1st ed. (New York, New Jersey: Clinical Radiation Oncology, 2000).

Un tratamiento de hipertermia de cuerpo entero consistiría en calentar todo el cuerpo a temperaturas entorno de 39 a 42° C¹⁸ y se usaría para tratar ciertos tipos de cáncer metastásico. Esto se puede lograr mediante varias técnicas que elevan la temperatura del cuerpo hasta dichas temperaturas. Entre las técnicas más sencillas se incluyen cámaras térmicas de infrarrojos para hipertermia, que incluyen todo el cuerpo, con excepción de la cabeza, poniendo al paciente en una habitación muy caliente, o envolviendo al paciente en mantas calientes y húmedas¹⁹.

La idea de emplear partículas magnéticas para calentar y destruir tumores fue introducida por Gilchrist en 1957²⁰. El término “hipertermia magnética”, en el contexto de estas terapias, se refiere a la liberación de calor mediante mecanismos magnéticos con el objetivo de dañar a las células cancerígenas²¹. Esto supone un gran avance con respecto a los métodos macroscópicos, ya que no se requiere de cirugía, se elimina la dificultad de acceso a ciertos tumores y se evita el gradiente no uniforme de temperaturas; además, las frecuencias y las intensidades empleadas para este propósito sólo afectan a las zonas que contienen las nanopartículas magnéticas²². El planteamiento de la hipertermia moderada consiste en aumentar la temperatura (entre 42°C y 45°C)²³ de una zona concreta, la zona cancerígena, induciendo cambios fisiológicos en las células tumorales (como desnaturalización de proteínas y aglutinación de ADN, logrando su muerte por apoptosis). Esta modalidad de terapia complementa hoy en día a la quimioterapia, radioterapia, terapia genética, etc²⁴. La termoablación es una variante en la que se emplean temperaturas superiores a los 50°C de manera

¹⁸ Dewhirst, M. W.; Viglianti, B. L.; Lora-Michiels, M.; Hansons, M.; Hoopes, P. J. *Int. J. Hyperthermia* 19, no. 3 (2003): 267–294.

¹⁹ Kapp, D. S.; Hahn, G. M.; Carlson, R. W. *Principles of Hyperthermia*, 5th ed. (Hamilton, Ontario: Cancer Medicine, 2000).

²⁰ Gilchrist, R. K.; Medal, R.; Shorey, W. D.; Hanselman, R. C.; Parrott, J. C.; Taylor, C. B. *Annals of surgery* 146, no. 4 (1957): 596–606.

²¹ Kievit, F. M.; Zhang, M. *Accounts of chemical research* 44, no. 10 (2011): 853–862.

²² Dutz, S.; Kettering, M.; Hilger, I.; Müller, R.; Zeisberger, M. *Nanotechnology* 22 (2011): 265102.

²³ Hergt, R.; Andrä, W. *Magnetic Hyperthermia and Thermoablation, in Magnetism in Medicine: A Handbook*, 2nd ed. (Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006).

²⁴ Jadhav, S. A.; Bongiovanni, R. *ACS Nano* 3, no. 5 (2012): 356–361

que la totalidad del tejido muere por necrosis, coagulación o carbonización, siendo un modo de terapia más perjudicial para el tejido sano adyacente²⁵. A diferencia de los sistemas empleados para la liberación magnética de fármacos, en el caso de la hipertermia moderada, y más en el caso de la termoablación, para conseguir altas tasas de calentamiento es preciso que las nanopartículas presenten altos valores de imanación²⁶.

Cuando las nanopartículas magnéticas monodominio se encuentran en una disolución presentan un estado superparamagnético con sus momentos orientados al azar, de forma que, en ausencia de campo magnético, la suspensión no presenta magnetización neta. Cuando se aplica un campo magnético alterno las nanopartículas reciben energía que impulsa a sus momentos magnéticos a rotar en pro de vencer la barrera energética generada, principalmente, por la anisotropía para alinearse con el campo. La energía posteriormente se disipa en forma de calor cuando los momentos de la nanopartícula se relajan para conseguir el equilibrio en su orientación²⁷. La relajación de estos momentos puede darse de dos formas diferentes. Por una parte, en el mecanismo de relajación de Néel la energía se transfiere a la red cristalina en forma de fonones al cabo de un tiempo característico τ_N que, en general, es función de la anisotropía magnética de la partícula, del campo aplicado y de la temperatura. Finalmente, esta energía acaba en el fluido circundante mediante transferencia de calor por contacto. En el caso de la relajación Browniana, el mecanismo físico transfiere directamente por fricción la energía al fluido en forma de calor. Ambos mecanismos están presentes y compiten; sin embargo, cuando la partícula no tiene posibilidad de rotar físicamente, el sistema sólo puede relajarse por el mecanismo de Néel (Figura 5). La elección de un mecanismo u otro depende, en gran medida, del tamaño hidrodinámico de partícula²⁸. Para partículas pequeñas, el mecanismo

²⁵ Diederich, C. J.; *Int. J. Hyperthermia* 21, no. 8 (2005): 745-753.

²⁶ Yoo, D.; Lee, J. H.; Shin, T. H.; Cheon, J. *Accounts of Chemical Research* 44, no. 10 (2011): 863-874.

²⁷ Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Ones, S.K.; Dobson, J. J. *Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003): 167-181.

²⁸ Labhassetwar, V.; Leslie-Pelecky, D. L. *Biomedical Applications of Nanotechnology* (Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2007): 83-105.

Introducción

dominante se debe a la rotación del vector magnético dentro de la partícula, y está gobernado por la relajación de Néel. Para partículas grandes, la relajación de Brown se explica por la rotación de la partícula dentro del líquido transportador.

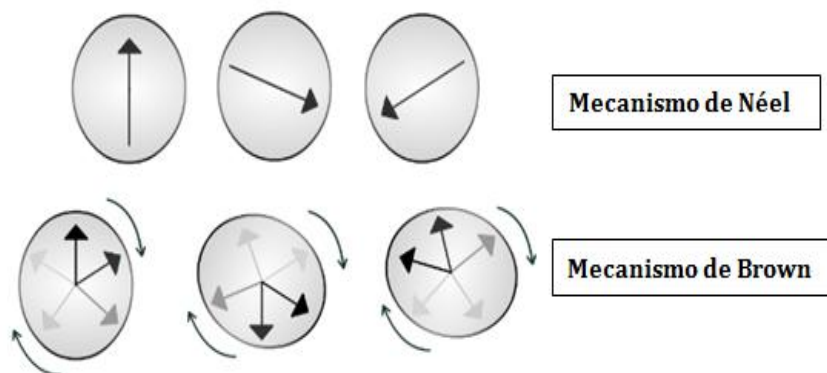


Figura 5. Representación esquemática de los mecanismos de relajación de Néel y de Brown.

En este sentido, el óxido mixto de Fe (II) y Fe (III) (Fe_3O_4 , magnetita) es un buen candidato para el tratamiento de hipertermia magnética debido a los altos valores de imanación de saturación y susceptibilidad que presenta, además, una adecuada biocompatibilidad. Desde la aprobación por la FDA (Food and Drug Administration) de la magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)²⁹ como materiales magnéticos para el uso en humanos, se ha realizado una intensa labor investigadora en la obtención de esta clase de nanomateriales para su utilización en terapias médicas o en diagnóstico molecular³⁰.

La magnetita posee una estructura espinela inversa (G. E.: Fd-3m), donde los iones Fe^{3+} se distribuyen en huecos octaédricos y tetraédricos, y los iones Fe^{2+} en huecos octaédricos, pudiéndose representar como

²⁹ Behdadfar, B.; Kermanpur, A.; Sadeghi-Aliabadi, H.; Morales, M. P.; Mozaffari, M. J. *Solid State Chem.* 187 (2012): 20–26.

³⁰ Fortin, J. P.; Wilhelm, C.; Servais, J.; Ménager, C. Bacri, J. C.; Gazeau, F. J. *Am. Chem. Soc.* 129, no. 9 (2007): 2628-2635.

$(\text{Fe}^{3+})_{\text{T}}(\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+})_{\text{O}}\text{O}_4$ ³¹ (Figura 6). Esta disposición de los iones de hierro en los huecos tetraédricos y octaédricos origina que el material en estado masivo se comporte como ferrimagnético a temperaturas por debajo de su temperatura de Curie, 858 K, y posea un valor de imanación de saturación a 5 K de 98 emu/g³². Este elevado valor de imanación resulta muy apropiado para las diversas aplicaciones biomédicas basadas en materiales magnéticos, y es por ello que, en los últimos años, se ha llevado a cabo una amplia labor en la preparación de nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro (Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles, SPION) de diferentes tamaños y morfologías, y en su caracterización estructural, magnética, espectroscópica y biológica de estos sistemas³³.

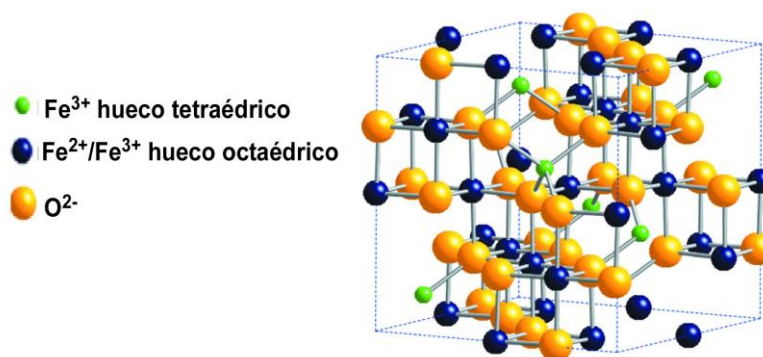


Figura 6. Representación de la celda unidad de la magnetita donde las flechas indican la dirección de imanación de los momentos magnéticos de los iones hierro(II) y (III).

A pesar de que este tipo de sistemas presenta ciertas ventajas como la falta de toxicidad y el hecho de que pueden ser fácilmente biodegradados por el cuerpo humano, se sigue requiriendo una funcionalización que aumente la biocompatibilidad de estos sistemas. De este modo, resulta imprescindible dotar a las NPs de funcionalidades específicas que permitan alcanzar

³¹ (a) Sakellari, D.; Mathioudaki, S.; Kalpaxidou, Z.; Simeonidis, K.; Angelakeris, M. *J. Magn. Mater.* 380 (2015): 360–364. (b) Salazar, J. S.; Perez, L.; Abril, O.; Phuoc, L. T.; Ihiwakrim, D.; Vazquez, M.; Greneche, J. M.; Begin-Colin, S.; Pourroy, G. *Chem. Mat.* 23 (2011): 1379–1386.

³² Hilger, I.; Kaiser, W. A. *Nanomedicine* 7 (2012): 1443–1459.

³³ Smolensky, E. D.; Park, H. E.; Zhou, Y.; Rolla, G. A.; Marjańska, M.; Botta, M.; Pierre, V. C. *J. Mater. Chem. B* 1 (2013): 2818–2828.

Introducción

determinadas partes del organismo susceptibles al tratamiento e inaccesibles por otros métodos, como la cirugía, además de aumentar el periodo de retención en el organismo³⁴. Existen diferentes métodos que posibilitan focalizar las NPs en las zonas requeridas, de forma activa o pasiva. Dentro del enfoque de la focalización activa, los sistemas se modifican con ligandos que poseen una afinidad selectiva por receptores específicos sobreexpresados en los órganos, tejidos o células diana, existiendo una variedad de moléculas incluyendo péptidos, anticuerpos, carbohidratos y ácidos nucleicos que resultan apropiados como agentes dirigidos. Por otro lado, los sistemas nanoparticulados pueden acumularse en el área de interés, de forma pasiva, debido a sus propiedades físicoquímicas, como son su tamaño, morfología y carga superficial. Este efecto fue recogido por Matsumura y Maeda en 1986 y es favorecido por las diferencias existentes entre el tejido normal y el tejido enfermo³⁵.

Dentro de las moléculas diana más estudiadas son las integrinas, familia de moléculas de adhesión celular, es decir, glicoproteínas que se encuentran en la superficie de la mayoría de las células y que median la unión de la célula con elementos del medio externo así como con otras células. Por ser receptores fluctúan entre estados de alta y baja afinidad con sus respectivos ligandos, los que tienen características de especificidad para cada molécula de adhesión³⁶. Las moléculas de adhesión al unirse a su ligando o receptor específico, producen un cambio conformacional en el dominio extracelular que afecta a la función de las células, produciendo cambios intracelulares en el citoesqueleto o en su composición química. Esto puede ocurrir como una respuesta fisiológica o una respuesta patológica.

La mayoría de integrinas, que constan de dos subunidades transmembrana α y β unidas de forma no covalente, se unen a más de un ligando y exhiben diferentes especificidades, dependiendo del tipo de célula en la cual se sobreexpresan. De las más conocidas son las que incluyen una

³⁴ Zhaofei, L. W. F.; Chen, X. *Changes* 29, no. 6 (2012): 997-1003.

³⁵ Matsumura, Y.; Maeda, H. *Cancer Res.* 46 (1986): 6387-92.

³⁶ (a) Frenette, P. S.; Wagner, D. D. *N. Eng. J. Med.* 334, no. 34 (1996): 1526-1529. (b) Freemont, A. J.; Hoyland, J. A. *Clin. Mol. Pathol.* 49, no. 6 (1996): 321-30.

subunidad β_1 , β_2 o β_3 . Entre todas ellas, la integrina $\alpha_v\beta_3$ parece ser la más importante en el proceso de angiogénesis tumoral³⁷. La angiogénesis tumoral, o el surgimiento de nuevos vasos a partir de vasos sanguíneos preexistentes, se conoce como un mecanismo esencial para el crecimiento y desarrollo de la metástasis tumoral, siendo las integrinas una familia molecular importante implicada en este proceso³⁸. Dichas integrinas se sobreexpresan en células endoteliales activadas, en los nuevos vasos, así como en algunas células tumorales, pero no están presente en las células endoteliales en reposo ni en la mayoría de los sistemas de órganos normales, lo que las convierte en una diana apropiada tanto para la terapia dirigida a la vasculatura del tumor como a las células tumorales en sí mismas³⁹. Por otro lado, el bloqueo de su señalización también ha demostrado ser eficaz para inhibir el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis.

Hasta la fecha, se han investigado numerosas terapias basadas en el antagonismo de la integrina $\alpha_v\beta_3$, incluyendo anticuerpos, péptidos, ARN de interferencia (siRNA),... además de la combinación de estas moléculas con otros agentes anti cancerígenos para lograr su localización selectiva. Dentro de las terapias que pueden beneficiarse de la alta especificidad de la integrina $\alpha_v\beta_3$, la hipertermia magnética es una de las más prometedoras. Entre los péptidos con una especial compatibilidad por dicha integrina se encuentran los de tipo RGD (Arginina-Glicina-Acido aspártico)⁴⁰, los cuales constituyen un importante sistema de reconocimiento en la adhesión celular. La secuencia RGD sirve de unión celular para un gran número de matrices adhesivas extracelulares, la sangre y las proteínas de la superficie celular, y cerca de la

³⁷ (a) Tsopanoglou, N. E.; Andriopoulou, P.; Maragoudakis, M. E. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, no. 5 (2002): 1501-1510. (b) Brooks, P. C. *Cancer Metastasis Rev.* 15, no. 2 (1996): 187-194.

³⁸ Bolley, J.; Lalatonne, Y.; Haddad, O.; Letourneur, D.; Soussan, M. Pérard-Viret, J.; Motte, L. *Nanoscale* 5, no. 23 (2013): 11478-89.

³⁹ Zhang, F.; Huang, X.; Zhu, L.; Guo, N.; Niu, G.; Swierczewska, M.; Lee, S.; Xu, H.; Wang, A. Y.; Mohamedali, K. A.; Rosenblum, M. G.; Lu, G.; Chen, X. *Biomaterials* 33, no. 21 (2012): 5414-22.

⁴⁰ Ruoslahti, E. *Annual review of cell and developmental biology* 12 (1996): 697-715.

Introducción

mitad de las 20 integrinas conocidas reconocen esta secuencia en sus ligandos de proteínas de adhesión⁴¹.

La actividad de unión de la integrina puede reproducirse, además, por otros péptidos sintéticos que contienen la secuencia RGD o RGDs modificados⁴². De esta manera, como el ataque a la célula mediado por integrinas influencia y regula la migración celular, el crecimiento, la diferenciación, y la apoptosis, pueden utilizarse los péptidos del tipo RGD⁴³ para sondear las funciones de la integrina en diversos sistemas biológicos. En consecuencia, el diseño de fármacos basados en la estructura RGD puede proporcionar nuevos tratamientos para enfermedades como trombosis, osteoporosis y determinados tipos de cáncer⁴⁴.

Dentro del enfoque de la hipertermia magnética, los sistemas magnéticos de tamaño nanométrico, como los citados óxidos de hierro, en combinación con receptores del tipo RGD para las moléculas de adhesión presentes en células tumorales pueden suponer un enorme avance en este tipo de terapias. El resultado sería una mayor concentración de NPs magnéticas en la región de interés y, por lo tanto, una disminución de la dosis necesaria para alcanzar la destrucción tumoral sin causar daños en el tejido sano. Además de su alta capacidad magnética se requiere de un seguimiento tanto *in vitro* como dentro del tejido de interés, por lo que se hayan llevado a cabo experimentos *in vivo* de diversos sistemas nanoparticulados en el campo de hipertermia magnética⁴⁵. Es en este contexto donde se engloba el presente estudio de los sistemas de óxido de hierro para hipertermia magnética. Dichos sistemas deben cumplir ciertos requisitos, como son la biocompatibilidad, monodispersidad y la estabilidad coloidal en el medio fisiológico. Además, en todas las aplicaciones biomédicas el proceso de transporte de las

⁴¹ Yu, M. K.; Park, J.; Jeong, Y. Y.; Moon, W. K.; Jon, S. *Nanotechnology* 21, no. 41 (2010): 415102.

⁴² Bellis, S. L. *Biomaterials* 32, no. 18 (2011): 4205–4210.

⁴³ Hersel, U.; Dahmen, C.; Kessler, H. *Biomaterials* 24, no. 24 (2003): 4385–4415.

⁴⁴ Singh, S. R.; Grossniklaus, H. E.; Kang, S. J.; Edelhauser, H. F.; Ambati, B. K.; Kompella, U. B. *Gene therapy* 16, no. 5 (2009): 645–659.

⁴⁵ (a) Conde, J.; Ambrosone, A.; Sanz, V.; Hernandez, Y.; Marchesano, V.; Tian, F.; Child, H.; Berry, C. C.; Ibarra, M. R.; Baptista, P. V.; Tortiglione, C.; De la Fuente, J. M. *ACS Nano*, no. 9 (2012): 8316–8324. (b) Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012): 24–36.

nanopartículas dentro del organismo así como su localización en el órgano o tejido deseado adquieren una evidente relevancia. Para ello, se requiere una adecuada funcionalización del sistema y que éste no supere los 50 nm de diámetro para que las nanopartículas permanezcan en el torrente sanguíneo el mayor tiempo posible, y evitar la opsonización inmediata por anticuerpos y posterior destrucción mediante macrófagos⁴⁶. Por ello es necesario diseñar nanopartículas magnéticas cuyas propiedades se adapten específicamente a este tipo de terapias; pequeñas, neutras, hidrófilas, biocompatibles y con una buena funcionalización selectiva.

De esta manera, el trabajo que se recoge en la presente memoria se basa en la producción, posterior caracterización, su recubrimiento y funcionalización de NPs magnéticas, la evaluación de su toxicidad y, finalmente, la aplicación de dichos sistemas en ensayos de hipertermia magnética *in vivo*. Todo ello con el objetivo de poder proponer materiales adecuados para aplicaciones médicas basadas en terapias de hipertermia magnética. La base y el punto de partida del estudio ha sido la síntesis química, el estudio de los diferentes parámetros involucrados en la misma y la posterior optimización con objeto de mejorar las propiedades del producto final. Cabe subrayar que gracias al desarrollo de nuevas rutas sintéticas es posible la obtención de nanopartículas de diferentes características, siendo la evolución de los métodos de síntesis la que posibilita el estudio de los nuevos efectos que emergen en la escala nanométrica. Se ha desarrollado una ruta sintética para la obtención de magnetita de composición y tamaño controlable, utilizando como precursores $\text{Fe}(\text{CO})_5$ y $\text{Fe}(\text{acac})_3$.

Con objeto de aumentar la compatibilidad de las nanopartículas con el medio biológico se ha recurrido a estrategias de intercambio de ligando con ácido dimercaptosuccínico (DMSA), a la adición de silanos mediante el método sol-gel con tetraetiltrióxido de silano (TEOS) y ácido trietoxisililpropilmaleámico (TESPMA) y al recubrimiento polimérico con poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO). En este último caso, los grupos carboxílicos superficiales han sido funcionalizados con un péptido del

⁴⁶ Hola, K.; Markova, Z.; Zoppellaro, G.; Tucek, J.; Zboril, R. *Biotechnology Advances* (2015).

Introducción

tipo RGD para aportar la selectividad requerida en la localización posterior de las NPs.

En todos los sistemas se ha realizado una caracterización química, estructural, espectroscópica y morfológica detallada de las muestras, seguido de un exhaustivo estudio magnético mediante medidas de imanación y espectroscopia de resonancia magnética electrónica. Las muestras con los valores de magnetización más elevados han sido utilizadas para la realización de las medidas de hipertermia tanto *in vitro* como *in vivo* y los ensayos citotóxicos para evaluar su posible aplicación en terapias médicas.

Bibliografía

- Bean, C. P.; Livingston, J. D. *J. App. Phys.* 30, no. 120 (1959).
- Behdadfar, B.; Kermanpur, A.; Sadeghi-Aliabadi, H.; Morales, M. P.; Mozaffari, M. *J. Solid State Chem.* 187 (2012): 20–26.
- Bellis, S. L. *Biomaterials* 32, no. 18 (2011): 4205–4210.
- Bolley, J.; Lalatonne, Y.; Haddad, O.; Letourneur, D.; Soussan, M. Pérard-Viret, J.; Motte, L. *Nanoscale* 5, no. 23 (2013): 11478–89.
- Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012): 24–36.
- Brooks, P. C. *Cancer Metastasis Rev.* 15, no. 2 (1996): 187–194.
- Conde, J.; Ambrosone, A.; Sanz, V.; Hernandez, Y.; Marchesano, V.; Tian, F.; Child, H.; Berry, C. C.; Ibarra, M. R.; Baptista, P. V.; Tortiglione, C.; De la Fuente, J. M. *ACS Nano*, no. 9 (2012): 8316–8324.
- Dewhirst, M. W.; Gibbs, F. A.; Roemer, R. B.; Samulski, T. V. *Hyperthermia*, 1st ed. (New York, New Jersey: Clinical Radiation Oncology, 2000).
- Dewhirst, M. W.; Viglianti, B. L.; Lora-Michiels, M.; Hansons, M.; Hoopes, P. J. *Int. J. Hyperthermia* 19, no. 3 (2003): 267–294.
- Diederich, C. J.; *Int. J. Hyperthermia* 21, no. 8 (2005): 745–753.
- Dollinger, M. *Everyone's Guide to Cancer Therapy*, 5th ed. (Kansas City, Missouri: Andrews McMeel Publishing, 2008).
- Dutz, S.; Kettering, M.; Hilger, I.; Müller, R.; Zeisberger, M. *Nanotechnology* 22 (2011): 265102.
- Falk, M.; Issels, R. D. *International Journal of Hyperthermia* 17, no. 1 (2001): 1–18.
- Feynman, R. P. *Engineering and Science* (1959): 1–8.
- Fortin, J. P.; Wilhelm, C.; Servais, J.; Ménager, C. Bacri, J. C.; Gazeau, F. *J. Am. Chem. Soc.* 129, no. 9 (2007): 2628–2635.
- Freemont, A. J.; Hoyland, J. A. *Clin. Mol. Pathol.* 49, no. 6 (1996): 321–30.
- Frenette, P. S.; Wagner, D. D. *N. Eng. J. Med.* 334, no. 34 (1996): 1526–1529.
- Gatteschi, D.; Fittipaldi, M.; Sangregorio, C.; Sorace, L. *Angew. Chem.* 51 (2012): 4792–4800.

Objetivo del trabajo

- Gilchrist, R. K.; Medal, R.; Shorey, W. D.; Hanselman, R. C.; Parrott, J. C.; Taylor, C. B. *Annals of surgery* 146, no. 4 (1957): 596–606.
- Hergt, R.; Andrä, W. *Magnetic Hyperthermia and Thermoablation, in Magnetism in Medicine: A Handbook*, 2nd ed. (Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006).
- Hersel, U.; Dahmen, C.; Kessler, H. *Biomaterials* 24, no. 24 (2003): 4385–4415.
- Hilger, I.; Kaiser, W. A. *Nanomedicine* 7 (2012): 1443–1459.
- Ho, D.; Sun, X.; Sun, S. *Changes* 29, no. 10 (2012): 997–1003.
- Hola, K.; Markova, Z.; Zoppellaro, G.; Tucek, J.; Zboril, R. *Biotechnology Advances* (2015).
- Jadhav, S. A.; Bongiovanni, R. *ACS Nano* 3, no. 5 (2012): 356–361
- Kapp, D. S.; Hahn, G. M.; Carlson, R. W. *Principles of Hyperthermia*, 5th ed. (Hamilton, Ontario: Cancer Medicine, 2000).
- Kenouche, S.; Larionova, J.; Bezzi, N.; Guari, Y.; Bertin, N.; Zanca, M.; Lartigue, L.; Cieslak, M.; Godin, C.; Morrot, G.; Goze-Bac, C. *Powder Technology* 255 (2014): 60–65.
- Kievit, F. M.; Zhang, M. *Accounts of chemical research* 44, no. 10 (2011): 853–862.
- Labhasetwar, V.; Leslie-Pelecky, D. L. *Biomedical Applications of Nanotechnology* (Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2007): 83-105.
- Marszall, M. P. *Pharm. Res.* 28, no. 3 (2011): 480–483.
- Matsumura, Y.; Maeda, H. *Cancer Res.* 46 (1986): 6387-92.
- Néel, L. *Comptes Rendus* 228 (1949): 664–666.
- Niemirowicz, K.; Markiewicz, K. H.; Wilczewska, A. Z.; Car, H. *Advances in medical sciences* 57, no. 2 (2012): 196–207.
- Oka, C.; Ushimaru, K.; Horiishi, N.; Tsuge, T. Kitamoto, Y. *Nanomedicine* 9, no. 7 (2013): 961–971.
- Oka, C.; Ushimaru, K.; Horiishi, N.; Tsuge, T.; Oka, C.; Ushimaru, K.; Horiishi, N.; Tsuge, T.; Kitamoto, Y. *J. Magn. Magn. Mater.* 381 (2015): 278–284.

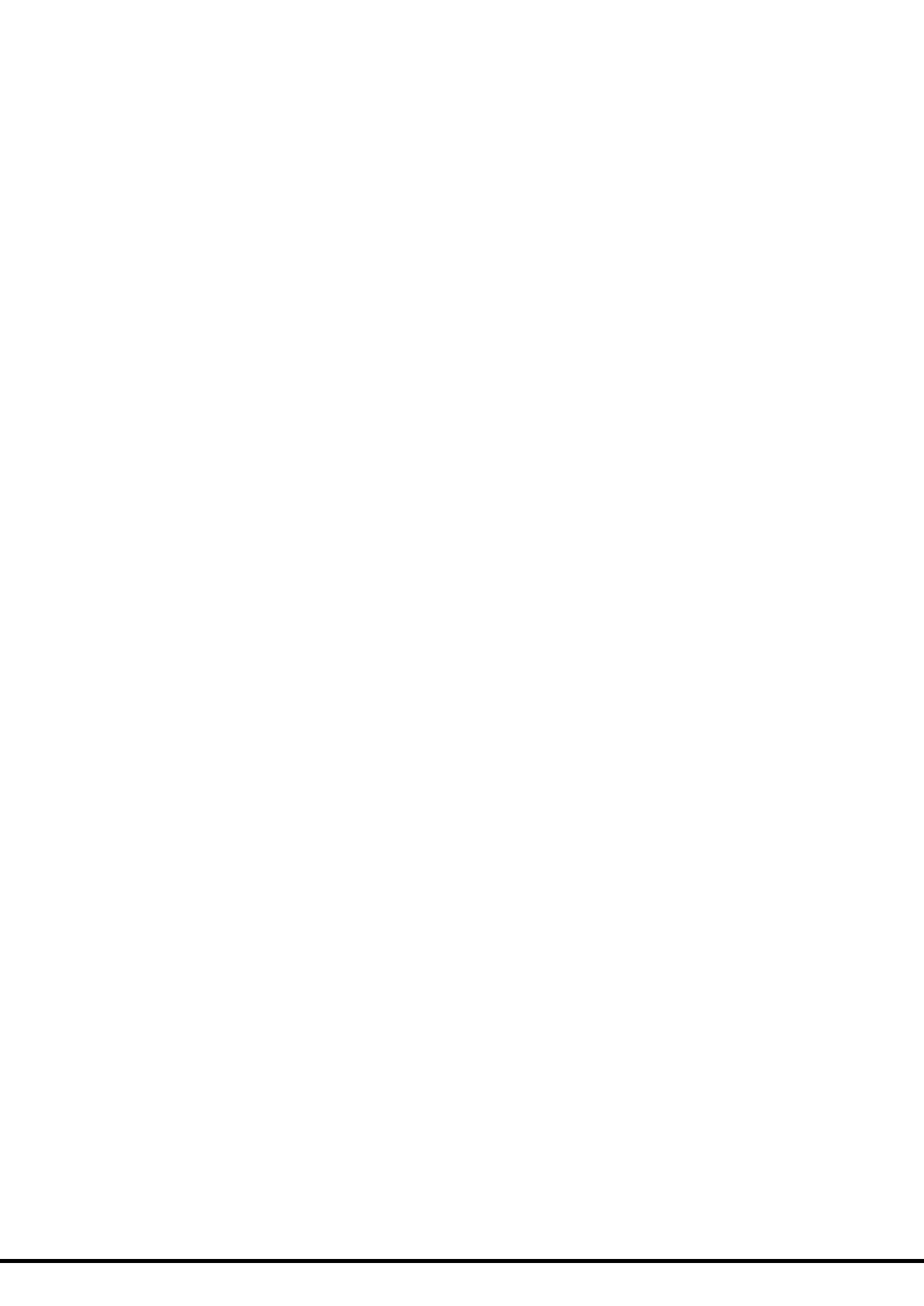
- Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Ones, S.K.; Dobson, J. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003): 167–181.
- Roca, A. G.; Costo, R.; Rebolledo, A. F.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Tartaj, P.; González; Carreño, T.; Morales, M. P.; Serna, C. J. *J. Phys. D* 42 (2009): 224002.
- Ruoslahti, E. *Annual review of cell and developmental biology* 12 (1996): 697–715.
- Sakellari, D.; Mathioudaki, S.; Kalpaxidou, Z.; Simeonidis, K.; Angelakeris, M. *J. Magn. Magn. Mater.* 380 (2015): 360–364.
- Salazar, J. S.; Perez, L.; Abril, O.; Phuoc, L. T.; Ihiawakrim, D.; Vazquez, M.; Greneche, J. M.; Begin-Colin, S.; Pourroy, G. *Chem. Mat.* 23 (2011): 1379–1386.
- Singh, S. R.; Grossniklaus, H. E.; Kang, S. J.; Edelhauser, H. F.; Ambati, B. K.; Kompella, U. B. *Gene therapy* 16, no. 5 (2009): 645–659.
- Smolensky, E. D.; Park, H. E.; Zhou, Y.; Rolla, G. A.; Marjańska, M.; Botta, M.; Pierre, V. C. *J. Chem. Mater. B* 1 (2013): 2818–2828.
- Tartaj, P.; Morales, M. P.; Gonzalez-Carreño, T.; Veintemillas-Verdaguer, S. Serna, J. C. *Ad. Func. Mater.* 23 (2011): 5243–5249.
- Tsopanoglou, N. E.; Andriopoulou, P.; Maragoudakis, M. E. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, no. 5 (2002): 1501-1510.
- Van der Zee, J. *Annals of Oncology* 13, no. 8 (2002): 1173–1184.
- Wust, P.; Hildebrandt, B.; Sreenivasa, G. *The Lancet Oncology* 3, no. 8 (2002): 487–497.
- Xia, Y.; Xiong, Y.; Lim, B.; Skrabalak, S. E. *Angew. Chem.* 48, no. 1 (2009): 60–103.
- Ye, F.; Barrefelt, Å.; Asem, H.; Abedi-Valugerdi, M.; El-Serafi, I.; Saghafian, M.; Abu-Salah, K.; Alrokayan, S.; Muhammed, M.; Hassan, M. *Biomaterials* 35, no. 12 (2014): 3885–3894.
- Yoo, D.; Lee, J. H.; Shin, T. H.; Cheon, J. *Accounts of Chemical Research* 44, no. 10 (2011): 863–874.
- Yu, M. K.; Park, J.; Jeong, Y. Y.; Moon, W. K.; Jon, S. *Nanotechnology* 21, no. 41 (2010): 415102.

Objetivo del trabajo

Zhang, F.; Huang, X.; Zhu, L.; Guo, N.; Niu, G.; Swierczewska, M.; Lee, S.;
Xu, H.; Wang, A. Y.; Mohamedali, K. A.; Rosenblum, M. G.; Lu, G.;
Chen, X. *Biomaterials* 33, no. 21 (2012): 5414–22.
Zhaofei, L. W. F.; Chen, X. *Changes* 29, no. 6 (2012): 997–1003.

OBJETIVO DEL

TRABAJO



Objetivo del trabajo

La compatibilidad de tamaño de las estructuras nanométricas con las dimensiones de los sistemas biológicos han posibilitado el desarrollo de una serie de estrategias terapéuticas y de diagnóstico que podrían evitar muchos de los riesgos asociados a la cirugía de carácter invasivo, a la falta de selectividad de las terapias utilizadas o la prolongación de los tratamientos empleados en la actualidad.

El diseño de rutas sintéticas para este tipo de sistemas permite un alto grado de control en términos de tamaño, morfología, estructura, cristalinidad y química de superficie, algo que posee gran relevancia debido a que sus propiedades y, por tanto, sus posibles aplicaciones dependen de dichos factores. Son las nanopartículas con propiedades ópticas y magnéticas las más estudiadas por su utilización biomedicina. En el caso de las nanopartículas magnéticas su principal interés reside en las aplicaciones resultantes de su interacción con un campo magnético. Así, la congregación de nanopartículas magnéticas en una zona determinada posibilita el aumento de contraste en las imágenes de la resonancia nuclear, pueden ser transportadas y dirigidas a la zona de acción y, además, la aplicación de un campo magnético alterno a las nanopartículas genera una transferencia de energía que posibilita su aplicación en el tratamiento de tumores mediante hipertermia magnética. Dado que para su aplicación terapéutica o en diagnóstico los materiales magnéticos utilizados deben ser biocompatibles, son los óxidos de hierro en los que se han centrado la mayoría de las investigaciones. Teniendo en cuenta que la finalidad de este trabajo es la obtención de fluidos magnéticos que sean capaces de inducir necrosis tumoral por hipertermia magnética, el primer objetivo de esta tesis doctoral es la optimización de un método de síntesis para la preparación de nanopartículas de magnetita de tamaño controlado y un bajo grado de dispersión. Además, dado que las nanopartículas deben ser biocompatibles y estables en medio fisiológico se ha trabajado la cubierta superficial de las NPs mediante la adición o intercambio de ligandos (PMAO, DMSA, TESPMA). Finalmente, para posibilitar su localización en la zona tumoral incrementar su selectividad se han funcionalizado con péptidos miméticos RGD, ya que se ha

Objetivo del trabajo

observado la gran afinidad de estas moléculas con ciertas integrinas sobreexpresadas en procesos de angiogénesis tumoral.

Las nanopartículas sintetizadas se han caracterizado exhaustivamente mediante técnicas analíticas, espectroscópicas y termogravimétricas. Su caracterización estructural se ha llevado a cabo mediante difracción de rayos X y microscopia electrónica de transmisión. Además, como la optimización de la hipertermia magnética está íntimamente relacionada con el comportamiento magnético, se ha realizado un estudio en profundidad de sus propiedades magnéticas en función del campo y la temperatura aplicada, así como de espectroscopia de resonancia magnética electrónica de todas las nanopartículas preparadas. El estudio realizado ha permitido la obtención de un sistema de nanopartículas de magnetita con valores de hipertermia elevados y biocompatible tal como ha podido deducirse de los estudios de citotoxicidad realizados.

Finalmente, y siendo el objetivo final la aplicación de estas nanopartículas en hipertermia magnética, se han preparados disoluciones de magnetita las cuales se han inyectado a ratas de laboratorio inoculadas con lesiones neoplásicas de adenocarcinoma de colon. De este modo, se ha evaluado la utilidad terapéutica de la termoablación en la necrosis tumoral mediada por un agente biocompatible y selectivo, y que podría ser incorporable a terapias combinadas cuyo objetivo último es el incremento en las tasas de supervivencia en los pacientes con cáncer colo-rectal metastásico.

CAPÍTULO I

QUÍMICA

PREPARATIVA

Capítulo I. Química Preparativa

1.1. Introducción

Aunque existen varios métodos para la preparación de materiales nanoestructurados¹, el método más simple para la obtención de nanopartículas (NPs) en disolución consiste en la precipitación desde los correspondientes iones, moléculas o monómeros². Concretamente, para la preparación de nanopartículas de Fe₃O₄, los métodos más comunes son la técnica de co-precipitación³ y la descomposición térmica de precursores en disolventes orgánicos⁴.

La teoría desarrollada por LaMer⁵ propone que cuando la concentración de núcleos en disolución supere un valor de supersaturación crítico se produce una nucleación inmediata y abrupta. A partir de ese momento no se forman nuevos núcleos sino que éstos empezarán a crecer, todos en la misma medida, generándose nanopartículas con un bajo estado de dispersión. Este mecanismo se basa en un control termodinámico de la reacción, de forma que cuanto más diferenciadas se encuentran las etapas de nucleación y de crecimiento más homogeneidad se obtiene en las NPs obtenidas. De esta manera, una de las estrategias utilizadas para lograr una nucleación inmediata sería una adición rápida de los reactivos en el medio de reacción a elevadas temperaturas, lo que se conoce como “*hot-injection*”. Sin embargo, la alternativa “*heating-up*” también es una estrategia de síntesis utilizada que consiste en el calentamiento hasta cierta temperatura de una disolución, que contiene ya disueltos los precursores y los surfactantes.

Por otra parte, el mecanismo propuesto por Watzky en 1997 está basado en una nucleación lenta y controlada y el subsiguiente crecimiento

¹ Fang, M.; Ström, V.; Olsson, R. T.; Belova, L.; Rao, K. V. *App. Phys. Lett.* 99, no. 22 (2011): 222501.

² Hernando, A.; Crespo, P.; García, M. A. *The Scientific World Journal* 5 (2005): 972–1001.

³ (a) Li, Z.; Tan, B.; Allix, M.; Cooper, A. I.; Rosseinsky, M. J. *Small* 4, no. 2 (2008): 231–239. (b) Ahn, T.; Kim, J. H.; Yang, H. M.; Lee, J. W.; Kim, J. D. *J. Phys. Chem. C* 116, no. 10 (2012): 6069–6076.

⁴ Park, J.; Joo, J.; Soon, G.K.; Jang, Y.; Hyeon, T. *Angew. Chem.* 46, no. 25 (2007): 4630–4660.

⁵ La Mer, V. K.; Dinegar, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* 72 (1950): 4847.

autocatalítico⁶. Como alternativa a los anteriores mecanismos de crecimiento, Burho y col.⁷ argumentaban que la formación de nuevos núcleos en un medio de baja supersaturación de monómeros (o precursores) es energéticamente más desfavorable que la deposición de los precursores sobre semillas ya existentes. Así, se pueden emplear nanopartículas, previamente sintetizadas, como semillas y añadir los precursores y los surfactantes sobre éstas para originar el crecimiento de las partículas. Dicho crecimiento podría llevarse a cabo a partir del método de descomposición térmica o mediante el método de co-precipitación de sales metálicas.

Sin embargo, y dado que la síntesis por co-precipitación se realiza a temperaturas moderadas, es difícil la diferenciación de las etapas de nucleación y crecimiento, lo que conlleva la formación de nanopartículas de diverso tamaño⁸, por lo que para conseguir NPs más homogéneas se suele recurrir a la descomposición térmica de precursores metal-orgánicos en disolventes orgánicos de alto punto de ebullición, en presencia de surfactantes.

Los mencionados surfactantes son moléculas, habitualmente de cadena larga, que actúan como separadores físicos controlando el crecimiento y aglomeración de las NPs durante el proceso de síntesis, siendo posteriormente eliminados mediante lavados. Este tipo de síntesis se desarrolló inicialmente para la preparación de nanopartículas de metales nobles⁹, aunque posteriormente se redirigió hacia la obtención de otras nanopartículas metálicas como Fe, Co o Ni¹⁰, así como óxidos binarios y ternarios, fosfatos,

⁶ Watzky, M. A.; Finke, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997): 10382.

⁷ Yu, H.; Gibbons, P. C.; Kelton, K. F.; Buhro, W. E. *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001): 9198.

⁸ (a) Nikles, D. E.; Chen, M. *Nano Lett.* 2, no. 3 (2002): 211–214. (b) Pelzl, J.; Meckenstock, R.; Spoddig, D.; Schreiber, F.; Pflaum, J.; Frait, Z. *J. Phys. Cond. Matter* 15, no. 5 (2003): S451–S463.

⁹ (a) Kulesza, P. J.; Pieta, I. S.; Rutkowska, I. A.; Wadas, A.; Marks, D.; Klak, K.; Stobinski, L.; Cox, J. A. *Electrochimica Acta* 110 (2013): 474–483. (b) Aghlari, H.; Rostami, R.; Maghoul, A.; Salmanogli, A. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics* 126, no. 4 (2015): 417–420.

¹⁰ (a) Kura, H.; Takahashi, M.; Ogawa, T. *J. Phys. Chem. C* 114 (2010): 5835. (b) Lacroix, L. M.; Frey Natalie, H.; Ho, D.; Sun, X.; Cheng, K.; Sun, S. *Nano Letters* 11 (2011): 1641. (c) Kamata, M.; Kura, H.; Takahashi, M.; Ogawa, T.; Tanaka, T. *IEEE Transactions on Magnetism* 48 (2012): 3944.

sulfuros o halogenuros¹¹. Entre los precursores organometálicos referenciados en la bibliografía se incluyen acetilacetatos¹² y carbonilos¹³; y entre los surfactantes, ácidos carboxílicos¹⁴, alcoholes¹⁵, tioles¹⁶ fosfinas¹⁷ y aminas¹⁸, entre otros. En esta ruta sintética, la relación del precursor metálico/surfactante, así como la temperatura y el tiempo de reacción son parámetros cruciales para el control preciso del tamaño y forma de las nanopartículas.

Así, el grupo de T. Hyeon¹⁹ empleó $\text{Fe}(\text{CO})_5$ para sintetizar partículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, en dos pasos, mediante la técnica de inyección en caliente de los precursores. En el primero de ellos, se formaban partículas de Fe en octil éter en presencia de ácido oleico o láurico. En el segundo paso, se producía la oxidación de las partículas de hierro a $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con óxido de trimetilamina ($(\text{CH}_3)_3\text{NO}$). La técnica de inyección en caliente es una técnica generalizada en la preparación de NPs partículas ya que al inyectar los precursores se produce una gran saturación en el medio de reacción dando lugar a una nucleación instantánea²⁰. La consiguiente disminución de la temperatura de reacción, tras la inyección, asegura la separación de los procesos de

¹¹ (a) Feldmann, C.; Metzmacher, C. *J. Mat. Chem.* 11 (2001): 2603. (b) Jézéquel, D.; Guenot, J.; Jouini, N.; Fiévet, F. *Journal of Materials Research* 10 (1995): 77.

¹² (a) Ambrožič, G.; Škapin, S. D.; Žigon, M.; Orel, Z. C. *Journal of Colloid and Interface Science* 346, no. 2 (2010): 317–323. (b) Maity, D.; Kale, S. N.; Kaul-Ghanekar, R.; Xue, J. M.; Ding, J. *J. Magn. Magn. Mater.* 321, no. 19 (2009): 3093–3098. (c) Zeynali, H.; Akbari, H.; Arumugam, S. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 23 (2015): 235–237.

¹³ (a) Lin, H. T.; Nayak, P. K.; Wang, S. C.; Chang, S. Y.; Huang, J. L. *Journal of the European Ceramic Society* 31, no. 14 (2011): 2481–2487. (b) Yu, F.; Wang, J. N.; Sheng, Z. M.; Su, L. *F. Carbon* 43, no. 14 (2005): 3018–3021.

¹⁴ (a) Zamani, F.; Hosseini, S. M.; Kianpour, S. *Solid State Sciences* 26 (2013): 139–143. (b) Huang, Q.; Shen, W.; Xu, Q.; Tan, R.; Song, W. *Materials Chemistry and Physics* 147, no. 3 (2014): 550–556. (c) Shete, P. B.; Patil, R. M.; Tiwale, B. M.; Pawar, S. H. *J. Magn. Magn. Mater.* 377 (2015): 406–410.

¹⁵ (a) Mallakpour, S.; Siros, F. *Progress in Organic Coatings* 85 (2015): 138–145. (b) Yang, J.; Zou, P.; Yang, L.; Cao, J.; Sun, Y.; Han, D.; Yang, S.; Wang, Z.; Chen, G.; Wang, B.; Kong, X. *Applied Surface Science* 303 (2014): 425–432.

¹⁶ Hakami, O.; Zhang, Y.; Banks, C. J. *Water Research* 46, no. 12 (2012): 3913–3922.

¹⁷ Khalafi-Nezhad, A.; Panahi, F., *Journal of Organometallic Chemistry* 741–742, no. 1 (2013): 7–14.

¹⁸ (a) Nematollahzadeh, A.; Seraj, S.; Mirzayi, B. *Chemical Engineering Journal* 277 (2015): 21–29. (b) Araghi, S. H.; Entezari, M. H., *Applied Surface Science* 333 (2015): 68–77.

¹⁹ Hyeon, T.; Su Seong, L.; Park, J.; Chung, Y.; Hyon Bin, N. *J. Am. Chem. Soc.* 123, no. 51 (2001): 12798–12801.

²⁰ Murray, C. B.; Sun, S.; Gaschler, W.; Doyle, H.; Betley, T. A.; Kagan, C. R. *IBM Journal of Research and Development* 45, no. 1 (2001): 47–56.

nucleación y crecimiento, evitando posibles nucleaciones secundarias y permitiendo la obtención de partículas muy uniformes. Sin embargo, esta técnica presenta como desventaja el empleo de precursores volátiles tóxicos.

En el año 2002, S. Sun y col. prepararon partículas de Fe_3O_4 de 4 nm en una sola etapa²¹. Para ello utilizaron como precursor el acetilacetato de hierro (III), como surfactantes el ácido oleico y la oleilamina y como disolvente el fenil éter. Como este método de descomposición térmica suele conducir a tamaños pequeños de partícula, para la obtención de nanopartículas de Fe_3O_4 de mayores tamaños se recurrió al crecimiento mediante semillas²², obteniéndose partículas de hasta 20 nm²³.

Aunque el método de crecimiento de semillas está bien definido para metales nobles 5d y NPs semiconductoras de los grupos II-VI, este proceso en metales de transición 3d es mucho más variable debido a la dificultad a la hora de separar las etapas de nucleación y crecimiento²⁴. Por ello, el uso de una mezcla de surfactantes²⁵ es esencial para asegurar un crecimiento homogéneo de los núcleos de partida, evitando la agregación de las partículas y mejorando la estabilidad coloidal²⁶. Este tipo de crecimiento es menos utilizado para la producción de nanopartículas de magnetita, en comparación con otras rutas sintéticas, las cuales, en su mayoría, consiguen materiales más polidispersos.

Levy y col. consiguieron controlar el tamaño de las NPs de magnetita usando el método de *crecimiento de semillas* en un único paso²⁷. Sin embargo, las propiedades magnéticas y los valores de SAR obtenidos fueron inferiores a los esperados. Se postuló la existencia de fuertes efectos de superficie y/o las

²¹ Sun, S.; Zeng, H. *J. A. Chem. Soc.* 124, no. 28 (2002): 8204–8205.

²² Park, J.; Joo, J.; Soon, G. K.; Jang, Y.; Hyeon, T. *Angew. Chem.* 44, no. 19 (2005): 2873–2877.

²³ Sun, S.; Zeng, H.; Robinson, D. B.; Raoux, S.; Rice, P. M.; Wang, S. X.; Li, G. *J. Am. Chem. Soc.* 126, no. 1 (2004): 273–279.

²⁴ Puentes, V. F.; Krishnan, K. M.; Alivisatos, A. P. *Science* 291(2001): 2115.

²⁵ Euliss, L. E.; Grancharov, S. G.; O'Brien, S.; Deming, T. J.; Stucky, G. D.; Murray, C. B.; Held, G. A. *Nano Lett.* 3 (2003): 1489.

²⁶ Portet, D.; Denizot, B.; Rump, E.; Lejeune, J. J.; Jallet, P. *J. Colloid. Interface. Sci.* 238 (2001): 37.

²⁷ Levy, M.; Quarta, A.; Espinosa, A.; Figuerola, A.; Wilhelm, C.; García-Hernández, M.; Genovese, A.; Falqui, A.; Alloyeau, D.; Buonsanti, R.; Cozzoli, P. D.; García, M. A.; Gazeau, F.; Pellegrino, T. *Chem. Mater.* 23 (2011): 4170.

capas magnéticamente frustradas como posibles explicaciones de la baja magnetización en las semillas iniciales, volviéndose más baja al aumentar el tamaño de las NPs. Guardia y col. recogieron altos valores de SAR en nanocristales cúbicos con unas longitudes de arista entre 12 ± 1 y 38 ± 9 nm también preparadas mediante el método de descomposición térmica²⁸.

En este método sintético, las adiciones sucesivas de reactivos sobre las nanopartículas magnéticas (MNPs) previamente sintetizadas promueven, en cierta medida, la formación de diferentes poblaciones de núcleos magnéticos con distintos tamaños coexistiendo en la misma muestra, especialmente cuando el crecimiento de semillas se lleva a cabo mediante un método en múltiples pasos, donde las adiciones se realizan en recipientes de reacción independientes. Este efecto, es más significativo cuanto mayor es el tamaño de las NPs en crecimiento. De este modo, habitualmente se requiere de adicionales procesos de limpieza para mantener una alta monodispersidad.

Por otra parte, en este tipo de síntesis se originan nanopartículas de naturaleza hidrófoba y, teniendo en cuenta que la finalidad de estos sistemas es su aplicación en medio biológico, es necesaria su transferencia a medio acuoso. Para llevar a cabo esta transferencia existen, principalmente, cuatro estrategias: la modificación del ligando, proporcionando nuevas funcionalidades a las moléculas iniciales; el intercambio de ligando, mediante el cual se produce sustitución de la molécula unida a la superficie de las NPs por medio de fuerzas electrostáticas; la incorporación de una capa orgánica adicional de moléculas poliméricas de alto peso molecular, que confieren una alta estabilidad coloidal; y los estabilizadores inorgánicos, como la sílice, de modo que se crea una segunda capa encapsulando la NP mediante enlaces covalentes²⁹(Figura 1.1).

²⁸ Guardia, P.; Di Corato, R.; Lartigue, L.; Wilhelm, C.; Espinosa, A.; García-Hernández, M.; Gazeau, F.; Manna, L.; Pellegrino, T. *ACS Nano* 6 (2012): 3080.

²⁹ Ramimoghdam, D.; Bagheri, S.; Bee, S.; Hamid, A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 133 (2015): 388-411.

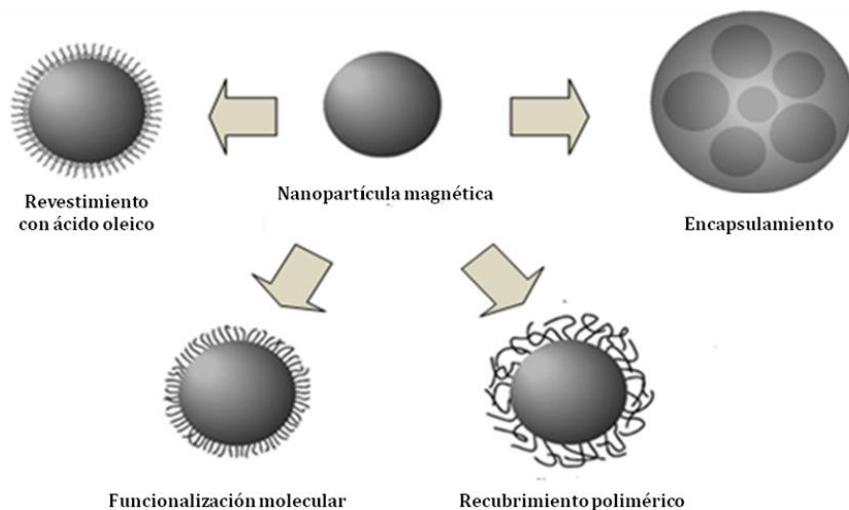


Figura 1.1. Tipos de recubrimientos de nanopartículas magnéticas para aumentar su hidrofiliidad.

Los recubrimientos orgánicos se pueden realizar a partir de diferentes reacciones químicas como pueden ser: intercambio de ligandos entre moléculas bifuncionales³⁰, modificación del doble enlace del ácido oleico que recubre las nanopartículas³¹, y recubrimiento/encapsulación con polímeros³² y/o liposomas³³. Por otra parte, los recubrimientos de naturaleza inorgánica se basan en la estabilización de la suspensión coloidal a partir de la repulsión electrostática que ofrecen estas moléculas inorgánicas con que se modifica superficialmente la nanopartícula. Entre los métodos más estudiados se encuentra el recubrimiento con sílice donde lo más común es emplear el tetraetoxiortosilicato (TEOS) como precursor³⁴; o el recubrimiento con oro³⁵.

³⁰ (a)Taboada, E.; Rodríguez, E.; Roig, A.; Oró, J.; Roch, A.; Muller, R. N. *Langmuir* 23, no. 8 (2007): 4583–4588.(b) Huh, S.; Chen, H. T.; Wiench, J. W.; Pruski, M.; Lin, V. S. Y. *Angew. Chem.* 44, no. 12 (2005): 1826–1830.

³¹ Herranz, F.; Morales, M. P.; Roca, A. G.; Vilar, R.; Ruiz-Cabello, J. *Contrast Media and Molecular Imaging* 3, no. 6 (2008): 215–222.

³² (a)Kreuter, J. *Journal of anatomy* 189, no. 5 (1996): 503–505.(b) Amstad, E.; Kim, S. H.; Weitz, D. A., *Angew. Chem.* 51, no. 50 (2012): 12499–12503.

³³ Xie, Y.; Ye, L.; Zhang, X.; Cui, W.; Lou, J.; Nagai, T.; Hou, X. *Journal of Controlled Release* 105, no. 1–2 (2005): 106–119.

³⁴ Kim, J.; Lee, J. *Advanced Powder Technology* 20, no. 1 (2009): 94–100.

³⁵ Tamer, U.; Cetin, D.; Suludere, Z.; Boyaci, I. H.; Temiz, H. T.; Yegenoglu, H.; Daniel, P.; Dinger, I.; Elerman, Y. *Int. J. Mol. Sci.* 14, no. 3 (2013): 6223–6240.

La estrategia utilizada en este trabajo es la basada en la adición de una molécula anfifílica cuya región hidrófoba se adsorbe mediante interacciones hidrófobas a los ligandos presentes en la superficie de la nanopartículas, formando una bicapa orgánica alrededor de las partículas de forma que la región hidrofílica se encuentra orientada hacia el exterior. Estas bicapas interpenetradas se pueden preparar a partir de ácidos grasos de diferente longitud, sales de amonio cuaternarias como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), polímeros anfifílicos, etc³⁶. En los primeros casos, la capa adicional no contiene suficientes cadenas alifáticas, por lo que las interacciones hidrófobas que mantienen unidos los ligandos a la monocapa hidrófoba de la nanopartícula no evitan la desorción de los mismos³⁷. Sin embargo, en este caso se ha empleado el polímero anfifílico poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO)³⁸ ya que este tipo de polímeros presenta una gran cantidad de cadenas alifáticas, con lo que proporcionan más puntos de unión con la monocapa original.

El recubrimiento a través de estabilizadores inorgánicos se puede llevar a cabo con ligandos como el tetraetoxiortosilicato (TEOS)³⁹ o el ácido trietilsililpropil maleámico (TESPMA)⁴⁰. Estos recubrimientos aportan estabilidad dispersiva y química, previniendo la agregación de las nanopartículas, además de facilitar el enlace con diversos ligandos biológicos. Dentro de las ventajas de la sílice y sus derivados como recubrimiento, está el hecho de que son relativamente inertes y protegen el núcleo magnético de la oxidación. Pueden ser fácilmente funcionalizados, permitiendo gran variedad de enlaces químicos de especies fluorescentes y biológicas en la superficie, previenen la agregación de las partículas en solución, modifica la dispersidad de las nanopartículas incrementando la repulsión de Coulomb entre las

³⁶ Kikuchi, T.; Kasuya, R.; Endo, S.; Nakamura, A.; Takai, T.; Metzler-Nolte, N.; Tohji, K.; Balachandran, J. J. *Magn. Mater.* 323, no. 10 (2011): 1216–1222.

³⁷ Yu, W. W.; Chang, E.; Sayes, C. M.; Drezek, R.; Colvin, V. L. *Nanotechnology* 17 (2006): 4483–4487.

³⁸ Moros, M.; Pelaz, B.; López-Larrubia, P.; García-Martin, M. L.; Grazú, V.; De la Fuente, J. M. *Nanoscale* 2, no. 9 (2010): 1746–55.

³⁹ Marcelo, G.; Pérez, E.; Corrales, T.; Peinado, C. *J. Phys. Chem. C* 115, no. 51 (2011): 25247–25256.

⁴⁰ Kurihara, Y.; Takama, M.; Sekiya, T.; Yoshihara, Y.; Ooya, T.; Takeuchi, T. *Langmuir* 28 (2012): 13609–13615.

mismas, y son relativamente económicos. El único factor desfavorable al depositar un recubrimiento de SiO₂ sobre las nanopartículas de Fe₃O₄, sería la atenuación de la fuerza magnética del núcleo. A mayor espesor del recubrimiento de la sílica, mayor es el bloqueo de las interacciones dipolares⁴¹. Se pueden llevar a cabo diferentes procedimientos para realizar este recubrimiento, como el intercambio de ligando con aminopropilsilano (APS)⁴², el recubrimiento mediante el método sol-gel a partir de TEOS⁴³ o a través de microemulsiones (ciclohexano/Igepal CO-520⁴⁴, Tritón X-100/hexanol⁴⁵,...). En este caso, se recurre al uso de microemulsiones cuyo papel consiste en confinar y controlar el proceso de recubrimiento de modo que se favorezca la encapsulación de cada NP de manera independiente.

La última de las técnicas empleadas para la transferencia a agua de las muestras de NPs es el intercambio de ligando con ácido dimercaptosuccínico (DMSA)⁴⁶. Durante el intercambio, las nanopartículas se hacen reaccionar con la disolución de otro ligando, produciendo un desplazamiento parcial de la capa protectora de ligando inicial en la superficie de la nanopartícula. Así, uno de los grupos carboxílicos del DMSA sustituiría al del ácido oleico en su unión con la superficie de la NP, permaneciendo el otro de los grupos carboxílicos orientado hacia el exterior.

Finalmente, a fin de obtener cierta especificidad se ha procedido a la unión de la molécula peptídica sobre la superficie funcionalizada, por ese motivo han sido las NPs recubiertas con PMAO, que presentan un gran número de grupos carboxílicos libres, las que se han modificado para la posterior adición del ligando peptídico RGD.

⁴¹ Ding, H.; Zhang, Y.; Wang, S.; Xu, J.; Xu, S. C.; Li, G. *Chem. Mat* 24 (2012): 4572–4580.

⁴² Aslam, M.; Fu, L.; Li, S.; Dravid, V. P. *Journal of Colloid and Interface Science* 290, no. 2 (2005): 444–449.

⁴³ Kim, J.; Lee, J. and Lee, J., *J. Am. Chem. Soc.*, no. 128 (2006): 1–5.

⁴⁴ Zhang, M.; Cushing, B. L.; O'Connor, C. J., *Nanotechnology* 19, no. 8 (2008): 085601.

⁴⁵ Lu, C. W.; Hung, Y.; Hsiao, J. K.; Yao, M.; Chung, T. H.; Lin, Y. S.; Wu, S. H.; Hsu, S. C.; Liu, H. M.; Mou, C. Y.; Yang, C. S.; Huang, D. M.; Chen, Y. C. *Nano Lett.* 7, no. 1 (2007): 149–154.

⁴⁶ Mejías, R.; Pérez-Yagüe, S.; Gutiérrez, L.; Cabrera, L. I.; Spada, R.; Acedo, P.; Serna, J. C.; Lázaro, F. J.; Villanueva, A.; Morales, M. P.; Barber, D. F. *Biomaterials* 32, no. 11 (2011): 2938–52.

1.2. Obtención de NPs de Fe_3O_4

Se ha procedido a la optimización del método de descomposición térmica de precursores metal-orgánicos para la obtención de NPs de magnetita de tamaño controlado. Se ha utilizado un polialcohol por el rol polivalente que adquiere durante la reacción, ya que actúa simultáneamente como reductor y agente estabilizante. Para evitar la agregación de las partículas durante la etapa de crecimiento, hemos empleado surfactantes que se adhieren de forma reversible a la superficie de las nanopartículas y proporcionan un revestimiento orgánico, que actúa como barrera física o electrostática que evita la agregación, limita el crecimiento, estabiliza la nanopartícula en disolución y disminuye la reactividad de los átomos superficiales, previniendo la oxidación de ésta una vez sintetizada. Los precursores de hierro utilizados han sido $Fe(CO)_5$ y $Fe(acac)_3$ ⁴⁷.

Las NPs obtenidas se han utilizado como semilla, de forma que favorece el crecimiento de las nanopartículas ya formadas frente a la nucleación de nuevos núcleos, lográndose así partículas de mayor tamaño. Para cada adición se ha calculado la cantidad de hierro mínima que hay que añadir para un crecimiento teórico del diámetro de unos 2 nm. La cantidad de surfactantes a añadir en cada etapa, se ha estimado a partir del área superficial que tendría la partícula al crecer⁴⁸.

La preparación de las NPs por descomposición térmica a partir de pentacarbonilo de hierro (0) se realizó de la forma siguiente⁴⁹. En un matraz de tres bocas, donde se acoplan el refrigerante, el agitador y el termómetro, se mezclan 25 ml de dibenciléter con 5,74 g. (20 mmol) de 1,2-hexadecanodiol ($CH_3(CH_2)_{13}CHOHCH_2OH$) con agitación hasta su completa disolución. A continuación se añaden 0.5 ml (1 mmol) de ácido oleico ($CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$) y 2.8 ml (6 mmol) de oleilamina

⁴⁷ Meffre, A.; Mehdaoui, B.; Kelsen, V.; Fazzini, P. F.; Carrey, J.; Lachaize, S.; Respaud, M.; Chaudret, B. *Nano Lett.* 12, no. 9 (2012): 4722–4728.

⁴⁸ Castellanos-Rubio, I. *Preparation and Characterization of Pd, PdFe, Fe_3O_4 ; Potential Inducers of Magnetic Hyperthermia (PhD Thesis)* (University of Basque Country, Leioa, 2013).

⁴⁹ Castellanos-Rubio, I.; Insausti, M.; Garaio, E.; Gil de Muro, I.; Plazaola, F.; Rojo, T.; Lezama, L. *Nanoscale* 12 (2014): 7542–7552.

($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{NH}_2$). El matraz se coloca sobre una manta calefactora y después de sellarlo se mantiene en constante agitación mecánica (con pala de teflón) bajo flujo de Ar (Figura 1.2).

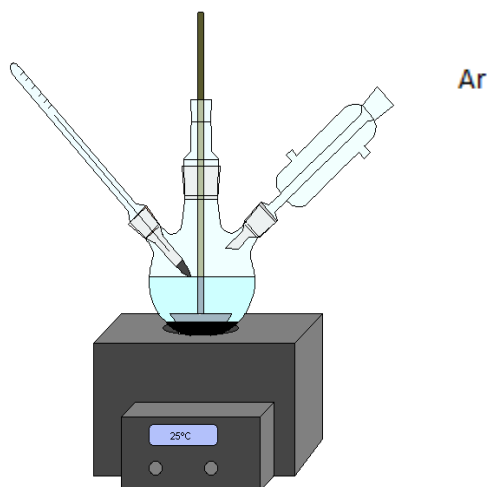


Figura 1.2. Esquema del montaje sintético utilizado para la preparación de las muestras.

La mezcla se calienta hasta $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se añaden $133.3\text{ }\mu\text{l}$ (1 mmol) de pentacarbonilo de hierro (0), $\text{Fe}(\text{CO})_5$, con jeringa larga previamente purgada. Se deja en agitación durante 30 min. para que tenga lugar la nucleación de las nanopartículas.

La descomposición del $\text{Fe}(\text{CO})_5$ produce unos vapores amarillos y la disolución adquiere una ligera tonalidad marrón. A continuación, se eleva la temperatura hasta el punto de ebullición del dibencil éter (280°C) y se mantiene a reflujo durante 20 min. , experimentándose un cambio de color a una tonalidad negra. Después, se deja atemperar y se elimina la atmósfera inerte. Se trasvasa la mezcla a un vaso de precipitados y se añaden 100 ml de etanol para desestabilizar el sistema, de forma que las nanopartículas precipitan. Seguidamente, se centrifuga la mezcla a 3500 r.p.m. y el sólido obtenido se redisuelve en 20 ml de tolueno para añadir, posteriormente, 50 ml de etanol. Se centrifuga (a 3500 r.p.m.) esta disolución para eliminar las partículas que no son estables en dispersión y después de realizar este proceso

de limpieza varias veces, se resuspenden en 15 ml de tolueno y se almacena a temperatura ambiente. El producto recogido es una dispersión de color negro formado por nanopartículas de magnetita que denominaremos Pol X (Tabla 1.1).

Estas NPs son de unos 8 nm y con objeto de obtener mayores tamaños y de mejorar su distribución, se procedió a realizar adiciones consecutivas sobre la reacción inicial, además de ir variando parámetros como la concentración de precursor, de ligandos y de reductor o incluso el tiempo de reflujo de cada etapa. Para el crecimiento de las nanopartículas se llevaron a cabo hasta cuatro adiciones sucesivas, de tal modo que no se interrumpe la agitación mecánica y se eliminan las etapas de lavado intermedias, contribuyendo a la mejora de la dispersión de tamaños final. Se procede, de esta manera, a la adición de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ al matraz a 140°C sobre la mezcla de reacción inicial. Una vez alcanzada la temperatura de reflujo, se añade ácido oleico y oleilamina, aumentando las cantidades de los mismos según el incremento de tamaño que se quiera conseguir y manteniendo en agitación mecánica a esa temperatura. El procedimiento a seguir es similar al primer caso. Finalmente, el proceso de limpieza se realiza del mismo modo que en el caso de la síntesis inicial.

Tabla 1.1. Condiciones de síntesis de muestras realizadas por descomposición de $Fe(CO)_5$.

MUESTRA	$Fe(CO)_5$ (mmol)	A.Oleico (mmol)	Hexadecanediol (mmol)	Oleilamina (mmol)	Reflujo (min.)
Pol 1	1	1	20	6	20
Pol 2	1,3	1,2	20	6,6	20
Pol 3, 4	1,3,8	1,2,6	20	6,6,6	20
Pol 5, 6, 7, 18, 19, 21	10	15	20	15	120
Pol 8	1,3,8	1,2,6	20	15	120
Pol 9	1,3,8	1,2,6	20	6,6,6	20
Pol 10	1,3,8	1,2,6	20	6,6,6	120
Pol 11	10	15	15	15	120
Pol 12	10	15	10	15	120
Pol 13, 14	10	15	5	15	120
Pol 15, 17	1,3,8	1,2,6	15	6,6,6	60
Pol 16	10	15	5	15	120
Pol 17	1,3,8	1,2,6	5	6,6,6	60
Pol 20	20	30	10	30	120
Pol 22	1,3,8	1,2,6	15	6,6,6	120
Pol 23	3,9,15	1,2,6	5	6,6,6	90
Pol 24	3,9,15	1,2,6	5	6,6,6	120
Pol 25, 26, 34, 43, 58	3,9,10,15	4,5,8,9	5	6,6,6,6	120
Pol 27	5	7,5	5	6	120
Pol 28	2,6,9,13	2,4,7,10	5	6,6,6,6	120
Pol 29	20	30	5	6	120
Pol 30	4,10,15,20	5,6,12,13	5	6,6,6,6	120
Pol 31	3,9,10,17	4,5,8,9	5	6,6,6,6	120

En la Tabla 1.1 se han representado todas las síntesis realizadas después de variar distintos parámetros de reacción con el fin de obtener NPs de mayor tamaño sin comprometer la dispersión de los mismos. De esta manera, se obtuvieron muestras de una única adición (Pol 1), dos adiciones sucesivas (Pol 2), tres adiciones (Pol 3, 4, Pol 8-10, Pol 15, 17 y Pol 23, 24) y cuatro adiciones (Pol 25, 26, 28 y Pol 30-58) requiriendo de un tiempo total de síntesis de hasta 48 h, todo ello con objeto de aumentar el tamaño de forma controlada. Se limitaron los experimentos a cuatro adiciones como máximo puesto que el montaje de reacción presentaba ciertas limitaciones frente a la reacción altamente exotérmica que se produce en cada etapa. Se variaron las concentraciones de reactivos (Pol 5-7, Pol 11-14, Pol 16, Pol 18-21, Pol 27,

29, 30 y 31) con el fin de concentrarlos y alcanzar mayores tamaños optimizando el tiempo total de reacción. También se varió el tiempo de reflujo (Pol 9, 10) con el objeto de homogeneizar la muestra y obtener una mejora en la adsorción de ligandos. Finalmente, se modificó la cantidad de surfactante/reductor (Pol 11, 12) para evitar la aglomeración de la muestra final y mantener un mayor control sobre el tamaño y la morfología de las NPs. Se consiguieron así diferentes combinaciones de síntesis.

El precursor utilizado anteriormente planteaba ciertos inconvenientes: la alta toxicidad del $\text{Fe}(\text{CO})_5$ y la imposibilidad de concentrarlo aún más en el sistema de reacción por ser una reacción muy exotérmica y desprender gran cantidad de vapores, lo cual impide alcanzar mayores tamaños de partícula. Con el objeto de obtener NPs de mayor tamaño sin alargar en exceso el proceso de síntesis se procedió a sintetizar nanopartículas por descomposición térmica, usando acetilacetato de hierro como precursor⁵⁰. Para la obtención de las NPs por el método de crecimiento de semillas a partir de acetil acetato, $\text{Fe}(\text{acac})_3$, en un matraz de tres bocas se realiza una mezcla de 1,2-hexadecanediol (5 mmol, 1,07g) como reductor y surfactante, ácido oleico (3mmol, 1,4 ml) y oleilamina (6mmol, 2,1ml) como ligandos, sobre 25 ml de dibenciléter. Seguidamente, se añade el precursor $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (3mmol, 1,1g), calentando la mezcla de reacción bajo agitación mecánica y un flujo de Ar hasta una temperatura de 200°C. Se deja en agitación durante 30 min. para la nucleación de las nanopartículas y después se aumenta la temperatura hasta 280°C (temperatura de reflujo del disolvente). Cuando se ha finalizado la reacción, se deja atemperar y se elimina la atmósfera de Ar. Tras esto, se realizan las siguientes adiciones sobre las NPs formadas (Pol 32).

Para el crecimiento de las nanopartículas por adiciones sucesivas se llevan a cabo cuatro adiciones totales, de similar modo al caso anterior⁵¹, añadiendo una mezcla de ácido oleico y oleilamina en el matraz a temperatura ambiente sobre NPs sintetizadas en la reacción inicial. Se añade la cantidad de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ requerida en cada caso y se sube la temperatura hasta llegar a la

⁵⁰ Zhang, L.; He, R.; Gu, H.C., *Materials Research Bulletin* 41, no. 2 (2006): 260–267.

⁵¹ Huang, J. H.; Parab, H. J.; Liu, R. S.; Lai, T. C.; Hsiao, M. Chen, C. H.; Sheu, H. S.; Chen, J. M.; Tsai, D. P.; Hwu, Y. K. *J. Phys. Chem. C* 112, no. 40 (2008): 15684–15690.

temperatura de nucleación (200°C) y, tras 30 min., se lleva a la temperatura de reflujo manteniéndose en agitación durante 90 min. Finalmente, se deja atemperar y se trasvasa la mezcla a un vaso de precipitados. Se añaden 100 ml de etanol para desestabilizar el sistema, de forma que las nanopartículas precipitan. Seguidamente, se centrifuga la mezcla a 3500 r.p.m. y el sólido obtenido se redisuelve en 20 ml de tolueno para añadir, posteriormente, 50 ml de etanol. Se centrifuga (a 3500 r.p.m.) esta disolución de modo que se eliminan aglomerados más grandes y después de realizar este proceso de limpieza varias veces, se resuspenden en 15 ml de tolueno y se almacena a temperatura ambiente. El producto que se recoge es una dispersión de color negro que denominaremos Pol X (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Condiciones de síntesis de muestras realizadas por descomposición de $Fe(acac)_3$.

MUESTRA	$Fe(acac)_3$ (mmol)	A.Oleico (mmol)	Hexadecanediol (mmol)	Oleilamina (mmol)	Reflujo (min.)
Pol 32	3,9,10,15	3,5,6,8	5	6,6,6,6	90
Pol 33, 35	3,9,10,15	4,5,8,9	5	6,6,6,6	90
Pol 36, 39	3,9,10,15	5,7,9,11	5	7,7,7,7	90
Pol 37	3,9,10,15	5,7,9,11	5	6,6,6,6	90
Pol 38	3,9,10,15	5,7,9,11	5	5,5,5,5	90
Pol 40	3,9,10	5,7,9	5	6,6,6	90
Pol 41	3,9	5,7	5	6,6	90
Pol 42	2,2	4,4	8,8	4,4	90
Pol 44	3,9	4,5	12,3	6,6	180
Pol 45	3,9,10	4,5,8	12,3,3	6,6,6	180
Pol 46	3,9,10,15	4,5,8,9	12,3,3,3	6,6,6,6	180
Pol 47	2,2	4,4	8,8	4,4	60
Pol 48	3,9	3,9	12,5	3,9	60
Pol 49	3,9	5,11	12,5	5,11	60
Pol 50	3,9	2,6	12,5	2,6	90
Pol 51	3,9,12	2,6,10	12,5,5	2,6,10	90
Pol 52	3,9,12	2,6,15	12,5,5	2,6,15	90
Pol 53, 56	3,9,12	5,11,15	12,5,5	5,11,15	90
Pol 54, 57	3,9,12,15	5,11,15,17	12,5,5,5	5,11,15,17	90
Pol 55	3,9,	5,11,	12,5,	5,11	90

Como en la síntesis a partir de $Fe(CO)_5$, se obtuvieron muestras a partir de dos adiciones sucesivas (Pol 41, 42, 44, Pol 47-50 y Pol 55), tres adiciones (Pol 40, 45, Pol 51-53 y Pol 56) y cuatro adiciones (Pol 32-39, Pol 46, Pol 54 y Pol 57) requiriendo de un tiempo total de síntesis de hasta 48 h. Se estudió, de esta forma, el efecto de la variación en el tamaño y dispersión de NPs. Se modificaron al mismo tiempo las concentraciones de ácido oleico (Pol 32, 35) con el fin de obtener un mayor recubrimiento orgánico. Con el mismo fin se modificó la cantidad de ácido oleico y oleilamina (Pol 36, 38 y 39). En otros casos, se incrementó la cantidad de oleilamina (Pol 52-57) y de hexadecadiol (Pol 42 y Pol 47) para obtener un mayor efecto surfactante y una mejora en la dispersión de tamaños final. De la misma manera, se varió la concentración de

precursor y de tiempo de reflujo (Pol 44-49) buscando alcanzar un tamaño de partícula suficiente rentabilizando el tiempo total de reacción. Se obtuvieron de igual manera diferentes posibles combinaciones en las condiciones de síntesis de forma que se prepararon las NPs de la Tabla 1.2.

1.3. Transferencia a fase acuosa

Teniendo en cuenta que las NPs sintetizadas no pueden ser utilizadas en medio fisiológico deben ser recubiertas por un ligando que las convierta en hidrosolubles. En la introducción se ha comentado las diferentes estrategias que se pueden utilizar para alcanzar dicho objetivo. En este trabajo se ha recurrido a diferentes métodos: intercambio por el ácido dimercaptosuccínico (DMSA), el recubrimiento con los silanos tetraetiltrióxosilano (TEOS) y ácido trietoxisilpropilmaleámico (TESPMA) y el recubrimiento con el polímero de alto peso molecular poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO).

1.3.1. Intercambio de ligando con DMSA

Una de las primeras opciones barajadas para realizar la transferencia a fase acuosa fue realizar el intercambio de ligando del ácido oleico por otro ligando con más de un grupo carboxílico terminal como el ácido dimercaptosuccínico (DMSA, $C_4H_6O_4S_2$) (Figura 1.3). De esta manera, quedaría un grupo funcional libre para modificar posteriormente con el promedio del radio de las NPs hidrófobas previamente sintetizadas.

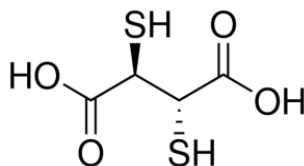


Figura 1.3. Fórmula estructural del ácido dimercaptosuccínico (DMSA).

La estabilización se realiza por repulsión electrostática de los grupos carboxilo de su superficie y la etapa clave del proceso fue la adición de NaOH

al resuspender las partículas en agua para evitar que los dos grupos carboxilo puedan reorientarse desde la superficie de las partículas hacia el exterior perdiendo así el recubrimiento (Figura 1.4).

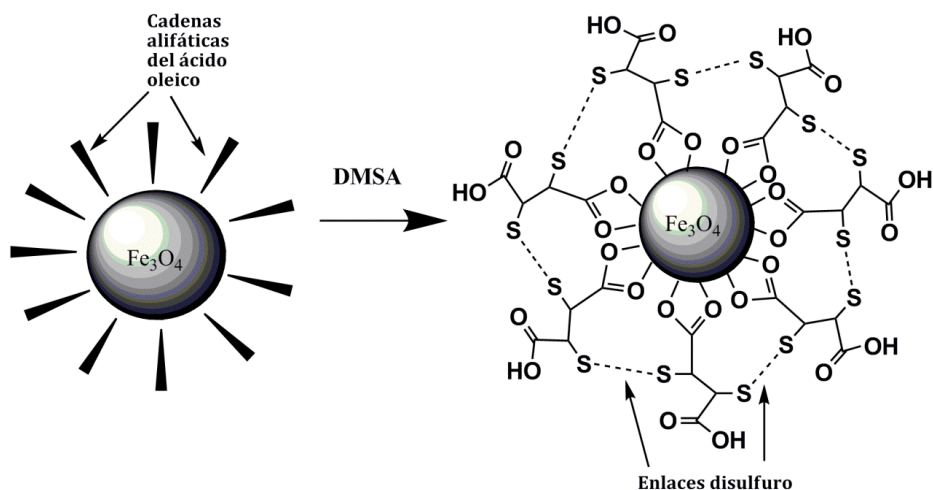


Figura 1.4. Esquema de la reacción de intercambio del ligando por DMSA.

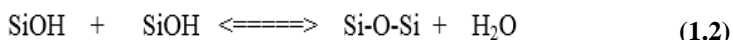
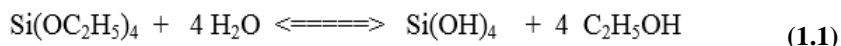
Para la obtención de estas partículas se precipitaron 50 mg de NPs de Fe_3O_4 @oleico con etanol y se resuspendieron en tolueno donde, posteriormente, se añadió una disolución de 90 mg de DMSA en 5 ml de dimetil sulfóxido (DMSO)⁵².

La mezcla resultante se sonicó durante 5 minutos y se agitó mecánicamente en una noria durante 72 horas. Una vez terminada la agitación, se lavaron y centrifugaron sucesivamente las partículas con tolueno, etanol y acetona. A continuación, se redispersaron las partículas en agua y se añadió unas gotas de NaOH 0,1 M para reducir el diámetro hidrodinámico de la suspensión. Finalmente, se dializó la suspensión durante 3 días y se filtró a presión por un filtro de 0,2 μm de tamaño de poro. Así se obtuvo una dispersión de NPs de magnetita en agua que se nombró como Pol X_DMSA.

⁵² Cabrera, L. I.; Somoza, Á.; Marco, J. F.; Serna, J. C.; Morales, M. P. J. *Nanopart. Res.* 14, no. 6 (2012): 873.

I.3.2. Recubrimiento con TEOS

Para realizar el encapsulamiento con sílice se ha elegido el método sol-gel a partir del tetraetiltrióxosilano (TEOS, Si (OC₂H₅)₄) como precursor⁵³. El proceso sol-gel parte de la obtención de un “sol” o suspensión de partículas coloidales o macromoléculas poliméricas de tamaño inferior a los 100 nm en un líquido. Habitualmente, el sol se obtiene por la vía polimérica, lo cual implica la hidrólisis (Ecuación (1.1), tanto en medio ácido como básico, y la condensación (Ecuación (1.2) de precursores metalorgánicos.



El progreso de la reacción de condensación da lugar, finalmente, a la formación de un gel, que consiste, en este caso, en una red de enlaces Si-O-Si interconectada en tres dimensiones⁵⁴. El objetivo es reducir al mínimo la presencia de grupos OH y reemplazar los átomos de hidrógeno de los grupos OH por grupos Si-R, hidrolíticamente estables.

Aunque se pueden llevar a cabo diferentes procedimientos para realizar este recubrimiento, se ha recurrido al método sol-gel asistido por microemulsión, empleando surfactantes del tipo Tritón X-100 (t-Oct-C₆H₄(OCH₂CH₂)_nOH), n=9-10) o Igepal-CO520 (C₁₅H₂₄O(C₂H₄O)_n, n~5) para la formación de micelas que controlen el depósito de sílice⁵⁵. El procedimiento experimental para realizar dicho encapsulamiento consistió en dispersar 5 mg de Fe₃O₄@oleico en 1,5 ml de ciclohexano. En otro vial se adicionan 0,8 ml de surfactante IGEPAL-CO520, para favorecer la encapsulación individual, en otros 15 ml de ciclohexano. Se añade la dispersión de NPs sobre esta mezcla y se deja en agitación durante 30 min. Con el fin de adecuar el medio para la hidrólisis de las moléculas de silano se

⁵³ Arriagada, F.J.; Osseo-Asare, K., *Journal of colloid and interface science* 211, no. 2 (1999): 210-220.

⁵⁴ Carturan, G.; Dal Toso, R.; Boninsegna, S; Dal Monte, R. *J. Mat. Chem.* 14, no. 14 (2004): 2087.

⁵⁵ Ma, M.; Zhang, Y.; Yu, W. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects: Physicochem. Eng. Aspects* 212 (2003): 219-226.

añaden 0,13 ml de NH_4OH al 25% sobre la mezcla anterior y se deja reaccionar otros 15 min. Finalmente, se añade 150 μl de TEOS para el recubrimiento de las NPs y se mantiene en agitación durante 24 h (Figura 1.5).

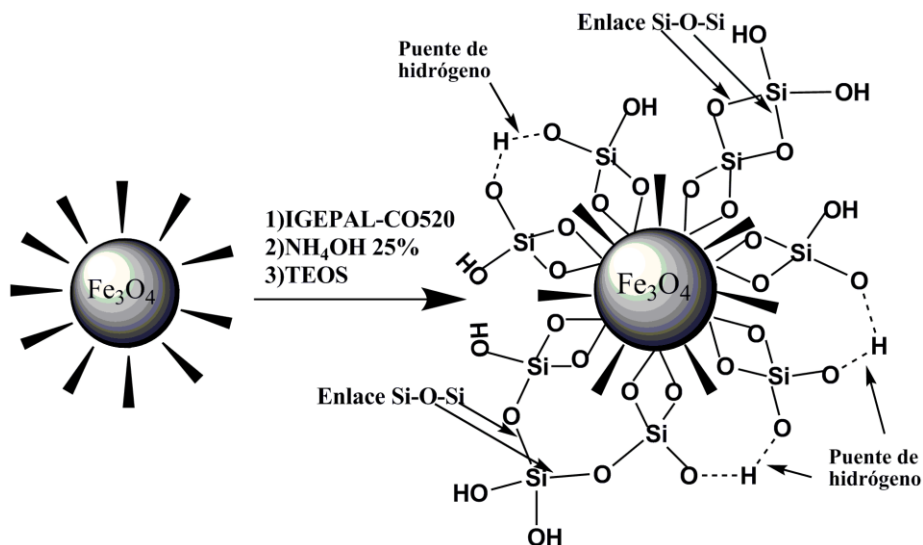


Figura 1.5. Esquema de la reacción de hidrólisis básica sobre las NPs recubiertas con TEOS.

Seguidamente, la dispersión resultante se lava dos veces con metanol y otras dos con agua destilada centrifugando a 9000 r.p.m., de modo que se elimine el exceso de reactivos. Las NPs obtenidas con el recubrimiento con TEOS finalmente se resuspenden en agua destilada y se nombrarán como Pol X_TEOS.

I.3.3. Recubrimiento con TESPMA

El recubrimiento con TEOS no proporciona ninguna funcionalidad específica, por lo que sería necesario realizar una segunda etapa sintética para funcionalizar las NPs. Por este motivo se recurrió al ácido trietoxisilipropilmaleámico (TESPMA, $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{NSi}$) como alternativa para recubrir las NPs magnéticas. Este proceso se realizó mediante una mezcla de fases dado que las NPs estaban sintetizadas en medio orgánico y el TESPMA resultaba inmisible (Figura 1.6).

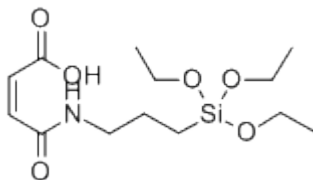


Figura 1.6. Fórmula estructural del ácido trietoxisilipropilmaleámico (TESPMA).

Teniendo en cuenta que un exceso de la molécula podría producir aglomerados, dada la longitud de la cadena y la presencia de varios grupos funcionales susceptibles a reaccionar. Se realizó una estimación de la cantidad máxima de molécula que se requiere para la funcionalización de la superficie conociendo el diámetro de la partícula y la cantidad de materia orgánica presente. El procedimiento experimental llevado a cabo consistió en realizar una disolución 0,03 M de TESPMA en 10 ml de agua destilada a la que se añadió 100 μ l de HAc para hidrolizar los grupos etoxi y asegurar la unión de éstos a la superficie (Figura 1.7).

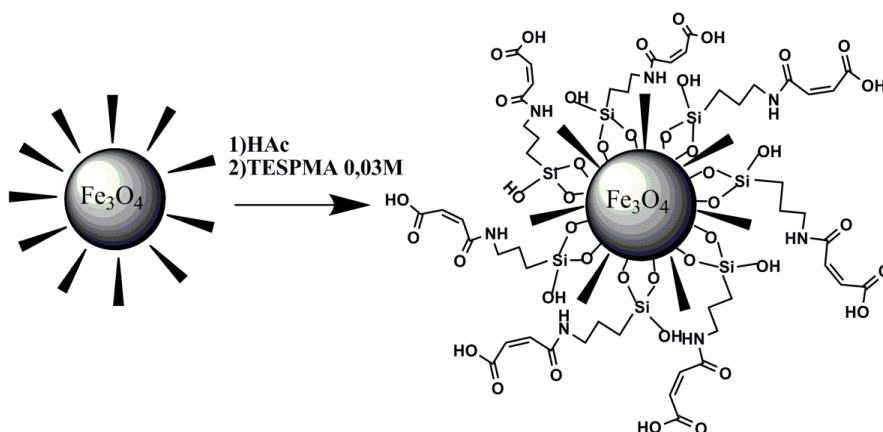


Figura 1.7. Esquema de la reacción de hidrólisis básica sobre las NPs recubiertas con TESPMA.

Esta mezcla se deja reaccionar durante 1h y, una vez realizada la disolución, se efectúa una dilución 1/10 de TESPMA 0,03 M/H₂O (v/v) en 8,5 ml de agua destilada. Por otro lado, se dispersan 11 mg de NPs de magnetita en 1,5 ml de THF y se añaden sobre la anterior disolución de TESPMA previamente preparada. La mezcla se deja en agitación durante 24 h y

posteriormente se realizan dos lavados con etanol y otros dos con agua destilada mediante centrifugado a 3500 r.p.m., redispersando en ultrasonidos. Finalmente, la muestra de magnetita recubierta con TESPMA se dispersa en agua destilada y se nombra como Pol X_TESPMA.

I.3.4. Recubrimiento de las NPs con PMAO

Finalmente, otra de las estrategias utilizadas para efectuar la transferencia a fase acuosa es realizar un recubrimiento mediante la formación de una segunda capa orgánica empleando el polímero anfifílico poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO, $(C_{22}H_{38}O_3)_n$) (Figura 1.9). La incorporación de una cadena alifática al polímero es imprescindible para que éste recubra efectivamente a las NPs, mediante una unión multipuntual hidrofóbica entre las cadenas alifáticas del polímero y las cadenas alifáticas adsorbidas en la superficie de la nanopartícula. Por lo tanto, para dificultar la desorción del polímero, resulta conveniente que la longitud de la cadena que se incorpora al polímero sea al menos similar a la del ácido oleico presente en la superficie de la partícula.

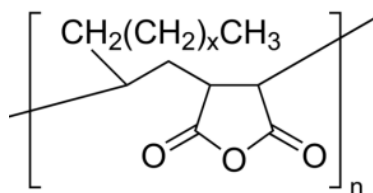


Figura 1.8. Fórmula estructural del poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO).

Según el protocolo establecido por W. Parak y col. por cada nm^2 de superficie se añaden 200 unidades de monómero⁵⁶. El recubrimiento polimérico se hace sobre el revestimiento de ácido oleico, por lo tanto, para estimar la cantidad de polímero para el recubrimiento se ha tenido en cuenta el diámetro de la partícula y la cantidad de materia orgánica presente.

⁵⁶ Parak, W. J.; Lin, C. J.; Sperling, R. A.; Li, J. K.; Yang, T. Y.; Li, P. Y.; Zanella, M. Chang, W. H. *Small* 4, no. 3 (2008): 334–341.

El procedimiento experimental para una reacción típica se describe a continuación. Se añaden 28 mg de NPs de magnetita sobre 200 ml de CHCl_3 , con la cantidad correspondiente de PMAO (30000-50000 g/mol) (calculado a partir del tamaño de la nanopartícula). La mezcla se sonicó durante 20 minutos y, a continuación, se evaporó el disolvente en un rotavapor. Posteriormente, se realizó la hidrólisis de los grupos anhídridos con una mezcla de NaOH 0,1M (Figura 1.9).

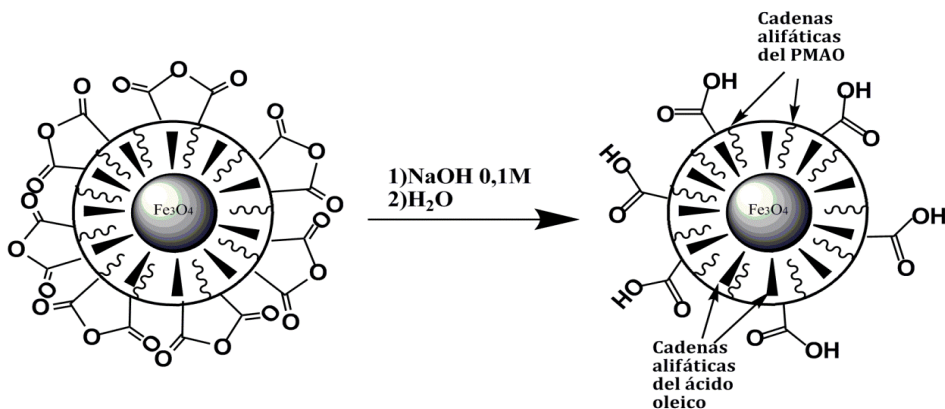


Figura 1.9. Esquema de la reacción de hidrólisis básica sobre las NPs recubiertas con PMAO.

La muestra se filtró en un filtro de 0,2 μm , eliminando así los agregados que pudiesen existir. Para efectuar el lavado de la dispersión acuosa, ésta se trasvasó a un tubo de ultracentrífuga y se centrifugó a 24000 r.p.m. a 4°C durante 2h, de tal forma que se concentra la dispersión en la parte superior del tubo, y la fase acuosa se desecha, con el fin de separar las micelas de polímero presentes en las muestras. Este proceso de limpieza se efectúa dos veces. Para finalizar, la muestra obtenida se resuspende en agua destilada nombrándola como Pol X_PMAO.

1.4. Funcionalización con el péptido RGD modificado

Uno de los objetivos principales del presente trabajo es proveer de la especificidad necesaria a las nanopartículas biocompatibles para, posteriormente, dirigir las a la zona tumoral y estudiar la eficacia de la hipertermia magnética en el tumor. En este sentido, ya se había avanzado que

las integrinas sobreexpresadas en la angiogenesis tumoral presentan afinidad por las moléculas peptídicas tipo RGD.

Existen diversos mecanismos para establecer la unión de este tipo de moléculas peptídicas a sistemas nanoparticulados⁵⁷. Algunos de los más utilizados son la 1,3-cicloaddición azida-alquino, ‘química click’⁵⁸ o el método por activación con carbodiimidas⁵⁹ entre grupos carboxílicos y grupos amino, basados en la formación de enlaces covalentes, relativamente estables (Figura 1.10).

Para realizar la activación a través de carbodiimidas se requiere de una superficie carboxilada que reaccione con un grupo amina. Este tipo de unión aporta una orientación favorable ya que los grupos carboxílicos se localizan lejos de la zona de unión de la molécula peptídica⁶⁰.

Las reacciones tipo química “click” y, en particular, las cicloaddiciones con catalizadores de cobre, han sido extensamente utilizadas para la preparación de moléculas bioconjugadas. Esta técnica es de especial interés ya que la formación de un grupo triazol a partir de la reacción entre una azida con un alquino es una estructura conjugada que soporta la transferencia de electrones⁶¹.

⁵⁷ Vashist, S. K. *Diagnostics* 2, no. 3 (2012): 23–33.

⁵⁸ Díaz, D. D.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; Fokin, V.; Hawker, J. *An. Quím.* 104, no. 3 (2008): 173–180.

⁵⁹ Bolley, J.; Guenin, E.; Lievre, N.; Lecouvey, M.; Soussan, M.; Lalatonne, Y.; Motte, L. *Langmuir* 29, no. 47 (2013): 14639–14647.

⁶⁰ Moros, M.; Hernández, B.; Garet, E.; Dias, J. T.; Sáez, B.; Grazú, V.; González -Fernández, A.; Alonso, C.; de la Fuente, J. M. *ACS Nano* 6 no. 2 (2012): 1565–1577.

⁶¹ Colombo, M.; Bianchi, A. *Molecules* 15 (2010): 178-197.

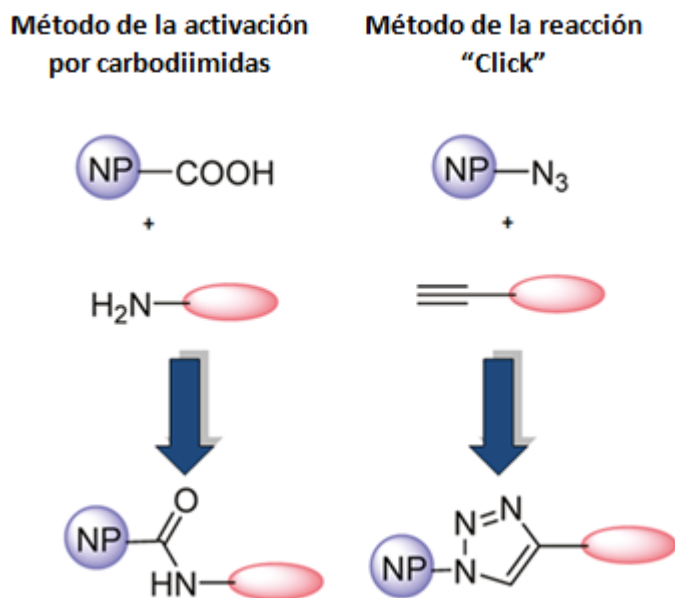


Figura 1.10. Diferentes métodos de unión de péptidos a sistemas nanoparticulados.

Teniendo en cuenta que, para la incorporación del RGD, es necesario que la nanopartícula posea grupo funcionales $-\text{COOH}$ se ha elegido el recubrimiento más eficaz y que mayor estabilidad coloidal ha aportado en los sistemas sintetizados, el obtenido con el polímero PMAO. Por lo tanto, se procedió a la funcionalización con el péptido modificado sobre este sistema en particular. Para esta funcionalización se utilizaron las muestra con mejores dispersión de tamaños y mayor estabilidad en medio acuoso.

Sin embargo, los péptidos que se quieren incorporar no presentan un grupo amino sino que son un derivado sintético de RGD [Arg-Gly-Asp-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂N₃]⁶² (azida-RGD) que contiene un grupo azida terminal (Figura 1.11) adecuado para generar una reacción de cicloadición [3+2]. Esta molécula fue sintetizada en el Departamento de Química Orgánica I con un rendimiento global del 47% en cuatro etapas a partir de los aminoácidos protegidos comerciales Boc-Arg(Pbf)OH, GlyOBn, Fmoc-

⁶² Aizpurua, J.M.; Azcune, I.; Fratila, R.M.; Balentova, E.; Sagartazu-Aizpurua, M. Miranda, J. I. *Org. Lett.* 12 (2010): 1584-1587.

Asp(OtBu)OH y la aminoazida $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$, empleando reacciones ordinarias de síntesis peptídica.

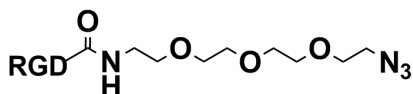


Figura 1.11. Fórmula estructural del péptido RGD modificado con el grupo azida terminal.

De esta manera, la incorporación de este RGD no se puede realizar directamente sobre los grupos carboxílicos, si no que hay que llevarla a cabo sobre una molécula intermedia o *linker* (Figura 1.12) consistente en un carbamato que incorpora, simultáneamente, una alquilamina y un ciclooctino, la molécula (2-(2ciclooct-2-in-1-iloxi)etoxietil(2-aminoetil) carbamato)^{63,64}. Ya que este compuesto se halla activado por tensión de anillo⁶⁵, es capaz de producir la reacción “click” con el grupo azida del tripéptido RGD en ausencia de cobre a temperatura ambiente y en medio acuoso, evitando la presencia de catalizadores tóxicos de cobre requeridos habitualmente⁶⁶.

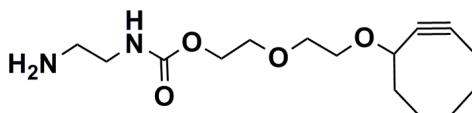


Figura 1.12. Fórmula estructural del linker (2-(2ciclooct-2-in-1-iloxi)etoxietil(2-aminoetil)carbamato).

Globalmente, el procedimiento de funcionalización de las MNp consistió en cuatro etapas: la activación en un medio acuoso tamponado de los

⁶³ Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Balentová, E.; Azcune, I.; Ignacio, J.; Jiménez-Barbero, J.; Cañada, F. J.; Miranda, J. I. *Org. Lett.* 10, no. 11 (2008): 227–2230.

⁶⁴ Cardiel, A.; Michelle, B.; Bishop, L.; Louis, K.; Yeager, J.; Tan, Y.; Hames, R. *ACS Nano* 6, no. 1 (2012): 310–318.

⁶⁵ Agard, N. J.; Preschner, J. A.; Bertozzi, C. R., *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004): 15046–15047.

⁶⁶(a)Tornøe, C.W.; Christensen, C.; Meldal, M.J. *Org. Chem.* 67 (2002): 3057–3064.(b)Vsevolod, V.; Rostovtsev, L.G.; Green, V.V.; Fokin, K.; Sharpless, B. *Angew. Chem.* 41 (2002): 2596–2598.

grupos carboxilo exteriores del PMAO con la carbodiimida hidrosoluble (EDC, $C_8H_{17}N_3$), la formación “in situ” de amidas entre dichos grupos activados y el grupo amino de los *linker* cicloalquínico, el bloqueo de las cargas superficiales libres con una molécula de bajo peso molecular (TRIS, $C_4H_{11}O_3N$) y la reacción “click” del grupo ciclooctino del *linker* con las azidas del RGD mencionado (Figura 1.13). En estas condiciones se funcionalizan un 5-15% de los grupos carboxilos originales de las MNp y, al mismo tiempo, se consiguen preservar las propiedades fisicoquímicas y la hidrocompatibilidad de las MNp alquínicas, gracias a los espaciadores hidrofílicos de oligoetilglicol.

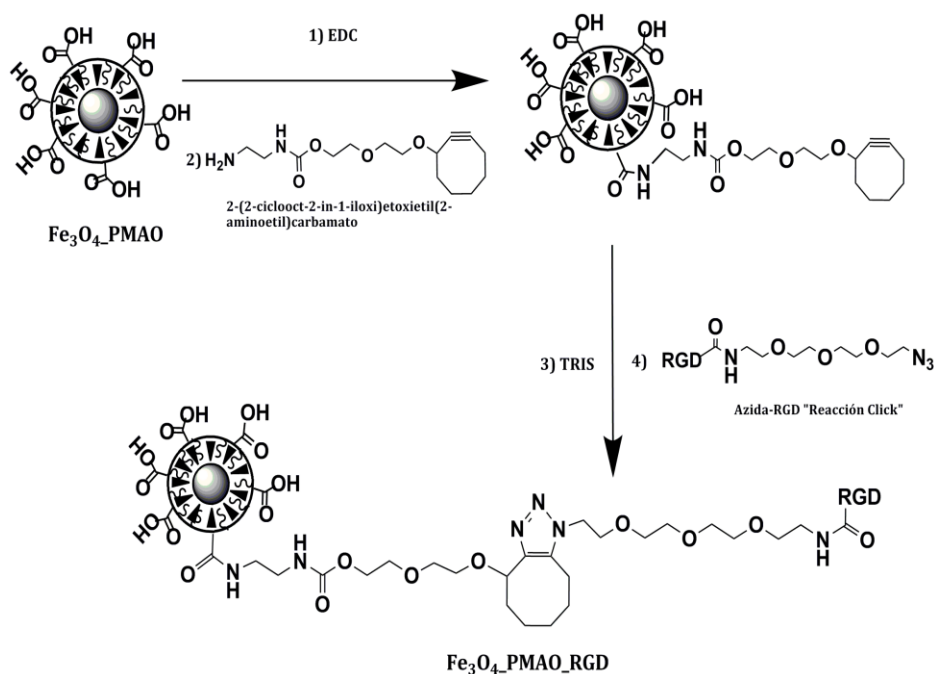


Figura 1.13. Esquema de la funcionalización superficial de las nanopartículas con grupos carboxilos superficiales con el péptido modificado.

A continuación pasamos a describir el procedimiento empleado. En primer lugar se añadieron 0,7 mg de NPs de Fe₃O₄ en un total de 0,5 ml de buffer SSB 50 mM a pH 9 ($H_3BO_3/ Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$). Tras ello, se adicionaron 100 μ l de EDC (Hidrocloreuro de (N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) (0,1 mg/ml) para activar los grupos carboxílicos de la

superficie⁶⁷. Esta mezcla se dejó en agitación mecánica durante 5 min, para después añadir 10 µl de la molécula modificada con el grupo amino (0,1 mg/ml). Se dejó reaccionar durante 2 h en agitación a temperatura ambiente y se añadieron 10 µl de TRIS 1 M (Tris-hidroximetilaminometano) para bloquear las cargas superficiales, dejando reaccionar durante 30 min. en agitación a temperatura ambiente. Las nanopartículas alquínicas se lavaron 3 veces en amicones de 100K mediante centrifugación a 14000 r.p.m. con agua destilada para la eliminación de los reactivos en exceso, proporcionando disoluciones estables almacenables durante varios días a temperaturas entre 0-4°C.

Finalmente, para incorporar el grupo RGD, a 0,5 ml de la disolución anterior se añadieron 0,1 ml de una disolución acuosa $4,4 \times 10^{-4}$ M del compuesto Arg-Gly-Asp-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂N₃. La mezcla se homogeneizó durante 30 segundos en un baño de ultrasonidos y se mantuvo a 35°C durante 2h. Pasado dicho tiempo, se realizaron lavados usando amicones de 100K por centrifugación (14000 r.p.m., 5 min) tres veces con agua destilada para eliminar los reactivos en exceso.

Con el fin de optimizar la cantidad de péptido a añadir y comprobar el grado de aglomeración de las nanopartículas finales, se prepararon muestras con diferentes volúmenes de péptido para someterlas a una electroforesis en gel de agarosa. Se adicionaron 0, 5, 10, 15, 20 µL de RGD y se obtuvieron las dispersiones Pol 25_PMAO_RGD Blanco, Pol 25_PMAO_RGD 5, Pol 25_PMAO_RGD 10, Pol 25_PMAO_RGD 15 y Pol 25_PMAO_RGD 20, respectivamente.

El gel de agarosa actúa como un tamiz molecular y permite separar moléculas según su tamaño y forma. La resolución y la velocidad de separación de las moléculas son reguladas por la concentración de agarosa en el gel y el voltaje aplicado. Así, comparando con las moléculas de partida de cada síntesis, se puede comprobar el tamaño, la dispersión y la carga de las moléculas ya funcionalizadas. Una vez ya preparado el gel, se introduce en

⁶⁷ Conde, J.; Ambrosone, A.; Sanz, V.; Hernandez, Y.; Marchesano, V.; Tian, F.; Child, H.; Berry, C. C.; Ibarra, M. R.; Baptista, P. V.; Tortiglione, C.; De la Fuente, J. M. *ACS Nano*, no. 9 (2012): 8316-8324.

una cubeta de electroforesis, cubriéndolo con un buffer. Aplicando un determinado voltaje, las nanopartículas se cargan y recorren el gel hacia el electrodo de carga opuesta de diferente forma en cada caso.

Se utilizó una cubeta de electroforesis horizontal y un gel de agarosa al 1,5 %, el cual se sumergió en una disolución tampón de TBE 0,5 mM (buffer tris-borato-EDTA). Antes de inyectar las muestras en los pocillos del gel, se mezclaron 20 μ l de cada producto funcionalizado (Pol 25_PMAO_RGD) con 20 μ l de glicerol. La electroforesis se realizó bajo un voltaje de 150 V y una intensidad de 90 mA durante 30 min. Los geles se visualizaron y fotografiaron (Figura 1.14).

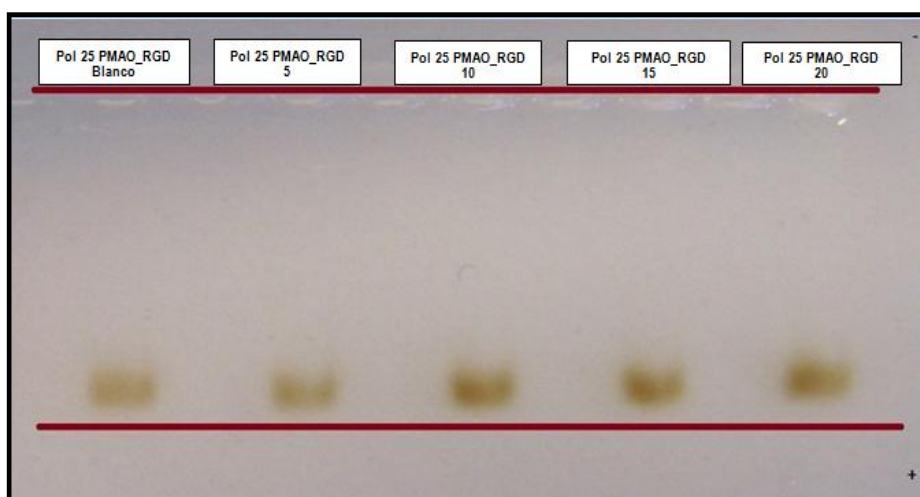


Figura 1.14. Gel de agarosa correspondiente a las muestras Pol 25_PMAO_RGD Blanco, Pol 25_PMAO_RGD 5, Pol 25_PMAO_RGD 10, Pol 25_PMAO_RGD 15 y Pol 25_PMAO_RGD 20.

Dado que las nanopartículas sintetizadas estaban cargadas negativamente debido a la presencia de grupos carboxilos se espera la migración hacia el electrodo positivo. Una vez funcionalizadas con el péptido, cabe esperar una mayor retención en comparación a las NPs con todos los grupos carboxilo libres (Pol 25_PMAO_RGD Blanco). Tal y como se observa en la anterior figura, no aparece una diferencia apreciable entre las muestras con 10, 15 y 20 μ l de la molécula RGD. Tampoco se advierte agregación en

los pocillos de partida. Por lo tanto, se confirmó que la cantidad de RGD óptima a utilizar en estas nanopartículas de magnetita para su funcionalización es 10 μ l de RGD (0,1mg/ml), que es la utilizada para la preparación de los fluidos magnéticos que se ensayarán en los experimentos ‘in vivo’.

I.5. Bibliografía

- Agard, N. J.; Preschner, J. A.; Bertozzi, C. R., *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004): 15046–15047.
- Aghlara, H.; Rostami, R.; Maghoul, A.; SalmanOgli, A. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics* 126, no. 4 (2015): 417–420.
- Ahn, T.; Kim, J. H.; Yang, H. M.; Lee, J. W.; Kim, J. D. *J. Phys. Chem. C* 116, no. 10 (2012): 6069–6076.
- Aizpurua, J.M.; Azcune, I.; Fratila, R.M.; Balentova, E.; Sagartzazu-Aizpurua, M. Miranda, J. I. *Org. Lett.* 12 (2010): 1584–1587.
- Ambrožič, G.; Škapin, S. D.; Žigon, M.; Orel, Z. C. *Journal of Colloid and Interface Science* 346, no. 2 (2010): 317–323.
- Amstad, E.; Kim, S. H.; Weitz, D. A., *Angew. Chem.* 51, no. 50 (2012): 12499–12503.
- Araghi, S. H.; Entezari, M. H., *Applied Surface Science* 333 (2015): 68–77.
- Arriagada, F.J.; Osseo-Asare, K., *Journal of colloid and interface science* 211, no. 2 (1999): 210–220.
- Aslam, M.; Fu, L.; Li, S.; Dravid, V. P. *Journal of Colloid and Interface Science* 290, no. 2 (2005): 444–449.
- Bolley, J.; Guenin, E.; Lievre, N.; Lecouvey, M.; Soussan, M.; Lalatonne, Y.; Motte, L. *Langmuir* 29, no. 47 (2013): 14639–14647.
- Colombo, M.; Bianchi, A. *Molecules* 15 (2010): 178-197.
- Cabrera, L. I.; Somoza, Á.; Marco, J. F.; Serna, J. C.; Morales, M. P. *J. Nanopart. Res.* 14, no. 6 (2012): 873.
- Cabrera, L. I.; Somoza, Á.; Marco, J. F.; Serna, J. C.; Morales, M. P. *J. Nanopart. Res.* 14, no. 6 (2012): 873.
- Cardiel, A.; Michelle, B.; Bishop, L.; Louis, K.; Yeager, J.; Tan, Y.; Hames, R. *ACS Nano* 6, no. 1 (2012): 310–318.
- Carturan, G.; Dal Toso, R.; Boninsegna, S; Dal Monte, R. *J. Mat. Chem.* 14, no. 14 (2004): 2087.
- Castellanos-Rubio, I. *Preparation and Characterization of Pd, PdFe, Fe₃O₄; Potential Inducers of Magnetic Hyperthermia (PhD Thesis)* (University of Basque Country, Leioa, 2013).

- Castellanos-Rubio, I.; Insausti, M.; Garaio, E.; Gil de Muro, I.; Plazaola, F.; Rojo, T.; Lezama, L. *Nanoscale* 12 (2014): 7542–7552.
- Conde, J.; Ambrosone, A.; Sanz, V.; Hernandez, Y.; Marchesano, V.; Tian, F.; Child, H.; Berry, C. C.; Ibarra, M. R.; Baptista, P. V.; Tortiglione, C.; De la Fuente, J. M. *ACS Nano*, no. 9 (2012): 8316–8324.
- Díaz, D. D.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; Fokin, V.; Hawker, J. *An. Quím.* 104, no. 3 (2008): 173–180.
- Ding, H.; Zhang, Y.; Wang, S.; Xu, J.; Xu, S. C.; Li, G. *Chem. Mat.* 24 (2012): 4572–4580.
- Euliss, L. E.; Grancharov, S. G.; O'Brien, S.; Deming, T. J.; Stucky, G. D.; Murray, C. B.; Held, G. A. *Nano Lett.* 3 (2003): 1489.
- Fang, M.; Ström, V.; Olsson, R. T.; Belova, L.; Rao, K. V. *App. Phys. Lett.* 99, no. 22 (2011): 222501.
- Feldmann, C.; Metzmacher, C. *J. Mat. Chem.* 11 (2001): 2603.
- Guardia, P.; Di Corato, R.; Lartigue, L.; Wilhelm, C.; Espinosa, A.; García-Hernández, M.; Gazeau, F.; Manna, L.; Pellegrino, T. *ACS Nano* 6 (2012): 3080.
- Hakami, O.; Zhang, Y.; Banks, C. J. *Water Research* 46, no. 12 (2012): 3913–3922.
- Hernando, A.; Crespo, P.; García, M. A. *The Scientific World Journal* 5 (2005): 972–1001.
- Herranz, F.; Morales, M. P.; Roca, A. G.; Vilar, R.; Ruiz-Cabello, J. *Contrast Media and Molecular Imaging* 3, no. 6 (2008): 215–222.
- Huang, J. H.; Parab, H. J.; Liu, R. S.; Lai, T. C.; Hsiao, M. Chen, C. H.; Sheu, H. S.; Chen, J. M.; Tsai, D. P.; Hwu, Y. K. *J. Phys. Chem. C* 112, no. 40 (2008): 15684–15690.
- Huang, Q.; Shen, W.; Xu, Q.; Tan, R.; Song, W. *Materials Chemistry and Physics* 147, no. 3 (2014): 550–556.(c) Shete, P. B.; Patil, R. M. Tiwale, B. M.; Pawar, S. H. *J. Magn. Magn. Mater.* 377 (2015): 406–410.
- Huh, S.; Chen, H. T.; Wiench, J. W.; Pruski, M.; Lin, V. S. Y. *Angew. Chem.* 44, no. 12 (2005): 1826–1830.

Bibliografía

- Hyeon, T.; Su Seong, L.; Park, J.; Chung, Y.; Hyon Bin, N. *J. Am. Chem. Soc.* 123, no. 51 (2001): 12798–12801.
- Jézéquel, D.; Guenot, J.; Jouini, N.; Fiévet, F. *Journal of Materials Research* 10 (1995): 77.
- Kamata, M.; Kura, H.; Takahashi, M.; Ogawa, T.; Tanaka, T. *IEEE Transactions on Magnetics* 48 (2012): 3944.
- Khalafi-Nezhad, A.; Panahi, F., *Journal of Organometallic Chemistry* 741-742, no. 1 (2013): 7–14.
- Kikuchi, T.; Kasuya, R.; Endo, S.; Nakamura, A.; Takai, T.; Metzler-Nolte, N.; Tohji, K.; Balachandran, J. J. *Magn. Mater.* Yu, W. W.; Chang, E.; Sayes, C. M.; Drezek, R.; Colvin, V. L. *Nanotechnology* 17 (2006): 4483–4487.
- Kikuchi, T.; Kasuya, R.; Endo, S.; Nakamura, A.; Takai, T.; Metzler-Nolte, N.; Tohji, K.; Balachandran, J. *J. Magn. Mater.* 323, no. 10 (2011): 1216–1222.
- Kim, J.; Lee, J. *Advanced Powder Technology* 20, no. 1 (2009): 94–100.
- Kim, J.; Lee, J.; Lee, J. *J. Am. Chem. Soc.*, no. 128 (2006): 1–5.
- Kreuter, J. *Journal of anatomy* 189, no. 5 (1996): 503–505.
- Kulesza, P. J.; Pieta, I. S.; Rutkowska, I. A.; Wadas, A.; Marks, D.; Klak, K.; Stobinski, L.; Cox, J. A. *Electrochimica Acta* 110 (2013): 474–483.
- Kura, H.; Takahashi, M.; Ogawa, T. *J. Phys. Chem. C* 114 (2010): 5835.
- Kurihara, Y.; Takama, M.; Sekiya, T.; Yoshihara, Y.; Ooya, T.; Takeuchi, T. *Langmuir* 28 (2012): 13609–13615.
- Lacroix, L. M.; Frey Natalie, H.; Ho, D.; Sun, X.; Cheng, K.; Sun, S. *Nano Letters* 11 (2011): 1641.
- La Mer, V. K.; Dinegar, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* 72 (1950): 4847.
- Lázaro, F. J.; Villanueva, A.; Morales, M. P.; Barber, D. F. *Biomaterials* 32, no. 11 (2011): 2938–52.
- Levy, M.; Quarta, A.; Espinosa, A.; Figuerola, A.; Wilhelm, C.; García-Hernández, M.; Genovese, A.; Falqui, A.; Alloyeau, D.; Buonsanti, R.; Cozzoli, P. D.; García, M. A.; Gazeau, F.; Pellegrino, T. *Chem. Mater.* 23 (2011): 4170.

- Li, Z.; Tan, B.; Allix, M.; Cooper, A. I.; Rosseinsky, M. J. *Small* 4, no. 2 (2008): 231–239.
- Lin, H. T.; Nayak, P. K.; Wang, S. C.; Chang, S. Y.; Huang, J. L. *Journal of the European Ceramic Society* 31, no. 14 (2011): 2481–2487.
- Lu, C. W.; Hung, Y.; Hsiao, J. K.; Yao, M.; Chung, T. H.; Lin, Y. S.; Wu, S. H.; Hsu, S. C.; Liu, H. M.; Mou, C. Y.; Yang, C. S.; Huang, D. M.; Chen, Y. C. *Nano Lett.* 7, no. 1 (2007): 149–154.
- Ma, M.; Zhang, Y.; Yu, W. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 212 (2003): 219–226.
- Maity, D.; Kale, S. N.; Kaul-Ghanekar, R.; Xue, J. M.; Ding, J. *J. Magn. Mater.* 321, no. 19 (2009): 3093–3098.
- Mallakpour, S.; Sirous, F. *Progress in Organic Coatings* 85 (2015): 138–145.
- Marcelo, G.; Pérez, E.; Corrales, T.; Peinado, C. *J. Phys. Chem. C* 115, no. 51 (2011): 25247–25256.
- Meffre, A.; Mehdaoui, B.; Kelsen, V.; Fazzini, P. F.; Carrey, J.; Lachaize, S.; Respaud, M.; Chaudret, B. *Nano Lett.* 12, no. 9 (2012): 4722–4728.
- Mejías, R.; Pérez-Yagüe, S.; Gutiérrez, L.; Cabrera, L. I.; Spada, R.; Acedo, P.; Serna, J. C.; Lázaro, F. J.; Villanueva, A.; Morales, M. P.; Barber, D. F. *Biomaterials* 32, no. 11 (2011): 2938–52.
- Moros, M.; Hernández, B.; Garet, E.; Dias, J. T.; Sáez, B.; Grazú, V.; González-Fernández, A.; Alonso, C.; de la Fuente, J. M. *ACS Nano* 6 no. 2 (2012): 1565–1577.
- Moros, M.; Pelaz, B.; López-Larrubia, P.; García-Martin, M. L.; Grazú, V.; De la Fuente, J. M. *Nanoscale* 2, no. 9 (2010): 1746–55.
- Murray, C. B.; Sun, S.; Gaschler, W.; Doyle, H.; Betley, T. A.; Kagan, C. R. *IBM Journal of Research and Development* 45, no. 1 (2001): 47–56.
- Nematollahzadeh, A.; Seraj, S.; Mirzayi, B. *Chemical Engineering Journal* 277 (2015): 21–29.
- Nikles, D. E.; Chen, M. *Nano Lett.* 2, no. 3 (2002): 211–214.
- Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Balentová, E.; Azcune, I.; Ignacio, J.; Jiménez-Barbero, J.; Cañada, F. J.; Miranda, J. I. *Org. Lett.* 10, no. 11 (2008): 227–2230.

Bibliografía

- Parak, W. J.; Lin, C. J.; Sperling, R. A.; Li, J. K.; Yang, T. Y.; Li, P. Y.; Zanella, M. Chang, W. H. *Small* 4, no. 3 (2008): 334–341.
- Park, J.; Joo, J.; Soon, G. K.; Jang, Y.; Hyeon, T. *Angew. Chem.*44, no. 19 (2005): 2873–2877.
- Park, J.; Joo, J.; Soon, G.K.; Jang, Y.; Hyeon, T. *Angew. Chem.*46, no. 25 (2007): 4630–4660.
- Pelzl, J.; Meckenstock, R.; Spoddig, D.; Schreiber, F.; Pflaum, J; Frait, Z. J. *Phys. Cond. Matter* 15, no. 5 (2003): S451–S463.
- Portet, D.; Denizot, B.; Rump, E.; Lejeune, J. J.; Jallet, P. *J. Colloid. Interface. Sci.* 238 (2001): 37.
- Puntes, V. F.; Krishnan, K. M.; Alivisatos, A. P. *Science* 291(2001): 2115.
- Ramimoghadam, D.; Bagheri, S.; Bee, S.; Hamid, A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 133 (2015): 388-411.
- Sun, S.; Zeng, H. *J. Am. Chem. Soc.* 124, no. 28 (2002): 8204–8205.
- Sun, S.; Zeng, H.; Robinson, D. B.; Raoux, S.; Rice, P. M.; Wang, S. X.; Li, G. *J. Am. Chem. Soc.* 126, no. 1 (2004): 273–279.
- Taboada, E.; Rodríguez, E.; Roig, A.; Oró, J.; Roch, A.; Muller, R. N. *Langmuir* 23, no. 8 (2007): 4583–4588.
- Tamer, U.; Cetin, D.; Suludere, Z.; Boyaci, I. H.; Temiz, H. T.; Yegenoglu, H.; Daniel, P.; Dincer, I.; Elerman, Y. *Int. J. Mol. Sci.* 14, no. 3 (2013): 6223–6240.
- Tornoe, C.W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* 67 (2002): 3057–3064.
- Vashist, S. K. *Diagnostics* 2, no. 3 (2012): 23–33.
- Vsevolod, V.; Rostovtsev, L.G.; Green, V.V.; Fokin, K.; Sharpless, B. *Angew. Chem.* 41 (2002): 2596–2598.
- Watzky, M. A.; Finke, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997): 10382.
- Xie, Y.; Ye, L.; Zhang, X.; Cui, W.; Lou, J.; Nagai, T.; Hou, X. *Journal of Controlled Release* 105, no. 1–2 (2005): 106–119.
- Yang, J.; Zou, P.; Yang, L.; Cao, J.; Sun, Y.; Han, D.; Yang, S.; Wang, Z.; Chen, G.; Wang, B.; Kong, X. *Applied Surface Science* 303 (2014): 425–432.

- Yu, H.; Gibbons, P. C.; Kelton, K. F.; Buhro, W. E. *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001): 9198.
- Yu, F.; Wang, J. N.; Sheng, Z. M.; Su, L. F. *Carbon* 43, no. 14 (2005): 3018–3021.
- Zamani, F.; Hosseini, S. M.; Kianpour, S. *Solid State Sciences* 26 (2013): 139–143.
- Zeynali, H.; Akbari, H.; Arumugam, S. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 23 (2015): 235–237.
- Zhang, L.; He, R.; Gu, H.C., *Materials Research Bulletin* 41, no. 2 (2006): 260–267.
- Zhang, M.; Cushing, B. L.; O'Connor, C. J., *Nanotechnology* 19, no. 8 (2008): 085601.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN

Capítulo II. Caracterización

La caracterización estructural y morfológica de los productos sintetizados se efectuado mediante las técnicas de Difracción de Rayos X (DRX), Análisis Termogravimétrico (TGA), Espectroscopia de Infrarrojo (IR), Dispersión Dinámica de Luz (DLS), Espectroscopia de Masas-MALDI y Microscopía Electrónica de Trasmisión (TEM).

La caracterización magnética de las muestras presentadas a lo largo del capítulo se ha realizado mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Electrónica (RME) y medidas de imanación frente al campo aplicado, $M(H)$, y frente a la temperatura $M(T)$. Se ha dedicado un esfuerzo especial a la correlación entre los comportamientos observados y la forma física de las muestras, un aspecto de gran relevancia en sistemas ferromagnéticos que, en muchas ocasiones, dificulta la comparación entre los resultados obtenidos por diferentes autores. A continuación, se describirán los resultados obtenidos a partir de las diferentes medidas.

II.1. Difracción de Rayos X (DRX)

Las muestras sintetizadas se han caracterizado mediante DRX con objeto de obtener información sobre la estructura, la cristalinidad, y el tamaño de partícula. Los difractogramas de Rayos X, medidos a temperatura ambiente, se han registrado en el difractómetro Philips PW1710 del Servicio General de Investigación (SGIker) de Rayos X de la UPV/EHU en las condiciones descritas en el Anexo A.4.

En la Figura 2.1 se muestran, a modo de ejemplo, 10 difractogramas, 5 pertenecientes a muestras sintetizadas por el método de descomposición a partir de pentacarbonilo de hierro y 5 a partir de acetilacetato de hierro. Los máximos de difracción corresponden a la fase magnetita, Fe_3O_4 , FCC (G.E.: Fd-3m, PDF nº 89-0691) y se puede observar cierta variación en la anchura de los mismos entre las diferentes muestras.

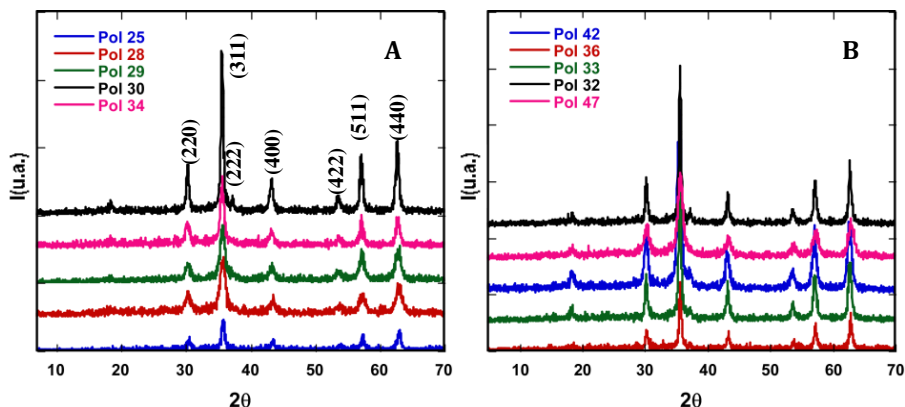


Figura 2.1. Difractogramas correspondientes a muestras sintetizadas con $Fe(CO)_5$ como precursor (A) y muestras sintetizadas con $Fe(acac)_3$ como precursor (B).

A partir de la anchura a media altura, y de la posición del máximo de difracción más intenso (311), se ha calculado el tamaño medio de partícula de las muestras obtenidas mediante la fórmula de Scherrer (2.1)¹.

$$D = \frac{K\lambda}{B_{est} \cos\theta} \quad (2.1)$$

donde K es la constante de forma ($K=1$ para partículas completamente esféricas), B_{est} es la anchura a media altura, obtenida restando la contribución instrumental a la anchura observada ($B_{est} = B_{obs} - B_{instrumental}$), λ es la longitud de onda de la radiación aplicada en la medida, en este caso $\lambda_{Cu} = (K\alpha_1 + K\alpha_2)/2 = 1,5418 \text{ \AA}$, y θ es ángulo de Bragg. Los valores de diámetro medio obtenidos para varias de las muestras representativas de las síntesis con ambos precursores se han recogido en la Tabla 2.1.

¹ Patterson, A. *Phys. Rev.* 56 (1939): 978–982.

Tabla 2.1. Parámetros obtenidos a partir de la deconvolución del máximo de difracción (311) y tamaños de partícula calculados mediante la fórmula de Scherrer.

MUESTRAS	B _{obs.} (°2θ)	B _{inst.} (°2θ)	B _{est.} (°2θ)	Pos. Bragg (°2θ)	Tamaño (nm)
Pol 25	0,56	0,12	0,44	35,84	18
Pol 28	0,95	0,12	0,78	35,78	10
Pol 29	0,86	0,12	0,74	35,73	11
Pol 30	0,55	0,12	0,63	35,69	18
Pol 32	0,41	0,12	0,29	35,69	27
Pol 33	0,46	0,12	0,34	35,67	23
Pol 34	0,67	0,12	0,57	35,73	15
Pol 36	0,45	0,12	0,35	35,74	24
Pol 42	0,75	0,12	0,63	35,60	13
Pol 47	0,93	0,12	0,81	35,74	10

Se puede observar como las muestras que se han obtenido mediante la descomposición térmica a partir de acetilacetato de hierro (III), presentan nanopartículas (NPs) de mayor tamaño que las obtenidas a partir de pentacarbonilo de hierro (0). Además, en ambos casos, el aumento de los tamaños obtenidos por medio de la fórmula de Scherrer se corresponden, en gran medida, con un aumento en el número de adiciones durante el proceso de síntesis así como con un aumento en la concentración de del precursor. Este es el caso de las muestras Pol 25, realizada en cuatro adiciones consecutivas, respecto a la muestra Pol 29 (una adición). Entre las muestras sintetizadas a partir de acetilacetato, se produce este mismo efecto en las muestras la Pol 32, Pol 33 y Pol 36 (cuatro adiciones), cuyo tamaño final resulta mucho mayor al obtenido en las muestras Pol 42 o Pol 47 (dos adiciones).

II.2. Análisis Termogravimétrico (TGA)

Con objeto de conocer la cantidad de materia orgánica presente en el producto final, de lo que parece depender en gran medida la estabilidad que las nanopartículas presentan en dispersión², se ha realizado un análisis termogravimétrico sistemático de todas las muestras preparadas. Estos análisis se han realizado en un equipo NETZSCH STA 449C, utilizando unos 10 mg de muestra sometida a un calentamiento de 10 °C/min, en atmósfera de argón, en el intervalo de 25 a 800°C.

Todas las muestras analizadas presentan un perfil de descomposición muy similar. En la Figura 2.2 se muestran a modo de ejemplo los termogramas obtenidos para cuatro muestras representativas de la síntesis con cada uno de los precursores. Las pérdidas de masa y las temperaturas de descomposición de cada muestra se recogen en la Tabla 2.2.

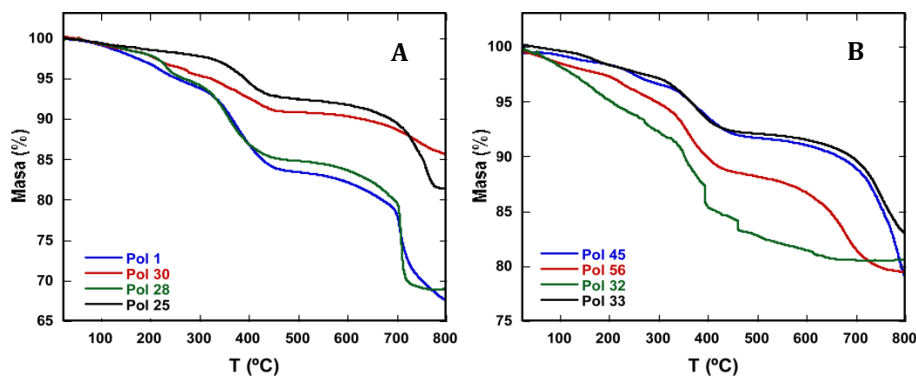


Figura 2.2. Curvas termogravimétricas correspondientes a muestras sintetizadas con $Fe(CO)_5$ como precursor (A), y a muestras sintetizadas con $Fe(acac)_3$ como precursor (B).

En torno a 100°C se observa la primera pérdida de masa, relacionada con la humedad que pudiera haberse adsorbido en cada caso, normalmente inferior al 4%. A partir de 200°C, se produce una pérdida mayor de masa asociada a la descomposición de los ligandos orgánicos, cuyas interacciones con la superficie de la NP son más fuertes. A continuación, a temperaturas superiores a 400°C, se observa un “plateau” que corresponde a la formación

² Ghosh, S.; Jiang W.; McClements J.D.; Xing, B. *Langmuir*. 27 (2011): 8036–8043.

Caracterización

de carbonatos de hierro estables, observándose la descomposición de los mismos a partir de 600°C (Tabla 2.2).

La primera etapa de descomposición, relacionada con la pérdida del disolvente adsorbido, parece ser independiente del precursor empleado. El hecho de que quede retenido en la superficie de las nanopartículas alrededor de un 4% de disolvente, procedente en parte también de las limpiezas efectuadas con tolueno y etanol, se debe a las interacciones de estas moléculas con la parte alifática de los ligandos empleados (ácido oleico y oleilamina). Sin embargo, la interacción es débil, y es por eso que se descomponen a bajas temperaturas. Por otra parte, se observa que, de forma general, con el aumento del tamaño de partícula, disminuye tanto la cantidad de disolvente retenido como la de los ligandos, ácido oleico y oleilamina, debido a la disminución del área superficial del material. La disminución de la relación entre los átomos de hierro superficiales y el volumen total de las partículas reduce lógicamente las posibilidades de funcionalización. Así por ejemplo, la muestra Pol 1, sintetizada en una sola adición a partir de $\text{Fe}(\text{CO})_5$, y empleando un fuerte exceso de ligando, presenta una elevada pérdida de masa (32,6%) en consonancia con el pequeño diámetro de sus nanopartículas (6 nm).

Tabla 2.2. Pérdidas de masa y temperaturas de descomposición de las muestras presentadas en este apartado.

MUESTRAS	T ₁ (K)	T ₂ (K)	T ₃ (K)	Δm ₁ (%)	Δm ₂ (%)	Δm ₃ (%)	Δm _{total} (%)
Pol 1	111,5	195,5	481,5	3,1	13,4	16,2	32,7
Pol 25	100,2	223,7	503,2	1,6	5,9	11,0	18,5
Pol 28	124,2	210,7	509,7	1,1	15,2	15,2	31,5
Pol 30	99,6	197,7	533,5	1,8	9,4	3,0	14,2
Pol 32	98,4	190,2	419,0	4,2	10,9	4,5	19,6
Pol 33	111,1	199,4	478,0	1,8	6,1	9,1	17,0
Pol 45	102,5	184,3	509,4	1,5	6,8	11,9	20,2
Pol 56	104,6	188,4	477,1	2,4	9,2	8,7	20,3
Pol 25_PMAO	104,5	199,8	479,3	6,0	33,9	22,3	62,2
Pol 25_TESPMA	98,1	219,3	524,7	6,3	6,1	5,4	17,8
Pol 25_TEOS	108,8	225,8	486,7	5,3	6,4	5,63	17,3
Pol 25_DMSA	104,5	202,2	410,0	6,1	9,03	4,7	19,8

Por otra parte, en la Figura 2.3 se representan las curvas termogravimétricas de la muestra Pol 25 con los diferentes recubrimientos mediante los que ha sido posible su transferencia a fase acuosa según métodos descritos en el capítulo previo. En la Tabla 2.2 se han incluido también las pérdidas de masa y temperaturas de descomposición de estos materiales.

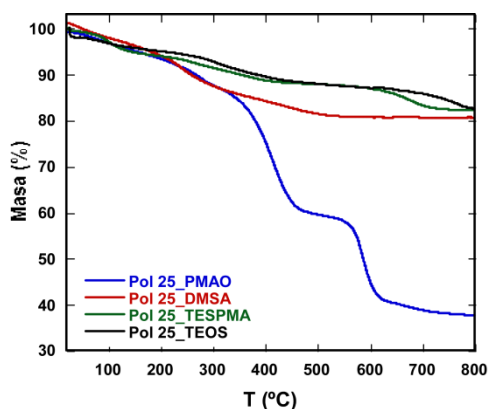


Figura 2.3. Curvas termogravimétricas correspondientes a la muestra Pol 25 en fase acuosa con los diferentes recubrimientos utilizados.

En todas las muestras se observa un aumento en la pérdida de disolvente (5-6%) debido a que se encuentran en medio acuoso y se producen

Caracterización

interacciones más fuertes con este disolvente. En el caso de la muestra recubierta con el polímero anfifílico PMAO, la pérdida de masa alcanza valores de casi el 60%, lo cual no es sorprendente si se considera el elevado peso molecular, entre 30000-50000 g/mol, de este polímero. La elevada cantidad de cadenas alifáticas que se entrelazan con las cadenas de ácido oleico favorece el recubrimiento, y también se traduce en una mayor estabilidad de los materiales, como se deduce de las mayores temperaturas de descomposición que presenta este compuesto en comparación con las de la muestra sin recubrir o recubierta con otros ligandos.

La situación es más difícil de evaluar en el caso de los ligandos DMSA, TESPMA y TEOS que, en principio, deben sustituir a las moléculas de ácido oleico. En el caso de la sílice (TEOS) se observa una pérdida de masa total de un 13,2%, lo que parece indicar que un porcentaje significativo de las moléculas de ácido oleico no han sido sustituidas. No obstante, hay que tener en cuenta que una parte importante de la pérdida de masa se da a temperaturas muy próximas a 800°C y podría ser debida a procesos de condensación inorgánicos.

Con los ligandos DMSA y TESPMA se observan pérdidas de masa del 16,5 y 15,6%, razonables para el tamaño de partícula si se tiene en cuenta la diferencia en la masa orgánica de los ligandos y el número de grupos funcionales. Además, en el termograma de la muestra Pol 25_TESPMA se observa también una pérdida de masa a temperaturas muy elevadas que podría estar relacionada con su parte silíceo.

II.3. Espectroscopia Infrarrojo (F-TIR)

Las muestras sintetizadas se analizaron por espectroscopia de infrarrojo con el objeto de confirmar que los ligandos permanecen unidos a la superficie de las NPs mediante sus bandas correspondientes. Para ello, se compararon los espectros tomados para la magnetita obtenida con oleico en superficie y con los diferentes recubrimientos utilizados.

Los espectros de infrarrojo se registraron con un espectrómetro FTIR-8400S Shimadzu en un intervalo de 400-4000 cm^{-1} . Las muestras se prepararon en forma de pastillas con KBr para espectroscopia como se describe en el Anexo A.2. En todos los casos se eliminó la contribución del KBr para eliminar en lo posible restos de humedad, no así la banda de absorción que aparece en todos los espectros en torno a los 2300cm^{-1} , debida al CO_2 ambiental, ya que en este caso la señal es muy variable entre las diferentes medidas.

Para mostrar los resultados obtenidos se han elegido los espectros IR de la muestra Pol 32, que presenta un alto contenido de materia orgánica y de la muestra Pol 25, que posteriormente fue transferida a fase acuoso (Figura 2.4).

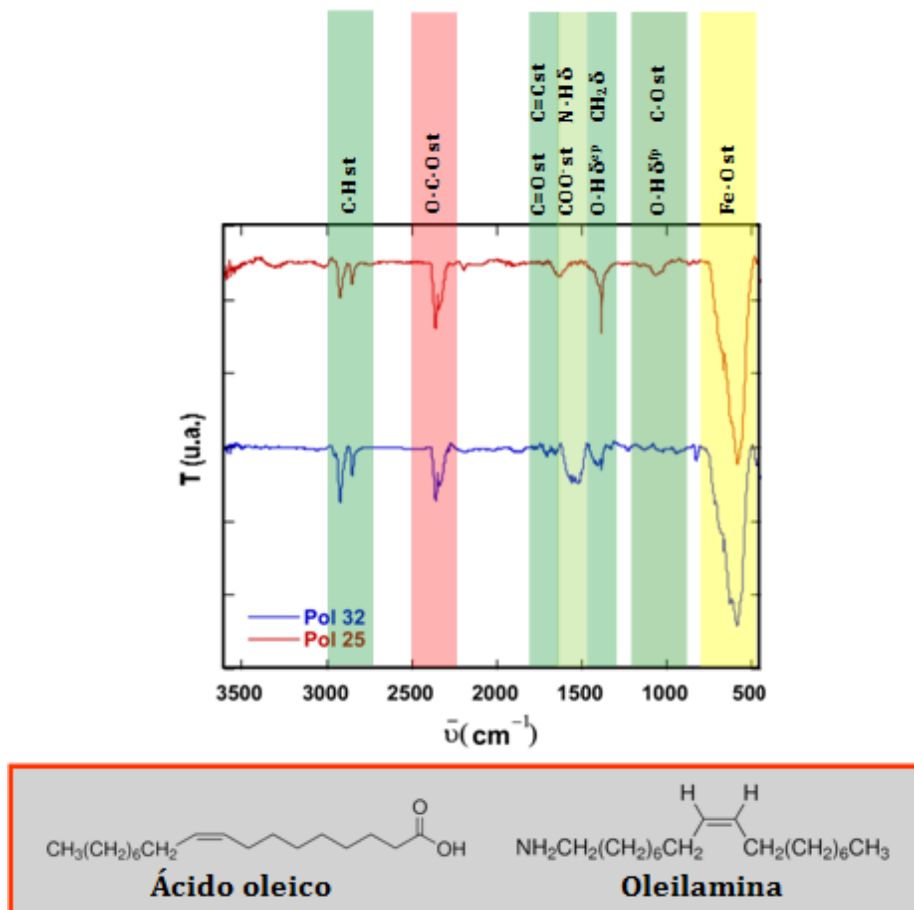


Figura 2.4. Espectros de infrarrojo de las muestras Pol 25 y Pol 32 junto con la fórmula química de los ligandos utilizados en su síntesis.

En cuanto a los modos vibracionales de los ligandos, en los dos casos presentados aparecen las bandas características de las vibraciones de tensión (st) asimétrica y simétrica del enlace C-H de los grupos metileno a 2935 y 2850 cm^{-1} . La vibración de tensión del enlace C=O, que aparece a 1715 cm^{-1} , es característica de los ácidos carboxílicos y se observa en ambas muestras³. La absorción a 1050 cm^{-1} proveniente de la tensión del enlace C-O, evidencia que el ácido oleico es quimisorbido en las nanopartículas de Fe_3O_4 como carboxilato. Además, los picos a 1380 y 1600 cm^{-1} se asignan al modo de enlace bidentado del ácido oleico ($-\text{COO}-\text{Fe}$). En la muestra Pol 25 la señal a

³ Zhang, L.; He, R.; Gu, H. C., *App. Surf. Sci.* 253, no. 5 (2006): 2611–2617.

1380 cm^{-1} presenta una intensidad mucho mayor en relación a la señal presente a 1600 cm^{-1} . Este fenómeno puede ser debido a la presencia de humedad mal corregida, por lo cual, la vibración de flexión (δ) correspondiente al enlace O-H estaría contribuyendo en gran medida a dicha señal. Todos estos resultados confirman la presencia del ácido oleico adsorbido en la superficie por los grupos carboxilatos.

Por otro lado, la banda emplazada a 615 cm^{-1} es la absorción característica de la vibración de tensión del enlace Fe-O de la magnetita⁴. Este modo vibracional puede deberse tanto al enlace Fe-O de la propia red de magnetita como a una fuerte unión entre el grupo carboxilato de los ligandos y átomos de hierro superficiales⁵. La distinción del origen de las bandas en torno a 610. A números de onda menores se puede identificar otra señal que, sin embargo, se encuentra dentro de los límites de detección del instrumento y, por lo tanto no se estudiarán.

En la Tabla 2.3 se recogen las bandas más significativas encontradas en los espectros de las muestras sintetizadas.

Tabla 2.3. Principales bandas vibracionales de tensión (cm^{-1}) de las diferentes muestras.

Muestra	Bandas vibracionales de tensión (cm^{-1})									
	O-H	C-H	S-H	C=O	C-O	COO-	Si-O	Si-OH	Si-O-Si	Fe-O
<i>Pol32</i>	-	2935/ 2838	-	1714	1045	1556/ 1386	-	-	-	590
<i>Pol25</i>	3320	2926/ 2856	-	1718	1062	1559/ 1387	-	-	-	581
<i>Pol25_PMAO</i>	-	-	-	1722	1220	1559	-	-	-	-
<i>Pol25_DMSA</i>	-	2932/ 2854	253 4	-	-	1661/ 1560	-	-	-	581
<i>Pol25_TEOS</i>	346/ 1640	2924	-	1713	1636	1557	-	948	117/ 1080	598
<i>Pol25_TESPMA</i>	-	2913	-	1713	1634	1557	1075	-	-	590

⁴ Qu, H.; Caruntu, D.; Liu, H.; O'Connor, C. J. *Langmuir* 27, no. 6 (2011): 2271-2778.

⁵ Ma, M.; Zhang, Y.; Yu, W. *Colloids and Surfaces A* 212 (2003): 219-226.

Una vez que las muestras se transfirieron a medio acuoso se realizaron las medidas de la muestra Pol 25 con los diferentes recubrimientos utilizados para su estudio y comparación (Figura 2.5). Es importante recordar que estos experimentos se realizaron a valores de pH en los que las partículas de magnetita presentan una carga negativa superficial.

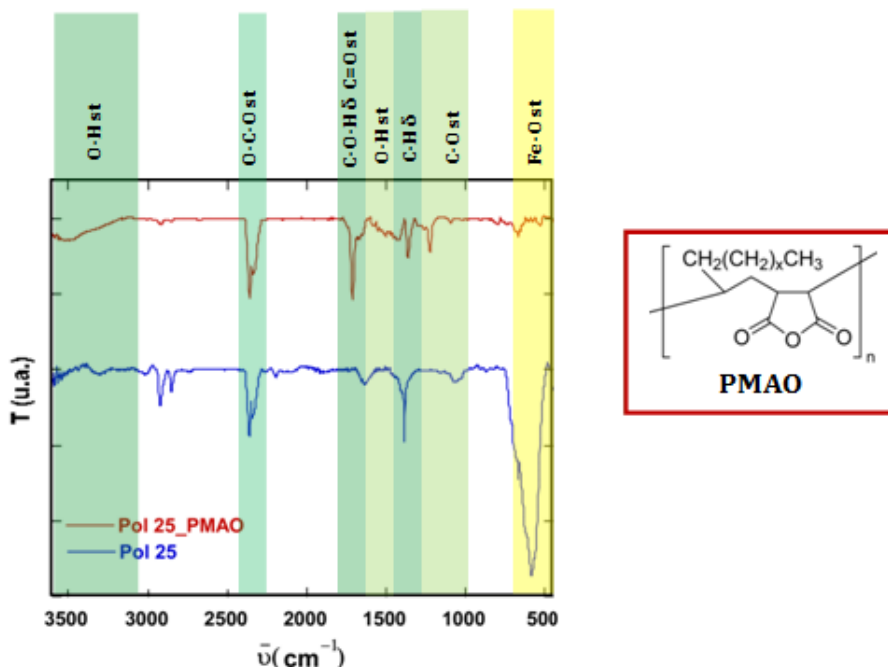


Figura 2.5. A. Espectros de infrarrojo de las muestras Pol 25 y Pol 25_PMAO junto con la fórmula química del polímero PMAO empleado en su recubrimiento.

En el espectro de la muestra Pol 25, el aspecto más sobresaliente es la presencia de la banda correspondiente al grupo carboxilato adsorbido en la superficie de las NPs a 1050 cm^{-1} . Tras recubrir con PMAO, se observan las absorciones correspondientes a los modos de vibración de tensión de los enlaces C-O y C=O a 1220 cm^{-1} y 1720 cm^{-1} , respectivamente^{4a}. El pico a 1720 cm^{-1} se atribuye a los grupos carboxilo en PMAO resultantes de la apertura de los anillos del PMAO tras la hidrólisis. Puesto que la banda a 615 cm^{-1} característica de la vibración de tensión del enlace Fe-O se vuelve inapreciable, este hecho confirma el recubrimiento eficaz de las NPs con el

PMAO, desapareciendo todas las interacciones entre el metal y los grupos carboxilatos.

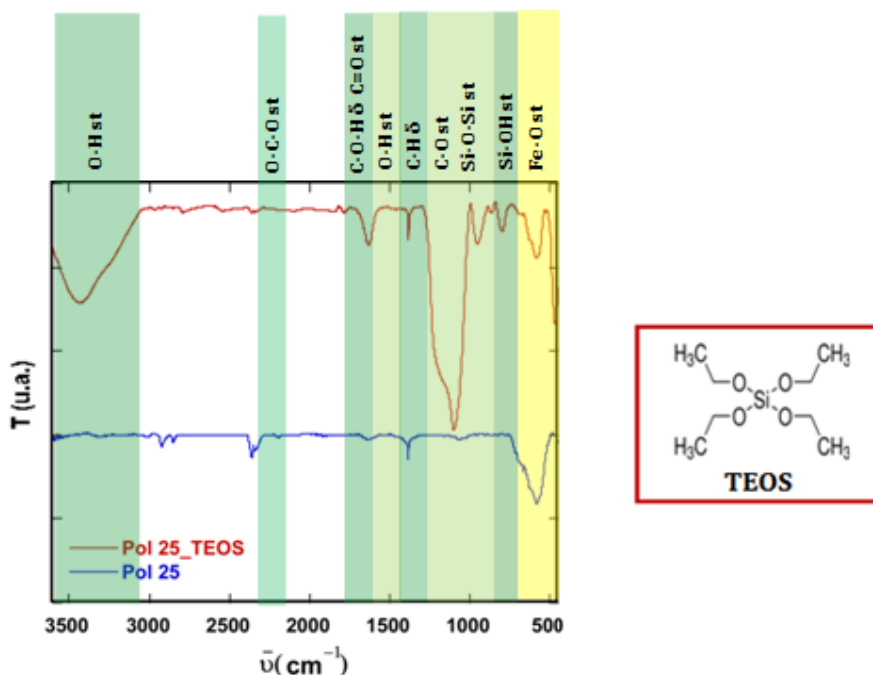


Figura 2.5. B. Espectros de infrarrojo de las muestras Pol 25 y Pol 25_TEOS junto con la fórmula química del TEOS empleado en su recubrimiento.

La espectroscopia FT-IR también contribuyó a identificar la sílice como encapsulante de las nanopartículas de magnetita. Los picos a 3463 y 1636 cm^{-1} que se atribuyen a los modos de vibración de tensión del agua adsorbida y de los grupos -OH estructurales unidos a la sílice así como la tensión del enlace Si-OH a 948 cm^{-1} corroboran la presencia de la sílice. La posición de la primera banda indica que los -OH se encuentran asociados entre sí por enlaces de hidrógeno, bien sea entre -OH intramoleculares (por ciclación de la cadena) o intermoleculares. Por otro lado, las dos bandas situadas a 1170 y 1080 cm^{-1} se deben a la vibración de tensión asimétrica y tensión simétrica del Si-O-Si, respectivamente. A 586 cm^{-1} se produce la absorción debida a la tensión del enlace Fe-O-Fe.

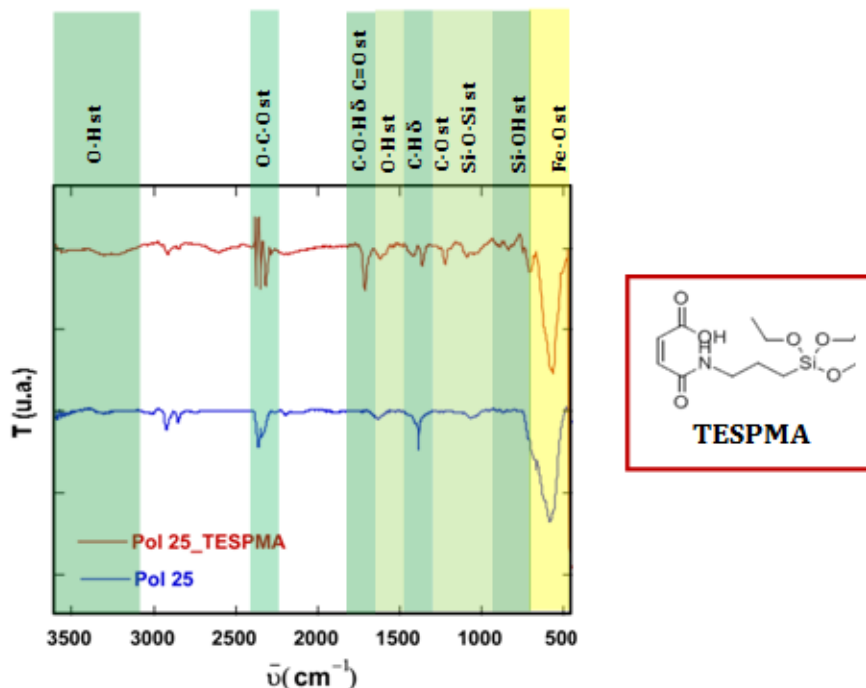


Figura 2.5. C. Espectros de infrarrojo de las muestras Pol 25_TESPMA junto con la fórmula química del ligando TESPMA empleado en su recubrimiento.

La silanización de la superficie de nanopartículas Fe_3O_4 con TESPMA también se identificó con FT-IR. El espectro Pol 25_TESPMA muestra picos de absorción alrededor de 2913 y 1415 cm^{-1} . Estos picos se asignan a la vibración de tensión y flexión de la cadena de alquilo, respectivamente. El pico a 1075 cm^{-1} se asigna a la vibración de tensión del enlace Si-O en la superficie de nanopartículas Fe_3O_4 . La falta de una fuerte banda de alrededor de 3300 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión de O-H vinculado al ácido carboxílico, indica que el ligando se une también a la superficie de la nanopartícula a través de este grupo funcional.

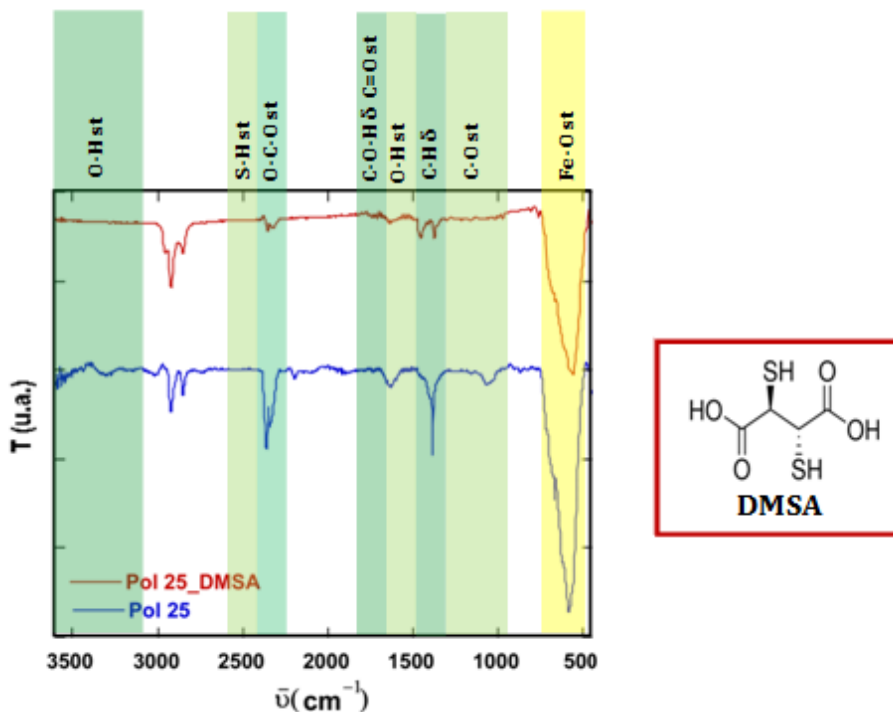


Figura 2.5. D. Espectros de infrarrojo de las muestras Pol 25 y Pol 25_DMSA junto con la fórmula química del ligando DMSA empleado en su recubrimiento.

Para la muestra de Pol 25_DMSA, el espectro se compone de intensas bandas asignadas a la vibración del enlace (Fe-O) en la región de 550- 600 cm^{-1} . Se produce también la aparición de una banda de muy baja intensidad a 2535 cm^{-1} que se atribuye a la tensión del enlace S-H del tiol. Por otro lado, dos bandas anchas aparecen a 1660 and 1560 cm^{-1} derivadas de la tensión simétrica y asimétrica del grupo carboxilato (COO^-) del DMSA⁶. Todo ello confirma la unión del DMSA en la superficie de las nanopartículas de Fe_3O_4 . Sin embargo, la presencia a baja intensidad de las bandas correspondientes al metileno a 2932 y 2854 cm^{-1} indica que han permanecido trazas del ácido oleico en la superficie de la nanopartícula después de su modificación. Además, una posible razón de la falta de evidencia del grupo tiol es que la mayoría de estos grupos han podido ser oxidados a grupos disulfuros en presencia de aire, los cuales poseen menor absorción en el análisis IR.

⁶ Chen, Z. P.; Zhang, Y.; Zhang, S.; Xia, J. G.; Liu, J. W.; Xu, K.; Gu, N. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 316, no. 1-3 (2008): 210-216.

II.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las micrografías de las muestras se han obtenido en las condiciones descritas y detalladas en el Anexo A.5. La preparación de las muestras se realizó añadiendo varias gotas de las distintas dispersiones coloidales sobre unas rejillas de cobre con recubrimiento de carbono. En el caso de las muestras hidrofóbicas, el dispersante ha sido tolueno y en el de las muestras hidrofílicas, el disolvente utilizado ha sido agua destilada.

Por un lado, se han registrado micrografías de las muestras sintetizadas con el fin de estudiar el tamaño, la morfología, la cristalinidad y comprobar el estado de agregación en el que se encuentran. Por otro lado, se han obtenido también los patrones de difracción de diferentes muestras, poniendo de manifiesto la cristalinidad de las partículas y la presencia única de Fe_3O_4 en las mismas (Anexo C.2). Se comprobará la importancia de los parámetros de síntesis tales como el grado de dilución del precursor y la concentración de ligandos ha resultado ser de gran relevancia en las características del producto final.

Es preciso indicar que, para la obtención de partículas monodispersas y estables, se requiere de la utilización del 1,2-hexadecanodiol en exceso por su efecto surfactante, dicho exceso no debe sobrepasar un límite, ya que, de lo contrario, la red de Fe_3O_4 puede disolverse debido al carácter reductor del diol.

En la Figura 2.6 se puede observar la enorme influencia de la concentración de reactivos empleados y el tiempo de reflujo. Se trata de dos muestras preparadas a partir de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ mediante una única adición pero aumentando de 1mmol (Pol 1) a 10 mmol (Pol 5) la cantidad de precursor, de 1 mmol (Pol 1) a 15 mmol (Pol 5) la cantidad de oleico y de 6 mmol (Pol 1) a 15 mmol (Pol 5) la cantidad de oleilamina utilizada durante la síntesis. Además, en el caso de la muestra Pol 5 se aumentó 10 veces el tiempo de reflujo para favorecer el crecimiento de las NPs (de 20 a 120 min.).

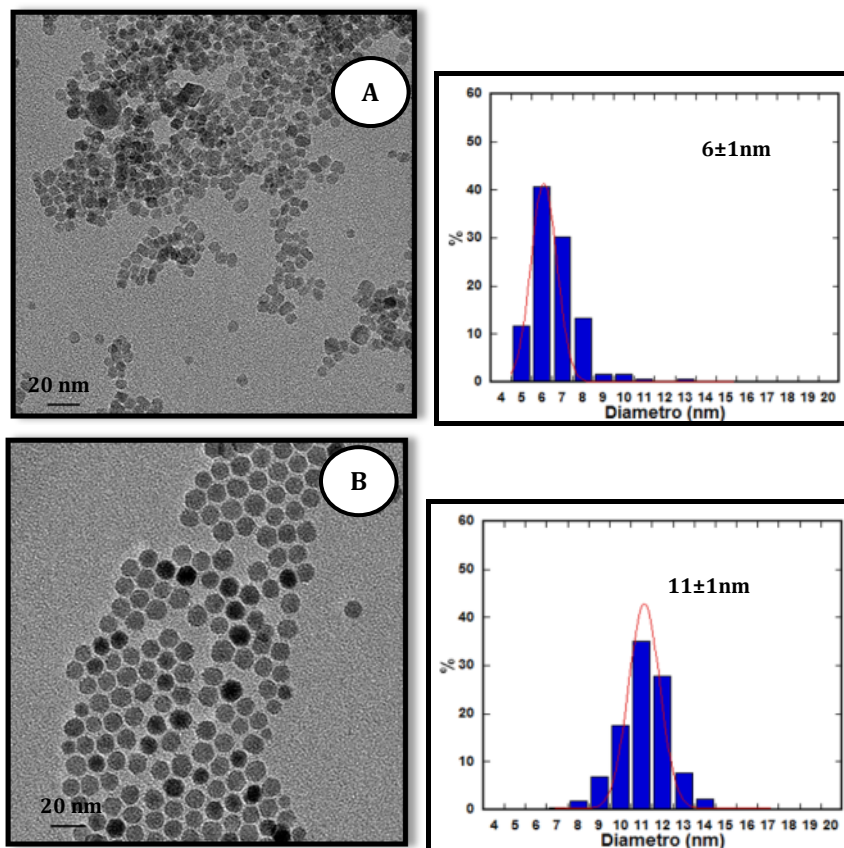


Figura 2.6. Micrografías de las muestras Pol 1 (A) y Pol 5 (B) con sus correspondientes distribuciones de tamaños.

En estas imágenes queda patente un considerable aumento de tamaño, de 6 ± 1 nm a 11 ± 1 nm, entre las muestras Pol 1 y Pol 5, respectivamente. Se ha obtenido este crecimiento gracias tanto al aumento en la concentración de reactivos como a un mayor tiempo de reflujó, durante el cual, se produce el crecimiento de las NPs. Además, la relación de surfactante respecto al resto de reactivos disminuye en el caso de la muestra Pol 5. Por ello, y pese a que los ligandos utilizados median el crecimiento y evitan la aglomeración de las NPs, se favorece su crecimiento sin ocasionar un aumento en la dispersión de tamaños.

En la Figura 2.7 se presentan algunas de las micrografías obtenidas con la correspondiente distribución de tamaños para las muestras sintetizadas a partir de pentacarbonilo de hierro, realizadas en una única adición (Pol19 y

Caracterización

Pol 29). En estos casos, la cantidad del surfactante/reductor (hexadecanodiol) respecto a las anteriores muestras fue reducida un 25% (de 20 a 5 mmol) y, por otro lado, se realizó un incremento de la concentración de los demás reactivos (precursor y ligandos) en la última muestra (Pol 29), manteniendo los tiempos de las etapas de nucleación y crecimiento de la muestra Pol 5 (120 min.).

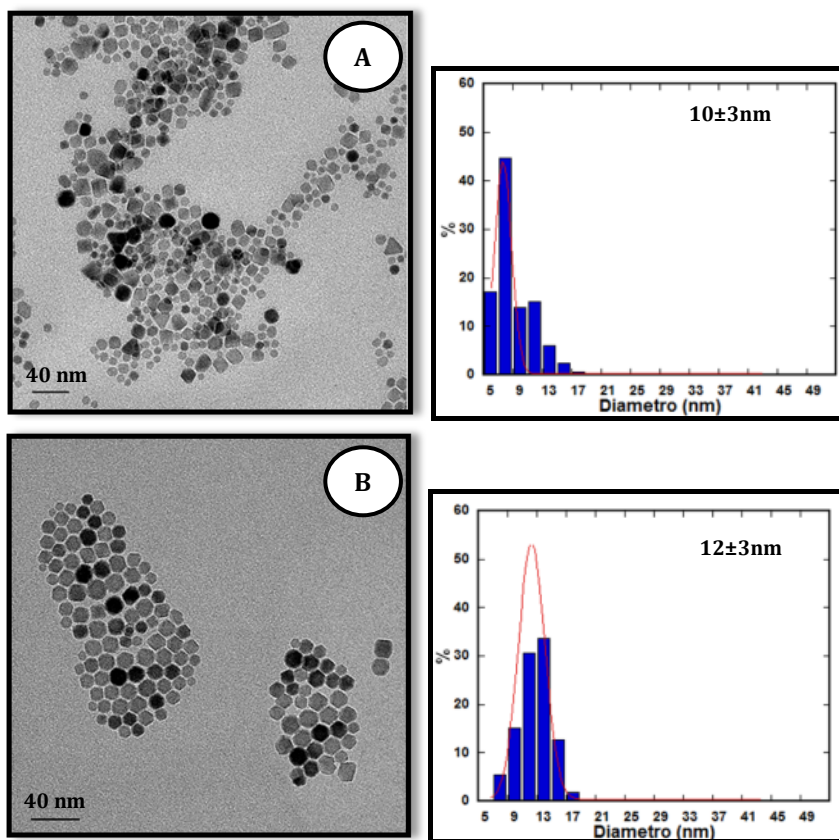


Figura 2.7. Micrografías de las muestras Pol 19 (A) y Pol 29 (B) con sus correspondientes distribuciones de tamaños.

Para las muestras Pol 19 y Pol 29 se pueden apreciar dos efectos en comparación con las muestras anteriormente descritas. En el primer caso, la menor cantidad de surfactante provoca un pequeño ensanchamiento en la distribución de tamaños, manteniendo un tamaño (10 ± 3 nm) similar a la muestra Pol 5 (11 ± 1 nm). La pequeña reducción que parece observarse podría deberse tanto a los errores experimentales durante el proceso sintético como a

las limitaciones en la representatividad de las medidas de TEM. La muestra Pol 29, presenta tamaño ligeramente superior (12 ± 3 nm) sin que varíe la dispersión de tamaños. Además, se puede observar como el aumento de concentración promueve una morfología octaédrica en una disposición tipo “panal de abeja”.

Dado que realizando la síntesis en una única adición, resulta complicada la obtención de nanopartículas de magnetita de tamaño lo suficientemente grande para ser adecuado para tratamientos de hipertermia magnética, se procedió a la realización de adiciones sucesivas para poder alcanzar el tamaño necesario. En la Figura 2.8 se presentan algunas de las micrografías obtenidas con su correspondiente distribución de tamaños para muestras sintetizadas a partir de pentacarbonilo de hierro, realizadas mediante cuatro adiciones y con diferentes concentraciones de reactivos (Pol 25, Pol 28 y Pol 30). En los tres casos se mantuvo constante tanto la cantidad de hexadecanodiol (5 mmol) como el tiempo de reflujo (120 min).

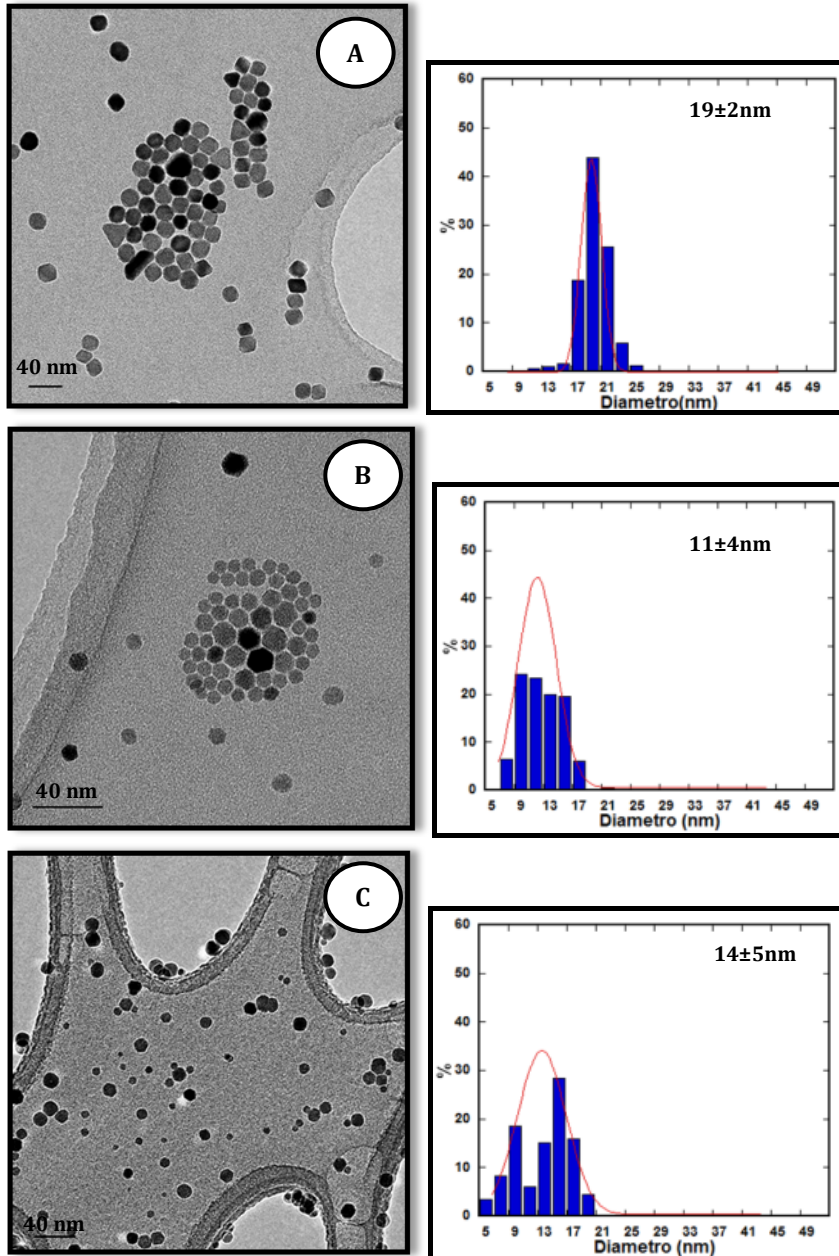


Figura 2.8. Micrografías de las muestras Pol 25 (A), Pol 28 (B) y Pol 30 (C) con sus correspondientes distribuciones de tamaños.

La muestra Pol 25 presenta un tamaño de 19 nm con una distribución de tamaños muy estrecha. Con el fin de reducir la dispersión de tamaños se procedió a reducir la cantidad de precursor y ácido oleico, manteniendo las

proporciones de oleilamina y surfactante invariables (Pol 28). Sin embargo, estas modificaciones produjeron una disminución considerable de tamaños (11 nm) y un incremento importante de la polidispersidad (± 4). Este resultado confirma, tanto la influencia de la concentración de ácido oleico en el crecimiento de las NPs, como que pequeñas variaciones en la cantidad de precursor empleada, $\text{Fe}(\text{CO})_5$ en este caso, pueden ser suficientes para limitar dicho crecimiento. Finalmente, con el objeto de alcanzar un tamaño de partícula mayor al presentado por la muestra Pol 25 se incrementó tanto la concentración del precursor como la del ácido oleico en cada adición. Pero el resultado, Pol 30, tampoco fue satisfactorio. Nuevamente se reduce el diámetro medio, 14 nm, y se incrementa la dispersión de tamaños, ± 5 nm. Es decir, que el exceso de concentración de ligando también supone un impedimento para el crecimiento de las NPs, mientras que el aumento en la cantidad del precursor supone una mayor tendencia a la aglomeración que no es compensada por el aumento en la concentración de los ligandos o del surfactante.

Por otro lado, y como se comentó en el capítulo anterior, con el objetivo de obtener mayores tamaños se recurrió al $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ante la imposibilidad de concentrar aún más el $\text{Fe}(\text{CO})_5$ en el montaje experimental. En la Figura 2.9 se han presentado algunas de las micrografías obtenidas junto con la correspondiente distribución de tamaños, para las nanopartículas logradas a partir de $\text{Fe}(\text{acac})_3$. Se comenzó realizando la síntesis en las mismas condiciones que la muestra Pol 25, es decir, mediante cuatro adiciones consecutivas (Pol 32) pero con 90 min. de reflujo. La reducción del tiempo de reflujo se produjo como punto de partida para optimizar el tiempo total de la síntesis. Posteriormente, se incrementaron de las concentraciones de ácido oleico para conseguir un mayor control de la etapa de crecimiento (Pol 33).

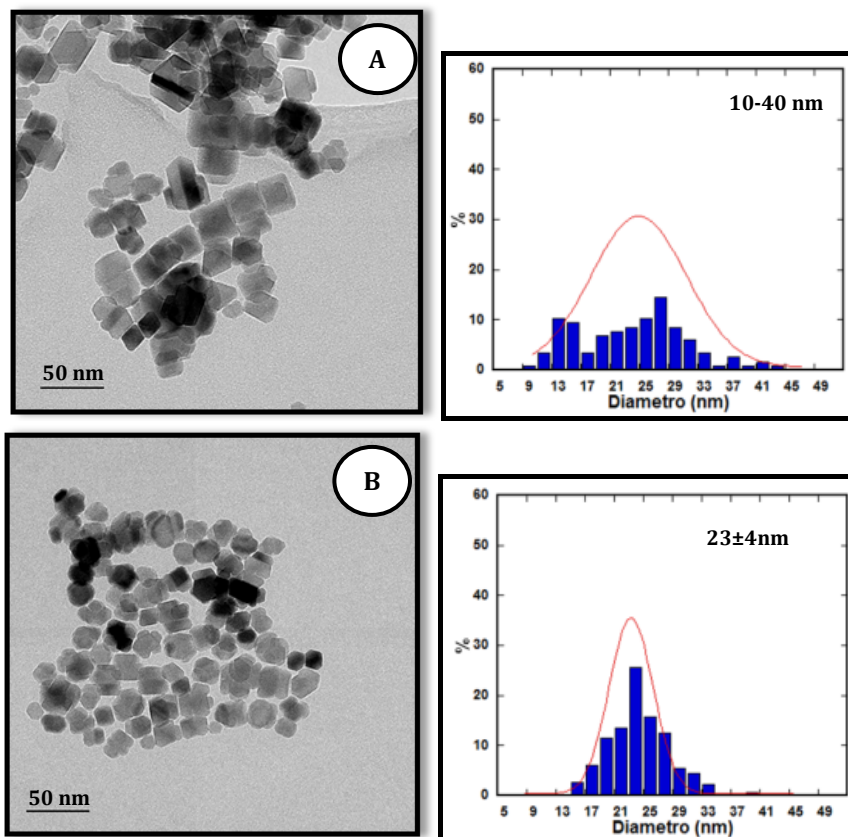


Figura 2.9. Micrografías de las muestras Pol 32 (A) y Pol 33 (B) con sus correspondientes distribuciones de tamaños.

Como era de esperar, se han obtenido tamaños elevados, mayores en el caso del Pol 32 aunque con una gran dispersión (10-40 nm), debido al menor efecto surfactante del ácido oleico. Por esta razón, la muestra Pol 33 presenta un tamaño más definido (23 ± 4 nm). A pesar de que se obtuvieron NPs de elevado tamaño, cabe señalar el gran intervalo de tamaños en el que se encuentran.

Teniendo en cuenta las amplias distribuciones de tamaños obtenidas, se procedió a reducir el número de adiciones a una para comprobar el efecto de estas sobre tales distribuciones. Además, con el fin de evitar las agregaciones, se redujo la cantidad de precursor empleada, añadiendo en cada adición una cantidad fija de surfactante / reductor (hexadecanodiol) (Pol 47, Figura 2.10).

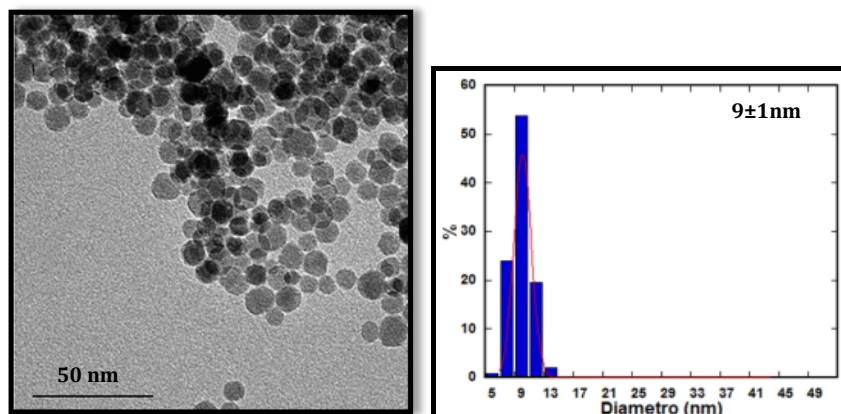


Figura 2.10. Micrografía de la muestra Pol 47 con su correspondiente distribución de tamaño.

De esta manera, se pudo conseguir efectivamente una reducción importante de la polidispersidad (9 ± 1 nm), pero la menor concentración de precursor conlleva un menor contacto entre el precursor y las NPs iniciales y, por lo tanto, un menor crecimiento final de las NPs.

Finalmente, partiendo de la síntesis de la muestra Pol 33 y, llegando a un compromiso entre el número de adiciones y las concentraciones de reactivos utilizadas, se llevaron a cabo dos síntesis más con tres adiciones sucesivas (Figura 2.11). La primera de ellas se realizó aumentando el surfactante / reductor en cada adición pero manteniendo el tiempo de reflujó en 90 min. (Pol 45). En el segundo caso se incrementaron todos los parámetros excepto el tiempo de síntesis (Pol 56).

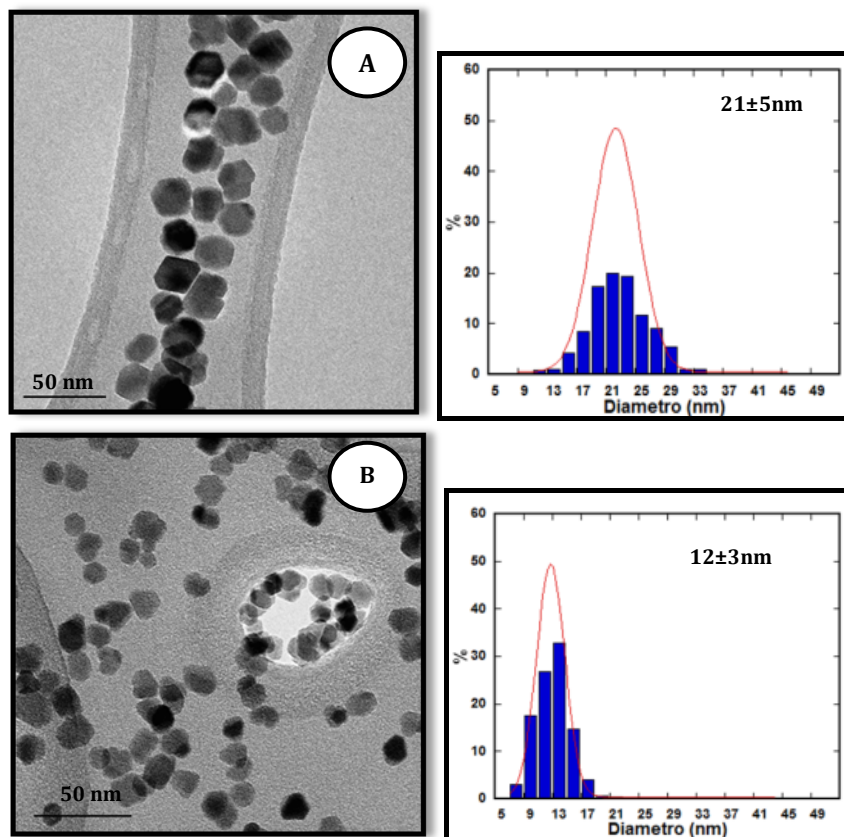


Figura 2.11. Micrografías de las muestras Pol 45 (A) y Pol 56 (B) con sus correspondientes distribuciones de tamaños.

Como se puede observar en las anteriores micrografías, se han obtenido tamaños de 21 ± 5 nm y 12 ± 3 nm para las muestras Pol 45 y Pol 56, respectivamente. Cabe destacar que, aunque en la muestra Pol 56 la concentración de precursor es algo superior, la mayor concentración de los ligandos y del surfactante/ reductor compensan dicho efecto, impidiendo el contacto durante el proceso de crecimiento y, además, mejorando en cierta medida la distribución de tamaños.

Queda patente que el número de adiciones y la variación de diferentes parámetros críticos en la síntesis como la concentración de ligandos (Pol 19, Pol 32 y Pol 33), de precursor (Pol 5, Pol 29, Pol 30, Pol 45 y Pol 47) o de surfactante (Pol 56), son factores cruciales para la optimización de la morfología y estabilidad del sistema.

Las distribuciones de tamaños correspondientes a todas las muestras sintetizadas, tanto a partir de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ como a partir de $\text{Fe}(\text{acac})_3$, se describen mediante una función Gaussiana. No obstante, la muestra Pol 30 presenta una bimodalidad en dicha distribución debido, seguramente, a que un aumento de precursor en las distintas adiciones ha dado lugar a nuevos núcleos de menor tamaño. Otro caso a comentar es el de la muestra Pol 32 en el que, dado el amplio intervalo de diámetros medidos, no fue posible ajustar la distribución observada a un perfil gaussiano.

En lo que respecta a la morfología de las partículas, se puede decir que las muestras sintetizadas presentan en general morfologías de hábito prismático (pudiendo ser cúbico o cuboctaédrico), con alguna excepción, como las muestras Pol 30 o la Pol 47, que muestran partículas menos facetadas, es decir, más esféricas⁷. En los casos de las muestras Pol 19 y Pol 25 se puede observar también la presencia de una pequeña proporción de partículas cilíndricas y triangulares⁸.

Los tamaños de partícula determinados a partir de este estudio de microscopía electrónica de transmisión, muestran en general un buen acuerdo con los determinados, mediante la fórmula de Scherrer, a partir de los difractogramas de rayos X, lo que sugiere que las nanopartículas de este grupo son monocristalinas. Además, la homogeneidad de las partículas facilita el autoensamblaje de las mismas observándose en algunos casos un empaquetamiento hexagonal. En la Tabla 2.3 se han recogido los tamaños medios (o el intervalo de tamaños) determinados a partir del análisis por TEM, los tamaños deducidos por DRX y DLS, y el contenido en materia orgánica de las muestras más representativas analizadas.

Se ha podido constatar también que a partir de cierto tamaño, unos 20 nm, es inevitable cierto grado de aglomeración debido, probablemente, a que el recubrimiento es limitado y a que las interacciones dipolares entre partículas comienzan a hacerse relevantes. Se puede observar que, utilizando

⁷ Guardia, P.; Di Corato, R.; Lartigue, L.; Wilhelm, C.; Espinosa, A.; Garcia, M.; Gazeau, F.; Manna, L.; Pellegrino, T. *ACS Nano* 6, no. 4 (2012): 3080–3091.

⁸ (a) Lenart, V. M.; Gómez, S. L.; Calatayud, M. P.; Goya, G. R. *Cond. Mat.* (2014)1402.1134.
(b) Kovalenko, M. V.; Bodnarchuk, M. I.; Lechner, R. T.; Hesser, G.; Schäffler, F.; Heiss, W. *JACS* 129, no. 20 (2007): 6352-6353.

Caracterización

las mismas relaciones de ligandos y hexadecanodiol respecto al precursor, se produce una agregación final mayor al utilizar como precursor el acetilacetato de hierro que al utilizar el pentacarbonilo. Esto se debe a que, en el primer caso, las semillas formadas resultan de mucho mayor tamaño y, consecuentemente, en las siguientes adiciones el efecto surfactante no resulta tan efectivo.

Tabla 2.4. *Tamaños medios (o intervalo de tamaños) observado en TEM, DLS y porcentaje de materia orgánica para distintas muestras presentadas a partir de Fe(CO)₅ y Fe(acac)₃. También se muestra el diámetro medio obtenido por DRX en diferentes muestras.*

MUESTRA Fe(CO) ₅	D _{TEM} (nm) {D _{DRX} (nm)}	D _{DLS} (nm)	%M.O.	MUESTRA Fe(acac) ₃	D _{TEM} (nm) {D _{DRX} (nm)}	D _{DLS} (nm)	%M.O.
Pol 1	6±1		32,6	Pol 32	10-40 {27}	688,4±0,7	19,0
Pol 5	11±1		23,3	Pol 33	23±4 {23}	187,0±0,5	17,1
Pol 9	5±1		25,2	Pol 36	12-40{24}		6,1
Pol 11	6±1		16,0	Pol 38	20±5		14,3
Pol 14	8±1		19,0	Pol 39	14±4		11,5
Pol 15	9±1		28,7	Pol 40	12±3		12,9
Pol 18	10±2		30,1	Pol 41	14±2		14,2
Pol 19	10±3		41,5	Pol 42	12±2 {13}	485,1±0,5	5,2
Pol 21	10±2		20,2	Pol 44	14±2		12,9
Pol 23	6-14		17,3	Pol 45	21±5	22,6±0,5	20,1
Pol 25	19±2 {18}	25,2±0,2	18,9	Pol 46	27±5		5,3
Pol 28	11±4 {10}	17,2±0,2	31,2	Pol 47	9±1 {10}	1040(11,6) ±0,2	10,1
Pol 29	12±3 {11}	10,9±0,3	21,8	Pol 48	10±1		13,7
Pol 30	14±5 {18}	13,4±0,4	14,5	Pol49	9±1		15,0
Pol 31	12±3		26,0	Pol51	10-26		6,3
Pol 34	16±2 {15}		37,5	Pol52	12±2		51,2
Pol 43	18±2		30,8	Pol53	13±3		9,4
Pol 58	14±2		18,9	Pol54	14±3		10,3
				Pol55	9±2		13,1
				Pol56	12±3	29,5±0,2	20,0
				Pol57	13±3		5,2

Por otra parte, y como prueba de la alta cristalinidad y pureza de las muestras preparadas, decir que se han recogido las imágenes de la distancia interplanar perfectamente diferenciada en la muestra Pol 28, fenómeno que raramente puede ser observado en sistemas sintetizados en un laboratorio. Puede observarse además, en la Figura 2.12, como resultan perfectamente

distinguibles los anillos de difracción electrónica en la muestra Pol 25, lo que permite indexarlos sin ambigüedad en la red de la magnetita

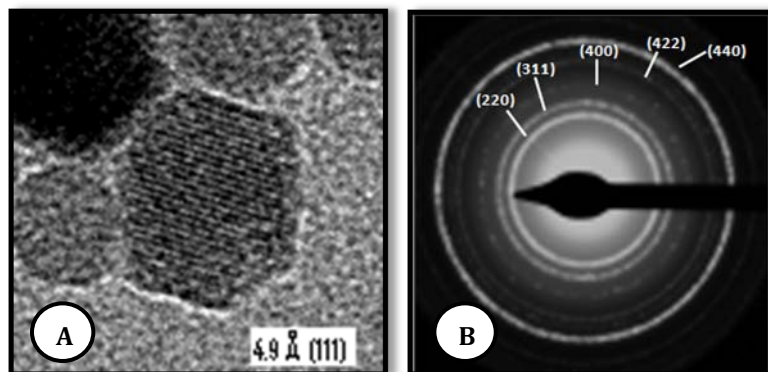


Figura 2.12. Imagen de las distancias interplanares de la muestra Pol 28 (A) y patrón de difracción electrónica indexada para un área seleccionada de la muestra Pol 25 (B).

Las muestras transferidas a agua mediante la incorporación de diferentes moléculas también fueron analizadas por TEM para comprobar la eficacia de los distintos recubrimientos. En la Figura 2.13 se presentan las micrografías correspondientes a las muestras Pol 25_PMAO, Pol 25_DMSA, Pol 25_TEOS y Pol 25_TESPMA.

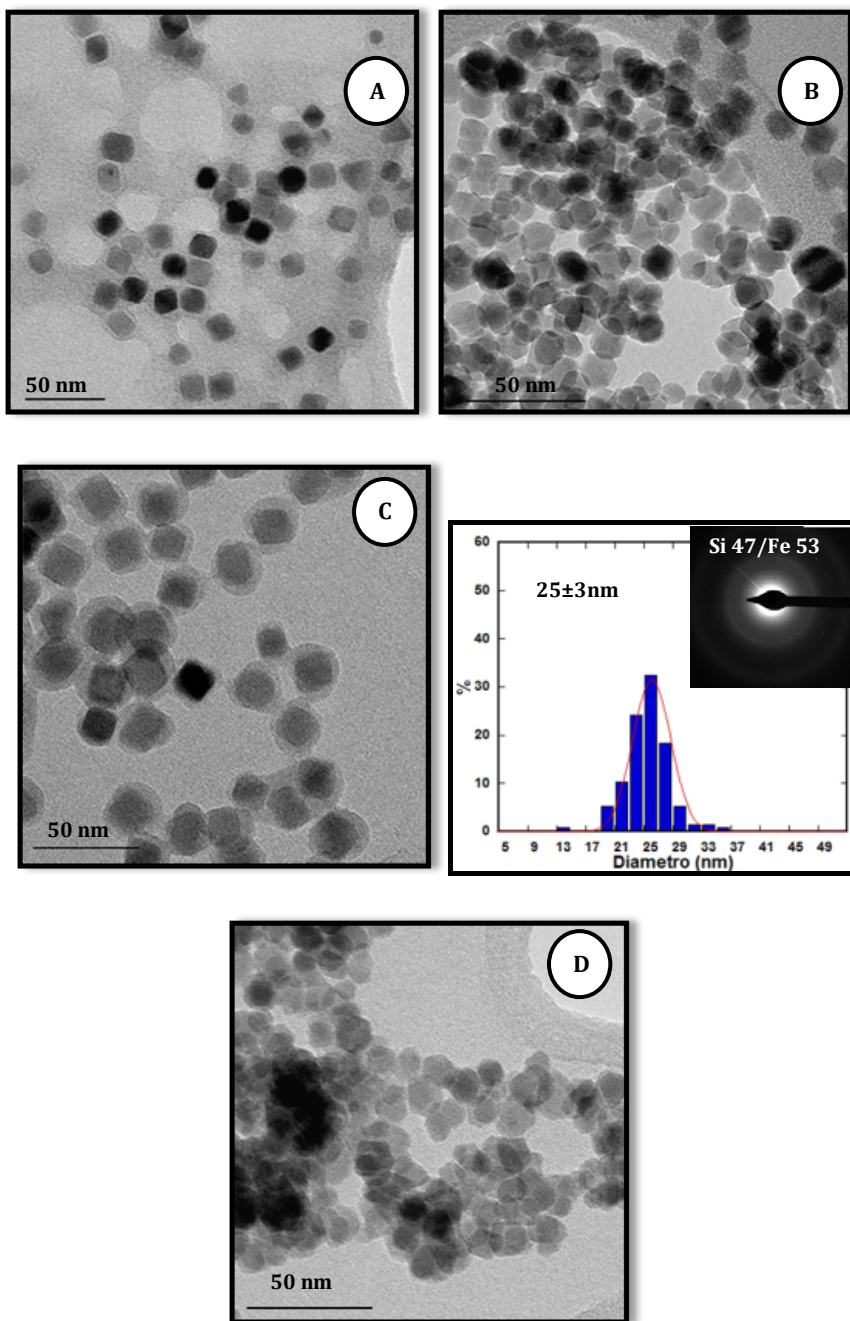


Figura 2.13. Micrografías de las muestras Pol 25_PMAO (A), Pol 25_DMSA (B), Pol 25_TEOS (C) y Pol 25_TESPMA (D).

Los tamaños medios obtenidos a partir de las micrografías de las muestras en agua son idénticos a los obtenidos a partir de las dispersiones en tolueno. En la muestra Pol 25_PMAO se observa una separación mayor entre partículas debido al revestimiento polimérico. En el caso de la muestra Pol 25_TEOS, se puede comprobar que el encapsulamiento de los núcleos se ha realizado de manera individual, lo cual produce de la misma manera un distanciamiento entre las nanopartículas. Por otra parte, el análisis por EDX del recubrimiento con sílice muestra una proporción homogénea de Si/Fe (47/53). En la muestra Pol 25_TEOS se produce un aumento de tamaño debido al recubrimiento metálico alcanzando un tamaño de 25 ± 3 nm, es decir, el recubrimiento de sílice resultante es de 6 nm. Se pierde así el ensamblaje entre partículas presente antes de la transferencia a agua. Sin embargo, con el resto de los recubrimientos se empieza a producir agregación entre nanopartículas debido a interacciones intercatenarias (Pol 25_DMSA) o a la falta de estabilidad coloidal (Pol 25_TESPMA).

II.5. Difusión Dinámica de Luz (DLS)

Una de las consecuencias de la funcionalización de la superficie mediante moléculas orgánicas es el aumento del diámetro efectivo de las NPs, que pasaría a incluir el grosor de las capas orgánicas. Este nuevo diámetro se define como *diámetro hidrodinámico* y se caracteriza mediante técnicas específicas, como la Dispersión Dinámica de Luz (Dynamic Light Scattering (DLS)), que determinan la difusión de la partícula en disolución. Y, a partir de la constante de difusión, D , se puede calcular el diámetro, d_h , empleando la relación Stokes-Einstein⁹ (2.2).

$$D = \frac{k_B T}{3 d_h \eta h} \quad (2.2)$$

⁹ Glennon, B. *Colloidal Nanoparticles in Biotechnology* (New York, New Jersey: John Wiley & Sons, 2003).

donde k_B es la constante de Boltzman ($1,38 \cdot 10^{23}$ J/K), T la temperatura absoluta y η la viscosidad del medio. El valor de este parámetro es de suma importancia en aplicaciones médicas debido a las limitaciones dimensionales que presentan los vasos sanguíneos o las barreras biológicas. Aunque el tamaño individual de la partícula sea reducido, el radio hidrodinámico determinado por DLS puede ser mucho mayor si las partículas se encuentran agrupadas en el medio coloidal; en tal caso, el radio hidrodinámico obtenido correspondería al tamaño del agregado existente.

Para obtener suspensiones estables conviene que las fuerzas repulsivas entre coloides estén maximizadas, de forma que impidan las rápidas sedimentaciones de aglomerados. Las cargas positivas o negativas de los coloides en disolución son las responsables de las fuerzas de repulsión electrostática entre los coloides vecinos. Si la carga es (en valor absoluto) lo suficientemente elevada los coloides permanecen discretos, dispersos y en suspensión. Si la carga superficial se reduce, el sistema se vuelve inestable, los coloides se aglomeran y sedimentan.

Se usa un modelo de la “*doble capa*” para visualizar la atmósfera iónica en la proximidad del coloide cargado y para explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión¹⁰. Inicialmente, la carga del coloide hace que algunos iones formen una capa rígida alrededor de la superficie de éste; esta capa de contraiones se conoce como la “*capa de Stern*”. Otros iones adicionales son aún atraídos por el coloide, pero son rechazados por la capa de Stern y forman la denominada “*capa difusa de contra-iones*”.

La densidad de carga es mucho mayor cerca del coloide y, gradualmente, disminuye a cero con la distancia. Un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern, que representa la energía mínima por unidad de carga que es necesario aplicar para separar la partícula de su atmósfera iónica y que puede determinarse experimentalmente. Dicho potencial eléctrico se conoce como “*Potencial Zeta*”, cuanto mayor sea en valor absoluto, mayor será la estabilidad de la

¹⁰ Lyklema, J., *Fundamentals of Interface and Colloid Science*, 1st ed.(Wageningen, Netherlands, Elsevier, 1995).

dispersión; por el contrario, valores cercanos a cero indican que las dispersiones son inestables y tienen tendencia a la aglomeración.

El radio hidrodinámico y el “Potencial Zeta” de las dispersiones acuosas se midieron en los equipos descritos en el Anexo A.6. Se ha empleado la distribución de intensidades que es el resultado directo de la medida.

En la Figura 2.14 se presentan las distribuciones para las muestras Pol 25_PMAO, Pol 25_DMSA, Pol 25_TEOS y Pol 25_TESPMA correspondientes a dispersiones acuosas en agua destilada filtrada a 0,22 μm (pH 7), siendo su concentración del orden de 0,04 mg/ml Fe.

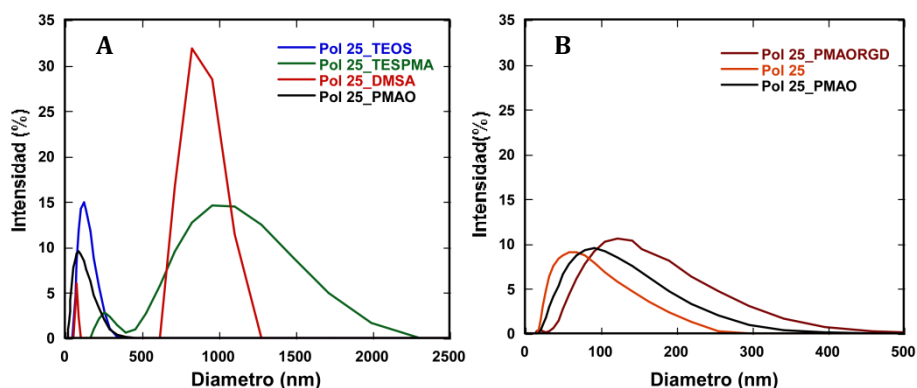


Figura 2.14. Distribución del diámetro hidrodinámico obtenido por DLS para las muestras Pol 25_PMAO, Pol 25_DMSA, Pol 25_TESPMA, Pol 25_TEOS (A) y Pol 25, Pol 25_PMAO y Pol 25_PMAORGD en 1/10 PBS (B).

En la Tabla 2.5 se presentan las distribuciones del diámetro hidrodinámico de algunas de las muestras obtenidas por descomposición térmica que mejores características han presentado monodispersidad, en una concentración de 0,1mg/ml Fe en tolueno.

Por otro lado, también se han determinado los diámetros hidrodinámicos de las muestras obtenidas mediante descomposición térmica, tras la transferencia a fase acuosa con los diferentes recubrimientos.

Tabla 2.5. Valores medios de tamaño hidrodinámico obtenido por DLS con sus respectivas desviaciones estándar, σ , y Potencial Zeta para las muestra Pol 25 en agua con diferentes recubrimientos. El valor y la desviación estándar corresponden a la estadística de tres medidas.

MUESTRAS	D _{DLS} (nm)	σ (nm)	P _z (σ) (mV) [pH=7]
Pol 25	25,2	0,2	
Pol 28	10,7	0,2	
Pol 29	10,9	0,3	
Pol 30	13,4	0,3	
Pol 32	688,4	0,7	
Pol 33	187,0	0,5	
Pol 42	485,1	0,5	
Pol 45	22,6	0,5	
Pol 47	1040	0,3	
Pol 56	29,5	0,2	
Pol 25_DMSA	864,01	0,5	-13,5(11,2)
Pol 25_PMAO	78,0	0,2	-41,9(5,8)
Pol 25_TEOS	69,5	0,2	-27,6(11,5)
Pol 25_TESPMA	1102,2	0,6	-24,5(6,2)
Pol 25_PMAO_RGD 1/10PBS	111,0	0,2	-15,8(1,3)

Según distintas fuentes bibliográficas el tipo de revestimiento polimérico llevado a cabo con el PMAO debería producir un aumento de 7-9 nm en el diámetro de la partícula inicial¹¹ de forma que si al valor de diámetro obtenido en TEM para la muestra Pol 25 previamente al recubrimiento(25,2± 0,2 nm), se le suma la contribución teórica del polímero, se puede estimar el valor del diámetro hidrodinámico esperado (33 nm). Sin embargo, la muestra Pol 25 recubierta con PMAO presenta un tamaño de 78,0± 0,2 nm, un diámetro superior a lo esperado lo que podría ser indicativo de que se ha

¹¹ (a)Di Corato, R.; Quarta, A.; Piacenza, P.; Ragusa, A.; Figuerola, A.; Buonsanti, R.; Cingolani, R. Manna, L.; Pellegrino, T. *J. Mater.Chem.* 18, no. 17 (2008): 1991-1996.(b) Lin, C. J.; Sperling, R. A.; Li, J. K.; Yang, T. Y.; Li, P. Y.; Zanella, M. Chang, W. H.; Parak, W. *Small* 4, no. 3 (2008): 334-341.(c) Levy, M.; Quarta, A.; Espinosa, A.; Figuerola, A.; Wilhelm, C.; García-Hernández, M.; Genovese, A.; Falqui, A.; Alloyeau, D.; Buonsanti, R.; Cozzoli, P. D.; García, M. A.; Gazeau, F.; Pellegrino, T. *Chem. Mater.* 23, no. 18 (2011): 4170-4180.(d) Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, Dmitry; Rogach, A. L.; Keller, S.; Rädler, J.; Natile, G.; Parak, W. J. *Nano Lett.* 4, no. 4 (2004): 703-707.

producido el recubrimiento de varias partículas juntas. La razón principal podría ser la falta redispersión de las NPs iniciales, por ejemplo, por deficiencia del recubrimiento de ácido oleico. Algo similar ocurre con el encapsulamiento a través del TEOS donde la muestra Pol 25_TEOS muestra un tamaño de $69,5 \pm 0,2$ nm ya que las imágenes de TEM presentan un incremento de diámetro de solo 5 nm con el recubrimiento¹². Sin embargo, las imágenes de TEM también muestran un encapsulamiento, mayoritariamente individual, por lo que se puede concluir que el tamaño hidrodinámico obtenido es producto de cierta aglomeración de la muestra que podría haberse producido por interacciones entre nanopartículas por parte de los grupos hidroxilo del silano como los puentes de hidrógeno intermoleculares. Para las muestras Pol 25 con DMSA y TESPMA el diámetro hidrodinámico aumenta considerablemente ($864,0 \pm 0,5$ nm y $1102,2 \pm 0,6$ nm, respectivamente) debido a una gran agregación producida por las interacciones intermoleculares y por insuficiencia de cargas superficiales.

Como se puede comprobar, la muestra que mejores propiedades en cuanto a estabilidad en medio acuoso es la muestra Pol 25 recubierta con el polímero PMAO. Por otro lado, se confirma que la funcionalización con el péptido RGD modifica en cierta medida el grado de dispersión coloidal de la muestra, alcanzando un tamaño de $111 \pm 0,2$ nm. Este hecho puede deberse a la falta de carga superficial, como se comprueba con la medida del “Potencial Z” ($-15,8 \pm 1,3$ mV). Sin embargo, se mantiene un tamaño adecuado para su aplicación *in vivo*.

Además, estos resultados son de gran importancia a la hora de interpretar las propiedades magnéticas de las muestras, ya que las aglomeraciones suelen conducir a interacciones dipolares intensas, pudiendo afectar considerablemente a la respuesta en hipertermia magnética. Además, se requiere de un tamaño adecuado para su aplicación médica, de manera que las NPs puedan alcanzar el tumor¹³.

¹² Ding, H.; Zhang, Y.; Wang, S.; Xu, J.; Xu, S. C.; Li, G. *Chem. Mater.* 24 (2012): 4572–4580.

¹³ Kulhari, H.; Pharm, M.; Pooja, D.; Pharm, M.; Shrivastava, S.; Pharm, M. S. *Nanomedicine* 11 (2015): 1511–1520.

II.6. MALDI-Espectroscopia de Masas

Las muestras sintetizadas se han caracterizado mediante Espectroscopia de Masas-MALDI (Desorción/ Ionización Laser Asistida por una Matriz) con objeto de obtener información sobre la presencia del péptido adherido a la superficie. Los espectros se registraron en el equipo de Espectrometría de masas de alta resolución con ionización por laser (MALDI-LTQ-Orbitrap) del Servicio General (SGIker) de Análisis de la UPV/EHU.

Este equipo consta de una fuente MALDI acoplado a un espectrómetro de masas tándem con trampa iónica (LTQ XL)/Orbitrap. Está diseñado para proporcionar una alta resolución superior a 50000 FWHM (Full Width at Half Maximum), exactitud de masa en torno a 1-2 ppm, alta sensibilidad y velocidad de escaneo y versatilidad en las formas de escaneo gracias a los modos de barrido MS (Masas), MS/MS (Masas/ Masas) y MS_n (Secuencial). Este equipo resulta adecuado para operar en los límites de las capacidades de la espectrometría convencional.

Uno de los inconvenientes de la funcionalización de las nanopartículas con el RGD por el método de las carbodiimidias es el bajo rendimiento de la misma y, consecuentemente, la baja relación de la masa del péptido respecto a la masa total de la nanopartícula funcionalizada. Este hecho desemboca en una gran dificultad a la hora de comprobar la unión de la molécula a la nanopartícula por los métodos tradicionales tales como el análisis elemental, el análisis termogravimétrico o la espectroscopia IR.

Por otro lado, los ensayos colorimétricos tipo Bradford o BCA para la cuantificación de proteínas resultan muy útiles a la hora de medir la cantidad de proteína total en una solución dada. Dichos métodos son altamente específicos respecto a los aminoácidos con los que reaccionan para dar lugar al compuesto coloreado. Estos aminoácidos son la cisteína, la cistina, la tirosina y el triptófano en el método BCA y la arginina, la fenilalanina, el triptófano y la prolina en el método Bradford. Por lo tanto, son una alternativa viable para cuantificar la cantidad de péptido RGD incorporado en la superficie de la nanopartícula. Sin embargo, este tipo de ensayos también resultaron ineficaces debido a la falta de especificidad y el bajo peso

molecular del péptido RGD utilizado, dando absorbancias por debajo del límite de detección.

Por ello, se recurrió a la identificación del péptido mediante el denominado mapeo de masas peptídicas mediante espectrometría de masas y la secuenciación de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem.

La espectrometría de masas se introdujo en el ámbito del análisis de biomoléculas al final de la década de los años 70 del siglo pasado con la aparición de diversas técnicas de ionización suave, como la desorción por campo eléctrico (FD), la desorción por plasma (PD) y la ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB)¹⁴. Estas técnicas permitían la ionización de moléculas termolábiles de gran tamaño, como los péptidos y las proteínas, sin producir la extensiva degradación característica de las denominadas técnicas de ionización dura, cuyo representante de referencia es el impacto electrónico. Posteriormente, en el inicio de los años 90, otros dos métodos de ionización suave, el electrospray (ESI) y la desorción por láser asistida por matriz (MALDI), tomaron el relevo al FAB y se constituyeron en los pilares básicos de la espectrometría de masas en la proteómica contemporánea.

La heterogeneidad en la composición de biomoléculas tales como lípidos o péptidos modificados, dificulta el análisis en condiciones comunes para todas las especies. Desde el punto de vista de la técnica MALDI este hecho dificulta la elección de disolventes y matrices teniendo en cuenta que la especificidad de la matriz está determinada parcialmente por la polaridad de las especies¹⁵.

Los puntos cruciales son la preparación de la muestra, la deposición de la matriz y la cristalización. La matriz debe depositarse usando la mínima cantidad de disolvente para evitar la deslocalización de las moléculas de los analitos y, por otro lado, la cristalización también debe ser cuidadosamente controlada. La distribución homogénea de los analitos dentro de los cristales de la matriz y la homogeneidad de la distribución de estos cristales es esencial

¹⁴ Abián, J.; Carrascal, M.; Gay, M. *Proteómica 2* (2008): 16–34.

¹⁵ Meriaux, C.; Franck, J.; Wisztorski, M.; Salzet, M.; Fournier, I. *Journal of Proteomics* 73, no. 6 (2010): 1204–1218.

para la reproducibilidad de la medida. Como las imágenes requieren tiempo de largos tiempos de adquisición, las matrices deben presentar, además, una buena estabilidad bajo vacío.

En este sentido, el uso del 2-mercaptobenzotiazol (MBT)¹⁶ ha demostrado ser muy eficiente para la detección de lípidos después de la deposición por laser, permite una cristalización homogénea y presenta una gran estabilidad bajo condiciones de vacío, lo que permite la detección de gran variedad de lípidos. Para determinadas clases de lípidos, sin embargo, la incorporación en los cristales de la matriz no es necesaria para generar iones en la fase gaseosa. Esto abre otra alternativa de los métodos de deposición, que permite eliminar el uso de disolventes y minimizar la deslocalización de los analitos durante la etapa de deposición, generando películas policristalinas ultrafinas de matriz. Estos procesos incluyen el recubrimiento de matriz libre de disolvente a través de la deposición en polvo¹⁷ y la sublimación de la matriz¹⁸. Sin embargo, si bien las películas de cristal generadas por ambos métodos son altamente homogéneas, la intensidad de las señales del analito se reducen drásticamente y, por tanto, solo las especies más abundantes se observarían.

Tanto la proporción analito/matriz como el orden en el que se depositan son factores críticos a la hora de obtener una buena medida. Con la intención de obtener una cristalización lo más homogénea posible. En nuestro caso, se procedió a realizar la preparación de la muestra con una relación analito/matriz 1/1 mediante el método “sándwich” donde la matriz se corresponde con una disolución saturada de MBT en metanol. Así, después de depositar una capa fina de matriz ($\approx 10\mu\text{l}$), se deposita la muestra ($\approx 10\mu\text{l}$) e inmediatamente después (antes de que la muestra se seque), se añade otra capa de la disolución de MBT ($\approx 10\mu\text{l}$)¹⁹.

¹⁶ Astigarraga, E.; Barreda-Gómez, G.; Lombardero, L.; Fresnedo, O.; Castaño, F.; Giralt, M. T.; Ochoa, B.; Rodríguez-Puertas, R.; Fernández, J. A. *Anal. Chem.* 80 no.23 (2008): 9105-9114.

¹⁷ Puolitaival, S.M.; Burnum, K. E.; Cornett, D. S.; Caprioli, R. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, no. 6 (2008): 882-886.

¹⁸ Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Murphy, R. C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, no. 9 (2007): 1646-1652.

¹⁹ Signor, L.; Erba, E. B. *Journal of Visualized Experiments* 79 (2013): 1-7.

En la Figura 2.15 se han recogido los espectros obtenidos por medio del espectrómetro de masas-MALDI para la matriz MBT y para la muestra Pol 25_PMAORGDPEG depositada en la matriz MBT con el fin de distinguir las señales procedentes del analito, en este caso, la molécula final modificada de RGD adherida a la superficie de la NP.

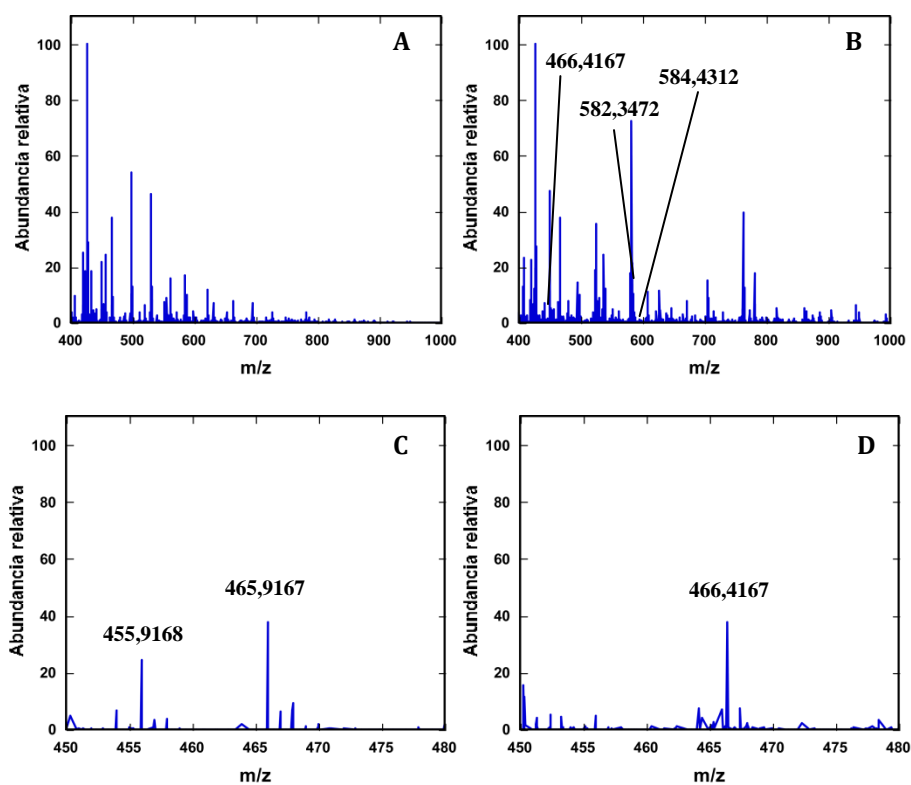


Figura 2.15. Espectros de masas-MALDI de la matriz MBT (A) y la muestra Pol 25_PMAORGDPEG en matriz MBT (B). Espectros amplificados de la matriz MBT (C) y de la muestra Pol 25_PMAORGDPEG en matriz MBT (D), donde se pueden comparar las diferentes señales en ambos casos.

En los espectros obtenidos se pueden apreciar diferentes picos que varían entre la medida de la matriz y la medida de la muestra añadida sobre ésta. Sin embargo, debido a que la diferencia de intensidades puede deberse a la preparación de la muestra y no solo a la presencia del analito, este tipo de señales pueden producir un “falso positivo”. Por lo tanto, teniendo en cuenta la complejidad de la muestra, se procedió a seleccionar las señales que

variaban en la posición no así en intensidad. Las señales que varían en la posición son de mucha menor intensidad, lo cual es predecible dado que el porcentaje de masa de la molécula a estudiar es bajo respecto a la muestra total. De entre todas, las señales más intensas se dan a 466,4167, a 582,3472 y a 584,4312 m/z.

Con el propósito de comprobar que dichas señales pertenecen realmente a la molécula adherida a la superficie de las NPs y no a impurezas de la disolución final, se procedió a la limpieza (x2 veces) y dilución 1:2 en agua miliQ. En este caso, se obtuvo el siguiente espectro (Figura 2.16).

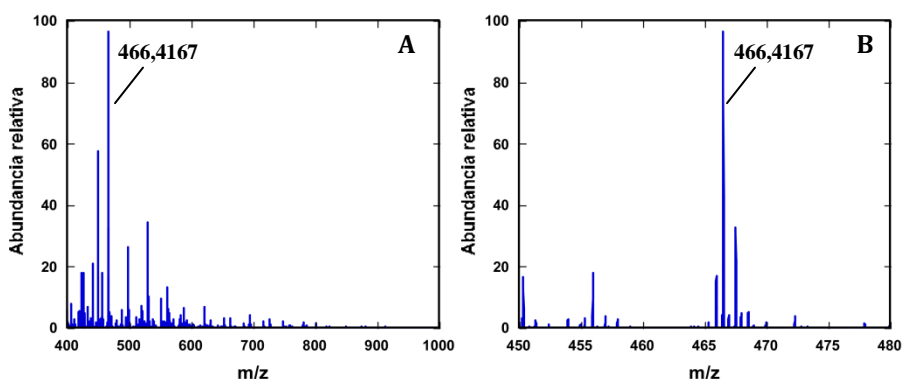


Figura 2.16. Espectros de masas-MALDI de la muestra Pol 25_PMAORGDPEG diluida en matriz MBT (A) y el espectro amplificado de la muestra Pol 25_PMAORGDPEG diluida en matriz MBT (B).

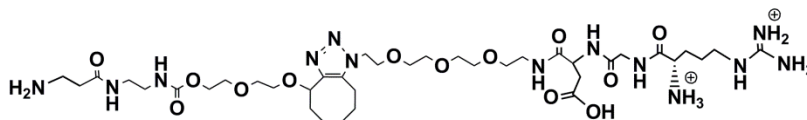
En estos espectros se puede observar que la señal a 466,4167 m/z permanece prácticamente inalterable en la muestra diluida tras la limpieza por lo que se puede considerar que esta señal únicamente pertenece a la molécula en cuestión.

Utilizando el programa Mass Frontier se han propuesto diferentes roturas de la molécula final para poder asignar este pico a una de ellas²⁰. Este software proporciona, desde su librería, mecanismos de fragmentación para cualquier molécula indexada. A partir de ahí, el programa produce una lista de posibles aductos en cada caso. En la Figura 2.17 se presentan tres de las

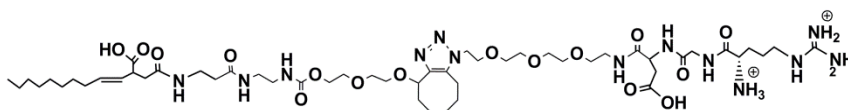
²⁰ (a) Xiao, J. F.; Zhou, B.; Resson, H. W. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 32 (2012): 1.
(b) Kumari, S.; Stevens, D.; Kind, T.; Denkert, C. *Analytical Chemistry* 83 (2011): 5895.

roturas principales de la molécula que se indexaron en el programa para estudiar sus posibles fragmentos y relacionarlos con la señal observada previamente.

A) $C_{36}H_{68}N_{12}O_2^{2+}$, P.M.= 860,9972 g/mol



B) $C_{50}H_{90}N_{12}O_{15}^{2+}$, P.M.= 1099,3199 g/mol



C) $C_{40}H_{72}N_{12}O_{14}^{2+}$, P.M.= 945,0706 g/mol

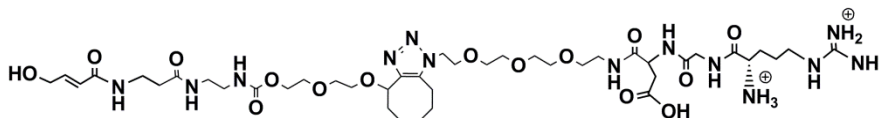


Figura 2.17. Fórmulas de tres de los diferentes posibles aductos formados tras la ionización en espectroscopia de Masas-MALDI: $C_{36}H_{68}N_{12}O_2^{2+}$ (A), $C_{50}H_{90}N_{12}O_{15}^{2+}$ (B) y $C_{40}H_{72}N_{12}O_{14}^{2+}$ (C).

Sin embargo, no se han obtenido unos resultados para la señal a 466,4167 m/z que se ajusten al límite de incertidumbre de esta técnica. Teniendo en cuenta las múltiples roturas y aductos que se pueden producir durante el proceso de ionización y la complejidad de la molécula a estudio, resulta necesario realizar un mayor número de medidas. Aunque la presencia inalterada de dicha señal tras las diluciones y limpiezas parece confirmar la presencia del analito, la asignación de este pico queda pendiente para un posterior estudio.

II.7. Resonancia Magnética Electrónica (RME)

Los espectros de RME se han obtenido en un espectrómetro Bruker ELXSYS 500, que opera en banda X (aprox. 9,4 GHz) y está equipado con una cavidad de alta ganancia ER-4123-SHQ y una fuente de microondas de 200 mW de potencia. Este equipo está ubicado en los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la UPV/EHU. Los espectros se han realizado utilizando una amplitud y una frecuencia de modulación de 1 Gauss y 100 kHz, respectivamente.

El uso de la espectroscopia de RME en la caracterización de nanopartículas magnéticas se ha generalizado en los últimos años. Esta técnica no sólo proporciona información sobre el comportamiento magnético global de la muestra, siendo en este sentido un complemento muy útil e las medidas de imanación, sino que además, es capaz de aportar datos sobre aspectos como el tamaño de las nanopartículas, su anisotropía morfológica, efectos de superficie o interacciones interparticulares²¹.

Sin embargo, extraer la información que esta técnica puede aportar no siempre es sencillo, dado el elevado número de variables que pueden influir simultáneamente sobre el resultado final: respuesta magnética individual y colectiva, anisotropía local y masiva, agregaciones, reorientaciones de las partículas o sus dominios frente al campo aplicado, etc. Por este motivo ha sido habitual la falta de reproducibilidad en los resultados presentados por los diferentes autores sobre sistemas análogos, y tampoco ha habido en muchos casos un consenso generalizado sobre el origen de los diferentes fenómenos observados en los espectros. Estos problemas son muy acusados cuando se trabaja sobre muestras sólidas, pero se pueden reducir drásticamente preparando la muestra de diferentes maneras en función de la información que se pretenda obtener: dispersión en líquidos o polímeros, deposición en papel, películas delgadas, etc. Más aún, a medida que se ha podido disponer de

²¹ (a) Noginova, N.; Weaver, T.; Giannelis, E.; Bourlinos, a.; Atsarkin, V.; Demidov, V. *Phys. Rev. B* 77 (2008): 014403. (b) Carbone, C.; Di Benedetto, F.; Sangregorio, C.; Marescotti, P.; Pardi, L. A.; Sorace, L. *J. Phys. Chem. C* 112 (2008): 9988-9995. (c) Yulikov, M.; Lueders, P.; Farooq Warsi, M.; Chechik, V.; Jeschke, G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, no. 30 (2012): 10732. (d) Kempe, S.; Metz, H.; Mäder, K. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74, no. 1 (2010): 55-66.

sistemas nanoparticulados, prácticamente monodispersos, se ha comprobado que la información que se puede obtener mediante esta técnica puede ser muy relevante; especialmente, si se consiguen excluir, selectivamente, algunas variables²².

En nuestro caso, aunque las medidas en sólido se han empleado en caracterizaciones preliminares, la realización de las medidas sobre las muestras en dispersión ha demostrado ser la metodología más sencilla y eficaz. De esta manera, se minimizan los problemas de reproducibilidad y de direcciones preferenciales, dependientes de la orientación relativa de la muestra con el campo externo. Como consecuencia, la medida efectuada resulta muy sensible al tamaño de la partícula y a la distribución de tamaños de la muestra²³. Esta característica puede, de hecho, repercutir negativamente en la determinación de propiedades magnéticas esenciales, debido al alto grado de ensanchamiento de las líneas de resonancia resultantes. Este es el principal punto débil de estas medidas, si las muestras presentan una distribución de tamaños muy ancha o cierta agregación, los espectros sufren un grado de ensanchamiento que impide obtener información relevante²⁴. Pero aún así, la simple comparación directa de los espectros de RME registrados a temperatura ambiente, de muestras preparadas en igual concentración y disolvente, es una forma muy rápida y sencilla de obtener información muy relevante sobre estos sistemas magnéticos nanoparticulados.

Con objeto de realizar toda la caracterización de las muestras en las condiciones más parecidas posibles, se han utilizado en la medida de lo posible muestras de aproximadamente 1 ml de dispersiones que presentaban una concentración de 5mg/ml, que es la misma que se emplea habitualmente en las medidas de hipertermia magnética. Es preciso constatar que si se

²² (a)Gatteschi, D.; Fittipaldi, M.; Sangregorio, C.; Sorace, L. *Angew. Chem.* 51, no. 20 (2012): 4792-4800.(b) Sezer, G.; Prandolini, M. J.; Prisner, T. F. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, no. 31 (2009): 6626-6637.

²³ (a) Castellanos-Rubio, I.; Insausti, M.; Garaio, E.; Gil de Muro, I.; Plazaola, F.; Rojo, T.; Lezama, L. *Nanoscale.* 6 (2014) 7542-7552. (b) Gazeau, F.; Bacri, J. C.; Gendron, F.; Perzynski, R.; Raikher, Y. L.; Stepanov, V. I.; Dubois, E. *J. Magn. Magn. Mater.* 186, no. 1-2 (1998): 175-187.(c) Schmool, D. S.; Rocha, R.; Sousa, J. B.; Santos, J. a M; Kakazei, G. N.; Garitaonandia, J. S.; Lezama, L. *J. App. Phys.* 101, no. 10 (2007): 103907.

²⁴ Noginov, M. M.; Noginova, N.; Amponsah, O.; Bah, R.; Rakhimov, R.; Atsarkin, V. A. *J. Magn. Magn. Mater.* 320, no. 18 (2008): 2228-2232.

emplean muestras más concentradas aparece una fuerte dependencia de la anchura de las líneas con la concentración, que es debida a la aparición de interacciones dipolares entre partículas. No obstante, hay que tener en cuenta que en 1 ml de una dispersión de 5 mg/ml de nanopartículas de, por ejemplo, 15 nm tenemos más de 10^{14} NPs. Esto significa que estamos evaluando simultáneamente el comportamiento de un número de individuos mucho más elevado que mediante otras técnicas. Por ejemplo, en un típico análisis de tamaño de partícula por TEM lo habitual es medir el diámetro de unas 300 NPs.

Los espectros habitualmente obtenidos en estas condiciones muestran una única señal, aproximadamente isotrópica y centrada en valores de campo magnético sensiblemente inferiores a los que se corresponden al valor de $g=2,0023$ del electrón libre. En cuanto a los parámetros que hemos analizado para caracterizar las muestras, los más importantes han sido el valor de g efectivo (g_{ef}) y la anchura de línea “pico a pico” (ΔH_{pp}). El primero de los factores está directamente relacionado con la respuesta magnética de la muestra, en tanto que el segundo informa sobre la dispersión de tamaño de las nanopartículas presentes.

La existencia de una relación directa entre el tamaño de las partículas y el desplazamiento de la línea de resonancia es evidente si se asume que se trata de sistemas monodominio que se alinean completamente con el campo aplicado²⁵. Pero cuando se realizan medidas de RME en un disolvente poco viscoso, como es el caso del tolueno ($n=0,55$), hay que tener en cuenta que las desviaciones que se observan en la posición de la línea resonante respecto del valor de $g=2$, no se deben a un cambio en el estado fundamental del espín de cada partícula, sino a su capacidad para rotar físicamente y orientar su eje fácil de imanación con la dirección del campo magnético aplicado. Por tanto, el valor de g_{ef} medido es realmente una medida del grado de alineamiento alcanzado, que a su vez depende del *campo de anisotropía interna* de cada partícula. Y hay que tener en cuenta que este último depende a su vez de la anisotropía cristalina (morfología) y del tamaño de la nanopartícula. De

²⁵ Raikher, Y. L.; Stepanov, V. I. *Phys. Rev.B* 50, no. 9 (1994): 6250–6259.

manera que partículas con similares propiedades magnéticas y morfología, pero con diferente tamaño, van a resonar a diferentes campos aplicados porque presentan diferente campo de anisotropía. O lo que es lo mismo, si todas las partículas de una muestra presentan una misma geometría aproximada, el valor del campo resonante, o de g_{ef} , se puede relacionar directamente con el tamaño medio de las nanopartículas, siendo g_{ef} más grande cuanto mayor sea el diámetro de las partículas.

Por otra parte, si se tiene en cuenta que cada partícula en la muestra resuena para un campo diferente en función de su anisotropía y tamaño, se deduce fácilmente que cuanto mayor sea la polidispersidad de una muestra mayor será la anchura de línea que presente. No obstante, no hay que olvidar tampoco el posible efecto de las interacciones dipolares. De hecho, también se pueden utilizar dispersiones coloidales de diferente concentración para estimar el tamaño de las partículas en función de la dependencia de la anchura de la señal con la concentración²⁶. Sin embargo, si las medidas se realizan en sistemas de baja concentración, como los que se pueden alcanzar en tratamientos de hipertermia magnética, el problema se simplifica al minimizarse las interacciones dipolares.

Teniendo en cuenta lo anterior, la observación de una única o varias contribuciones en el espectro de RME ya aporta directamente información sobre la homogeneidad de la muestra. Cuando se miden las muestras preparadas, no siempre se observa inicialmente una única señal en los espectros de RME. En algunos casos, se observan simultáneamente varias señales que corresponden a la presencia de poblaciones importantes de NPs con tamaños medios sensiblemente diferentes (distribuciones multimodales). La realización de varios ciclos de “limpieza” (empleando diferentes volúmenes de EtOH y tolueno) permite, en muchos casos, seleccionar las partículas de un determinado tamaño, lo que se traduce en la simplificación del espectro hasta una única señal (Figura 2.18.A). En otras ocasiones, los repetidos ciclos de “limpieza” no fueron suficiente y fue necesario recurrir a centrifugados sucesivos para poder seleccionar la población más estable en el

²⁶ Bakuzis, A. F.; Branquinho, L. C.; Luiz E Castro, L.; De Amaral Eloi, M. T.; Miotto, R. *Adv. Colloid Interfac. Sci.* 191 (2013): 1-21.

coloide, reduciendo al mismo tiempo la distribución de tamaños con el consiguiente estrechamiento del espectro (Figura 2.18.B).

En cualquier caso, es importante señalar que a medida que se realizan las sucesivas adiciones para alcanzar un mayor crecimiento de las NPs, en los espectros de RME es habitual advertir contribuciones de partículas de tamaños muy diferentes. Este hecho sugiere que, en cada etapa de adición, un cierto porcentaje de las partículas permanecen inalteradas.

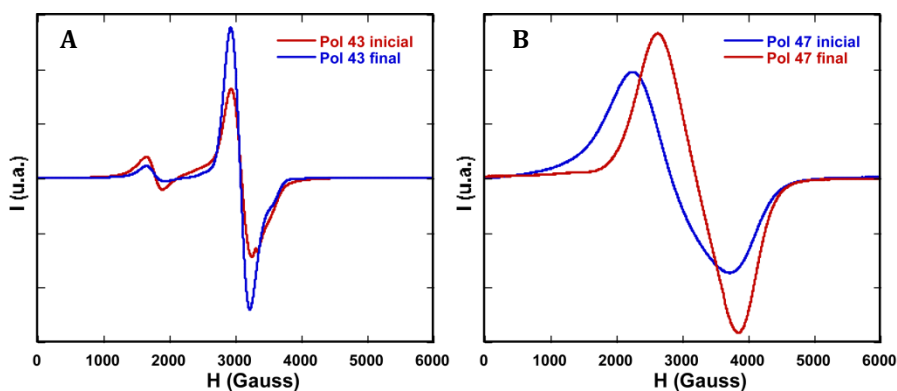


Figura 2.18. Espectros de RME de la muestra Pol 43 antes y después de sucesivas limpiezas con tolueno y EtOH (A) y de la muestra Pol 47 antes y después de la criba de tamaños por centrifugado (B).

Tal y como se aprecia en la Figura 2.18, la reducción de la polidispersidad de las muestras es significativa. Así, en la muestra Pol 47 la anchura de línea “pico a pico” se reduce en más de 500 Gauss, al mismo tiempo que el campo resonante se desplaza en más de 200 Gauss. En la muestra Pol 43 los cambios no son tan drásticos, pero se observa claramente como la señal principal reduce su anchura mientras que la señal que aparece a aproximadamente 1800 Gauss pierde intensidad después de la limpieza con tolueno y etanol. Hay que destacar sin embargo, que estos efectos no son detectados claramente en las medidas de TEM, lo que prueba la mayor representatividad de las muestras empleadas en RME.

Un aspecto en el que esta técnica resulta de gran utilidad es en la evaluación y optimización de las variables sintéticas, dado que resulta

relativamente fácil analizar cómo afectan éstas a las características morfológicas y magnéticas de las nanopartículas preparadas.

Así por ejemplo, si se comparan los espectros registrados para las muestras Pol 5 y Pol 19 (Figura 2.19.A) se puede deducir fácilmente el efecto de la cantidad de surfactante añadida, que es el único parámetro diferente empleado en la síntesis de ambos materiales. Se puede observar como la señal correspondiente a la muestra Pol 19 aparece a campos menores ($g_{ef}=2,13$) que la señal de la muestra Pol 5 ($g_{ef}=2,06$). Considerando que la anisotropía morfológica observada por TEM en las partículas de ambos sistemas es similar, el mayor valor de g_{ef} observado en Pol 19 implica que sus NPs son de mayor tamaño, y este hecho debe atribuirse a la menor cantidad de 1,2-hexadecanediol empleado en su preparación.

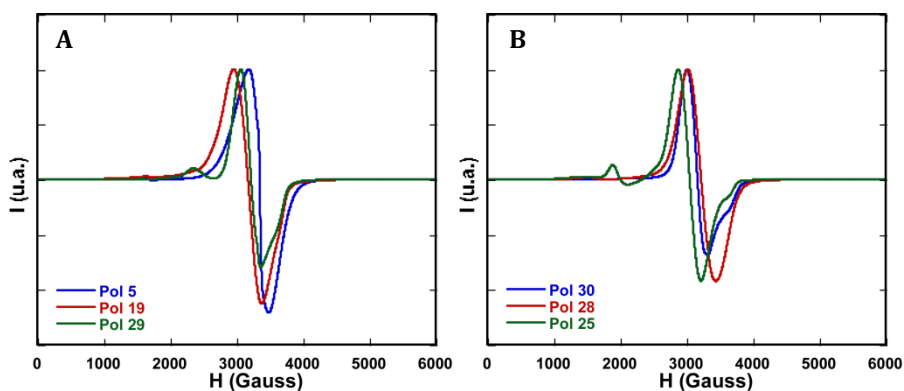


Figura 2.19. Espectros de RME de muestras sintetizadas a partir de $Fe(CO)_5$ mediante una adición (A) y mediante cuatro adiciones consecutivas (B).

También puede deducirse inmediatamente que uno de los parámetros sintéticos de mayor importancia en el crecimiento de las NPs es la concentración de los precursores en el medio de reacción. Concentraciones bajas mejoran la homogeneidad y limitan el crecimiento, pero un exceso en las concentraciones de los reactivos también puede acabar limitando el crecimiento medio, aunque sí se encuentren partículas con mayor diámetro. Así se puede observar en la Figura 2.19.A como la línea resonante principal de la muestra Pol 29 aparece a un campo magnético mayor que la de la muestra Pol 19, debido al exceso en la cantidad de los ligandos empleados

(ácido oleico y oleilamina), pero también aparecen otras líneas secundarias a menores valores de campo que indican la presencia de partículas sensiblemente mayores en la muestra.

Por otra parte, si se comparan los espectros representados en las Figuras 2.19.A y B, pueden deducirse el efecto de realizar la síntesis en una sola etapa o emplear varias adiciones sucesivas. En general, el crecimiento alcanzado mediante una síntesis en varias etapas es apreciablemente mayor que el alcanzado en una sola etapa; sin embargo, el resultado es más heterogéneo, y aparecen con frecuencia distribuciones multimodales, aunque habitualmente se observa un tamaño de partícula predominante. También cuando se realizan adiciones sucesivas es esencial determinar cuál es la concentración apropiada de los reactivos en cada etapa. Así por ejemplo, podemos ver en la Figura 2.19.B cómo el crecimiento de las partículas ha sido menor en las muestras Pol 28 y Pol 30 que en la Pol 25, para la que se han empleado concentraciones intermedias. Más aún, para esta muestra se observan poblaciones minoritarias con tamaños de partículas mayores y menores, pero la dispersión de diámetros de la población principal es muy pequeña, como lo demuestra la pequeña anchura de línea que muestra la señal principal a pesar de su elevado valor de g_{ef} .

Otro aspecto analizado en los espectros de RME ha sido la forma de las líneas, que está fuertemente influenciada por el tamaño de las partículas y su grado de monodispersidad. Así por ejemplo, muestras con tamaños de 4-6 nm y una estrecha distribución de diámetros, presentan una señal típicamente lorentziana. En general, las líneas lorentzianas se obtienen tanto en sistemas magnéticamente diluidos, como en sistemas dominados por una interacción de canje que colapsa las diferentes contribuciones individuales²⁷. En este caso la observación de líneas puramente lorentzianas implica la presencia de nanopartículas con buen acoplamiento intraparticular, pero con interacciones dipolares interparticulares despreciables. El promedio, y por tanto anulación, de estas interacciones en medio líquido se da únicamente cuando la concentración y el tamaño de las nanopartículas son pequeños. Además, es

²⁷ Castellanos-Rubio, I.; Insausti, M.; Gil de Muro, I.; Arias-Duque, C.; Hernández-Garrido, J.C.; Rojo, T.; Lezama, L. *J. Nanopart. Res.* 229 (2015): 1-13.

preciso que todas las NPs presenten una respuesta magnética similar, lo que implica mismo tamaño y anisotropía, porque si no se superponen resonancias con diferente centro y la línea se ensancha adquiriendo una forma gaussiana o intermedia. Así, en las muestras sintetizadas con tamaños superiores a los 9 nm, las líneas presentan perfiles fundamentalmente gaussianos, lo que implica que se produce un solapamiento de contribuciones de partículas de diferentes tamaños y/o que las interacciones dipolares no se anulan por completo en las dispersiones coloidales, provocando lo que se conoce como un *ensanchamiento inhomogéneo* (Figura 2.20).

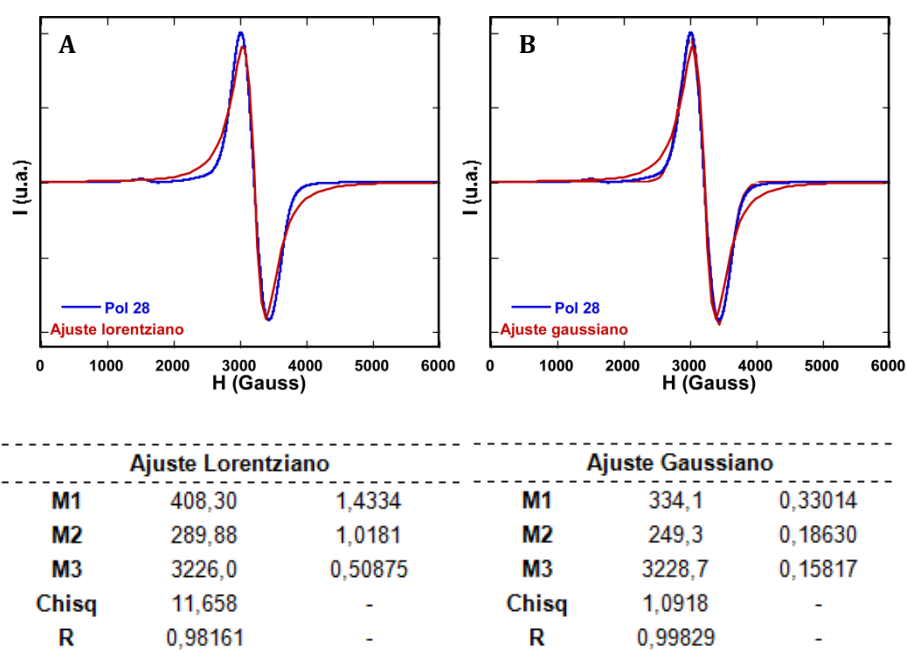


Figura 2.20. Ajuste de los espectros de RME de la muestra Pol 28 mediante la función de Lorentz (A) y mediante la función de Gauss (B).

La mayor parte de las muestras presentadas en esta memoria, en especial las sintetizadas a partir de acetilacetato, presentan líneas fundamentalmente gaussianas. El tamaño de las NPs, superior a los 10 nm en general, dificulta la completa anulación de las interacciones dipolares a pesar de la baja concentración empleada en las medidas y la pequeña viscosidad del tolueno. Por otra parte, en algunos de los espectros se puede observar

claramente el efecto del solapamiento de contribuciones de partículas de diferentes tamaños y también la presencia de especies agregadas que presentan en dispersión un comportamiento anómalo debido a que al orientar algunas partículas su eje fácil de imanación con el campo aplicado, otras quedan necesariamente desalineadas y originan una señal a un campo muy diferente. Como resultado de ambos efectos las líneas se ensanchan y pierden el carácter isotrópico esperado de una muestra bien dispersada y con rotación libre en el medio de medida. Esta situación puede observarse claramente en algunos de los espectros representados en la Figura 2.21. Así por ejemplo, la muestra Pol 32 (Figura 2.21.A), con un amplio intervalo de tamaños y alto grado de agregación (como se puede observar también en la Figura 2.9.A de TEM) presenta una señal muy ancha. Por el contrario, la muestra Pol 33, que fue sintetizada con el mismo número de adiciones, pero empleando una mayor proporción de ácido oleico frente al precursor de hierro, muestra una anchura de banda mucho menor, en consonancia con la distribución de tamaños, mucho más estrecha que se deducía de los estudios de microscopía electrónica de transmisión.

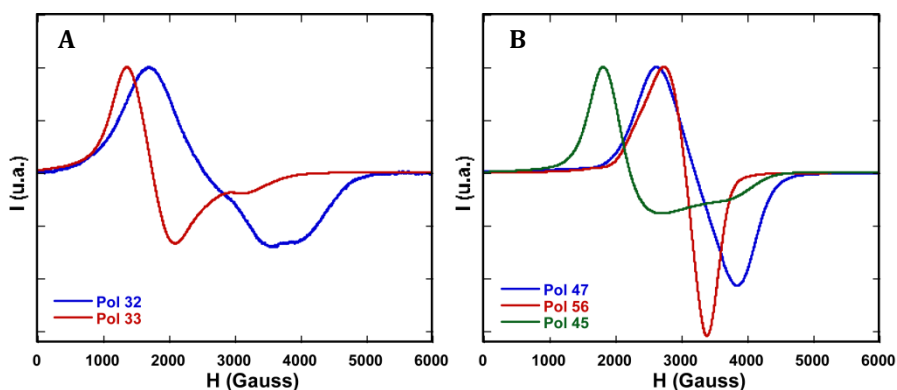


Figura 2.21. Espectros de RME de muestras sintetizadas a partir de $Fe(acac)_3$ con cuatro adiciones consecutivas y diferentes proporciones oleico/precursor (A), y de muestras sintetizadas en diferente número de adiciones: 2-Pol 47, 3-Pol 45 y 3-Pol 56 (B).

Como se ha comentado anteriormente, en general al aumentar el número de adiciones consecutivas no sólo se incrementa el tamaño medio de

las NPs preparadas, sino también su polidispersidad. Sin embargo, no hay que olvidar el efecto de otras variables como la concentración de los reactivos o del propio surfactante. Así puede observarse en la Figura 2.21 cómo efectivamente el tamaño de las nanopartículas crece con el número de adiciones, pero también puede verse como un exceso de surfactante puede limitar el crecimiento (Pol 56 vs. Pol 45).

En la Tabla 2.6 se han recogido los valores del factor g efectivo, g_{eff} , y las anchuras de línea “pico a pico”, ΔH_{pp} , de muestras que presentan una única y relativamente estrecha señal de RME, junto con los valores de sus tamaños medios determinados mediante microscopía TEM. En buen acuerdo con trabajos anteriores²⁶, se puede constatar la clara relación existente entre la magnitud del campo resonante y el diámetro de la partícula, así como entre la anchura de las señales y la distribución de tamaños.

Tabla 2.6. Valores de diámetro de partícula obtenidos por TEM y valores de g_{ef} y ΔH_{pp} calculados.

MUESTRA	D_{TEM} (nm)	g_{ef}	ΔH_{pp} (Gauss)
Pol 5	11±1	2,06	850
Pol 19	10±3	2,13	1000
Pol 25	19±2	2,23	684
Pol 28	11±4	2,10	1050
Pol 29	12±3	2,10	550
Pol 30	14±5	2,12	583
Pol 32	10-40	2,66	2400
Pol 33	23±4	3,83	1583
Pol 45	17±3	3,03	1184
Pol 47	9±1	2,09	1533
Pol 56	12±3	2,20	1350

Aunque en general se observa una buena correlación entre los resultados que se obtienen por RME y TEM, especialmente cuando se aplican en muestras con distribuciones de tamaño razonablemente estrechas y simétricas²⁸, hay que tener en cuenta que no siempre todos los efectos que se

²⁸ Castellanos-Rubio, I. *Preparation and Characterization of Pd, PdFe, Fe3O4; Potential Inducers of Magnetic Hyperthermia (PhD Thesis)* (University of Basque Country, Leioa, 2013).

observan sobre los espectros de RME se detectan sobre las micrografías TEM. Por ejemplo, los efectos de la limpieza de las muestras o de las separaciones por centrifugación pasan muchas veces inadvertidos en los análisis por microscopía electrónica. En este sentido, una gran ventaja de la técnica RME es el carácter macroscópico de la muestra analizada, lo que proporciona gran fiabilidad al estudio y hace que el resultado sea más representativo del conjunto de la muestra que técnicas como el TEM, donde se estudia un número mucho más reducido de nanopartículas.

Los valores del factor g *efectivo* se desvían de 2 en todos los casos, en mayor o menor grado. Teniendo en cuenta que el valor de g de la magnetita en estado paramagnético es prácticamente igual al del electrón libre (2,0023), este hecho significa que, desde el punto de vista de la RME, las muestras no son estrictamente superparamagnéticas a temperatura ambiente²⁹. Hay que tener en cuenta que la observación de un comportamiento *superparamagnético* depende del tiempo de medida, si la ventana de tiempo del experimento es menor que el tiempo que necesita el momento magnético para voltear espontáneamente de un sentido del eje fácil al otro (tiempo de relajación), se observará que el sistema está bloqueado y por lo tanto en régimen *ferromagnético*. Este hecho deberá ser tenido en cuenta a la hora de interpretar lo que ocurre bajo la aplicación de un campo magnético alterno, como el empleado en los experimentos de hipertermia magnética.

En un trabajo previo²³, nuestro grupo de trabajo dedujo una curva de calibrado que permite obtener el diámetro de NPs de magnetita a partir del valor de g_{ef} deducido de su espectro de RME medido a temperatura ambiente en una dispersión en tolueno de concentración inferior a 5 mg/ml. Como se puede observar en la Figura 2.22, las muestras citadas en esta memoria también se ajustan bien a la citada función de calibrado, que muestra un crecimiento exponencial del valor de g_{ef} con el tamaño de la partícula asumiendo una morfología equidimensional. Obviamente, dado el carácter exponencial de la función la sensibilidad es mayor para muestras con NPs de mayor tamaño. Pero esta mayor sensibilidad tiene también su contrapartida,

²⁹ Salado, J.; Insausti, M.; Lezama, L.; Gil de Muro, I.; Goikolea, E., Rojo, T. *Chem. Mater.* 23 (2011): 2879-2885.

para estas muestras el efecto de la dispersión de tamaños se traduce en un ensanchamiento de la línea resonante mucho más acusado que para partículas pequeñas. Ello a su vez repercute en la precisión con que puede calcularse el valor del campo resonante y por tanto hace que las desviaciones respecto del comportamiento teórico se acrecienten con el tamaño de las nanopartículas.

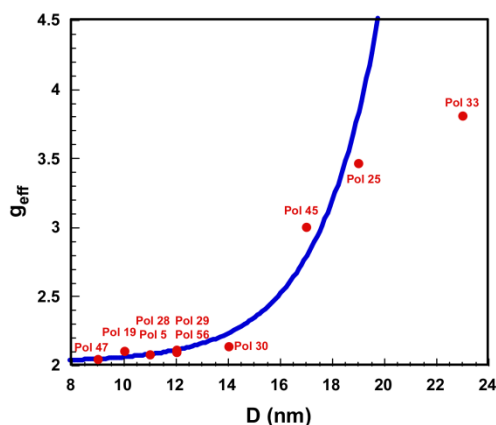


Figura 2.22. Correlación entre el valor de g_{eff} y el diámetro de partícula para las muestras representativas citadas en la Memoria.

La correlación esperada entre las anchuras de línea ΔH_{pp} y las dispersiones de tamaños obtenidas por TEM, no es tan buena como cabría esperar en todos los casos, y se desvía especialmente para la muestra Pol 47. Esta falta de acuerdo no se detecta habitualmente con las partículas más pequeñas, pero se hace más evidente cuanto mayores son las NPs. Teniendo en cuenta este hecho, y que no siempre es posible realizar las medidas de TEM y RME en un breve intervalo de tiempo, consideramos que esta discordancia proviene de la aglomeración de las NPs que tiende a producirse con el paso del tiempo, especialmente si el porcentaje de materia orgánica presente no es muy elevado. Igualmente, hemos constatado que pasado un valor de diámetro crítico (≈ 20 nm), las partículas tienden a precipitar y los resultados ya no resultan comparables.

También hay que tener en cuenta, para partículas con un diámetro superior a un tamaño crítico (≈ 20 nm), se observa habitualmente que las partículas tienden a precipitar mientras se realizan las medidas y por tanto los

resultados dejan de ser comparables. En este sentido, puede observarse en la Figura 2.23 cómo se va modificando la señal de RME de la muestra Pol 25 cuando se realizan medidas de forma continua. Inicialmente se observan dos señales a campos resonantes bien diferenciados, 2000 y 3200 Gauss aproximadamente, pero a medida que se van realizando barridos, la señal de campo alto tiende a desaparecer, mientras que la señal de campo bajo, que corresponde a las NPs de mayor tamaño, se ensancha.

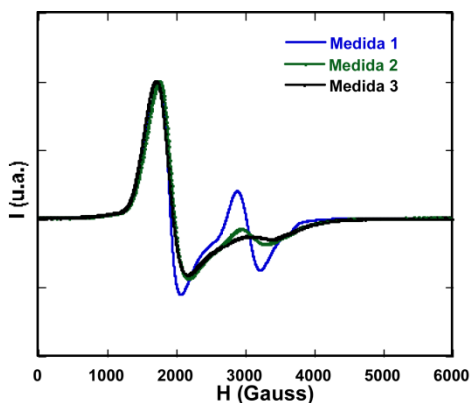


Figura 2.23. Evolución de la señal RME para la muestra Pol 25 en tres medidas consecutivas realizadas a intervalos de 3 minutos.

Lo que está ocurriendo es un fenómeno indeseado, pero de gran importancia porque podría producirse también en la aplicación de este tipo de partículas en un tratamiento de hipertermia magnética: Desestabilizadas por la aplicación del campo, las NPs van precipitando alineadas con éste. La pérdida de estabilidad de la dispersión que induce el campo magnético se produce vía el reforzamiento de las interacciones dipolares, que favorece la aglomeración de las partículas cuando éstas son de mayor tamaño.

II.8. Magnetometría

Los estudios de RME han permitido, además de analizar la homogeneidad y tamaño de las muestras preparadas, llevar a cabo una caracterización magnética previa de las muestras. No obstante, dado que el objetivo final del trabajo es emplear los materiales preparados en terapias de hipertermia, es necesario desarrollar un estudio más profundo de sus propiedades magnéticas. Para ello se ha recurrido a la realización de medidas de imanación frente al campo magnético, $M(H)$ y temperatura, $M(T)$, realizando estas últimas tanto sobre muestras enfriadas en presencia de campo magnético como en ausencia de éste, ZFC/FC. Además, como en el caso de las medidas de RME, se han ensayado diferentes “formatos” de muestra: polvo, dispersión, deposición en papel de filtro,... para tratar de obtener información verdaderamente reproducible. Dado el elevado coste de este tipo de medidas, obviamente no se han llevado a cabo sobre todas y cada una de las muestras preparadas, sino que para estos estudios se han seleccionado aquellos materiales que en los análisis de TEM y RME presentaban mayor homogeneidad y distribuciones de tamaño más estrechas: Pol 25, Pol 28, Pol 29, Pol 30, Pol 32, Pol 33, Pol 45, Pol 47 y Pol 56.

Las medidas de imanación en función del campo aplicado $M(H)$ de las muestras en polvo se han realizado en un magnetómetro de muestra vibrante VSM comercial de Cryogenic Ltd, equipado con un imán superconductor de 14 T y con un intervalo de temperatura accesible de 2 a 300 K. En este equipo se han registrado también las medidas FC/ZFC de las muestras en polvo entre 5 y 300 K. Para la medida de los ciclos de histéresis, a temperatura ambiente, de las muestras más concentradas se ha podido emplear un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) no comercial equipado con un electroimán que proporciona un campo máximo de 1,8 T. Este equipo permite una excelente resolución a bajos campos y se ha empleado, fundamentalmente, para determinar con precisión la existencia o la ausencia de remanencia y campo coercitivo de dichas muestras. Las medidas ZFC/FC de las muestras diluidas se han llevado a cabo con un magnetómetro SQUID comercial (MPMS-7) de

Quantum Design, equipado con un imán superconductor de 7 T. Las características de estos equipos se detallan en el Anexo A.9.

A continuación se describirán los resultados más relevantes obtenidos para las diferentes muestras, comenzando por la descripción de las medidas $M(H)$ para posteriormente comentar las curvas ZFC/FC.

En la Figura 2.24 se representan los ciclos de imanación frente al campo aplicado obtenidos a temperatura ambiente para los materiales seleccionados. Para estas medidas se emplearon muestras sólidas trituradas en un mortero. Se puede observar como el comportamiento de todas las fases medidas es muy parecido. Así, dentro del error experimental (~ 1 Oe), se obtienen valores nulos del campo coercitivo y de la imanación remanente, lo que informa de un comportamiento magnético de tipo *superparamagnético* a temperatura ambiente. Recordemos que esto no parecía ocurrir en las medidas de RME, pero hay que tener en cuenta que la escala de tiempo de este experimento es mucho mayor que la de la RME, por lo que las partículas pueden reorientar sus momentos antes de que la medida se realice.

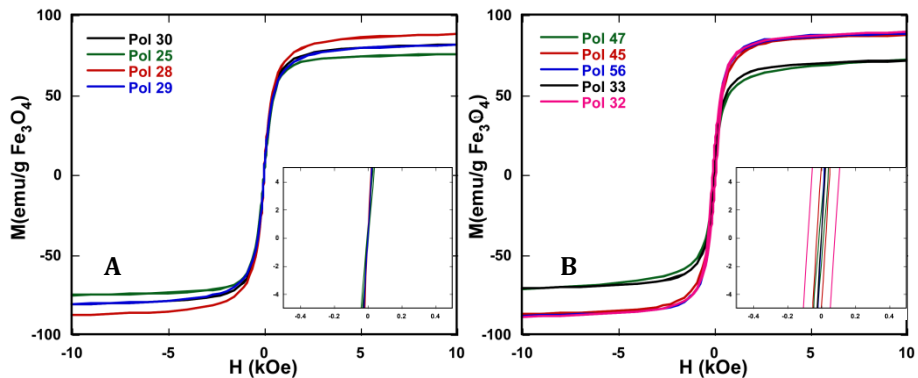


Figura 2.24. Ciclos de histéresis a RT para las muestras Pol 25, Pol 28, Pol 29 (A) y Pol 33, Pol 42, Pol 45, Pol 47 y Pol 56 (B).

Se observa así mismo, que, incluso a temperatura ambiente, la imanación alcanza valores cercanos a la saturación a campos moderadamente bajos (< 5 kOe), en consonancia con las propiedades ferrimagnéticas de la magnetita.

La imanación de saturación a 300 K de las muestras analizadas, cuyos valores se presentan en la Tabla 2.7, oscila entre 72 y 91 emu/g Fe_3O_4 , aproximándose notablemente en la mayor parte de los casos al valor correspondiente a la magnetita en estado masivo (92 emu/g Fe_3O_4 ³⁰). Estos altos valores de saturación son indicativos de la gran pureza y excelente cristalinidad de la fase magnetita obtenida mediante el método de preparación utilizado, como ya se dedujo de las medidas de TEM³¹.

Esta conclusión se sustenta también en las medidas efectuadas a baja temperatura (5 K) y con campos intensos (100 kOe), un ejemplo de las cuales se presenta en la Figura 2.25 (el resto se presenta en el Anexo C.3).

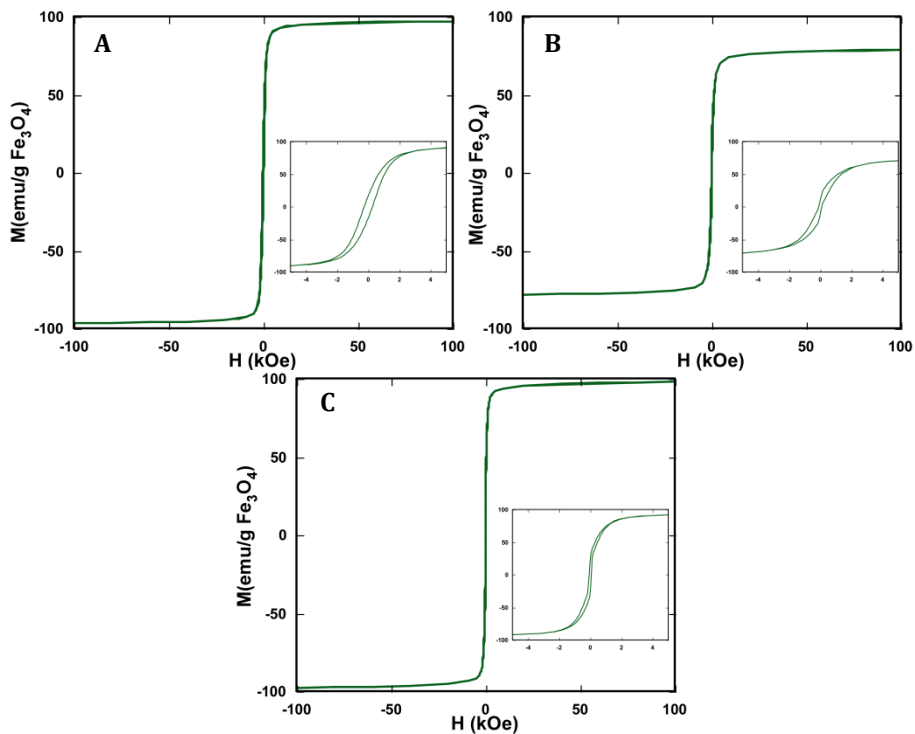


Figura 2.25. Ciclos de histéresis a 5 K para la muestra Pol 25 (A), Pol 47 (B) y Pol 56 (C) medidas hasta 100 kOe.

³⁰ Cullity, B. D.; Graham, C. D, *Introduction to Magnetic Materials*, 2nd ed. (Piscataway, New Jersey: Wiley-IEEE Press, 2011).

³¹ Batlle, X.; Pérez, N.; Guardia, P.; Iglesias, O.; Labarta, A.; Bartolomé, F.; Garca, L. M.; Bartolomé, J.; Roca, A. G.; Morales, M. P.; Serna, C. J. *J. App. Phys.*109, no. 7 (2011): 7-13.

Caracterización

Es relevante que la susceptibilidad en campos altos es aproximadamente nula (saturación completa), lo que descarta la presencia de un porcentaje significativo de otras fases de óxidos de hierro no ferrimagnéticos o de partículas muy pequeñas de magnetita. Por otra parte, el decrecimiento de la imanación de saturación que se produce al pasar de 5 a 300 K, es de alrededor del 10-12 % en todos los casos. Estos valores son netamente superiores a los que se producen con la magnetita en estado masivo, (6%) pero son del orden de los que se observan habitualmente en sistemas nanoparticulados³². Este fenómeno, típicamente asociado a los efectos de tamaño finito, suele ser en general más intenso en sistemas compuestos de partículas de menor tamaño, debido a la mayor influencia relativa de la región superficial³³.

Tabla 2.7. Valores de la imanación de saturación, imanación remanente reducida, campo coercitivo, temperatura de bloqueo y tamaño de partícula, determinado por TEM, para algunas muestras representativas.

MUESTRA	D (nm)	Ms(emu/g) RT	Ms(emu/g) 5K	Hc(kOe) 5K	Mr/Ms	<T _B (K)>
Pol 25	19±2	76,4	91,8	0,36	0,60	-
Pol 28	11±4	89,1	91,4	0,28	0,45	46
Pol 29	12±3	82,2	91,2	0,29	0,56	38
Pol 30	14±5	82,4	87,4	0,35	0,48	50
Pol 32	10-40	91,0	91,3	-	-	-
Pol 33	23±4	72,1	77,9	0,36	0,38	-
Pol 45	21±5	88,4	90,4	0,33	0,56	-
Pol 47	9±1	75,2	78,5	0,29	0,30	81
Pol 56	12±3	89,1	91,8	0,45	0,45	75

De igual manera a como sucede en el caso de la RME, la forma física de la muestra puede influir de forma importante en los resultados obtenidos. Así, la forma precisa del ciclo de histéresis a 5 K o de las curvas M(H) a RT, que están determinadas por los procesos de imanación de las partículas del sistema, dependen, en general, del tipo de preparación de la muestra y más en particular del grado de dilución de las nanopartículas. La comparación entre

³² Can, M. M.; Coşkun, M.; Firat, T. *J. Nanopart. Res.* 13, no. 10 (2011): 5497–5505.

³³ Mandal, K.; Mitra, S.; Kumar, P. A. *Europhys. Lett.* 75 (2006) 618–623.

los valores aportados por diferentes técnicas y/o autores debe ser realizada con mucha precaución, dado que la importancia relativa de las diferentes contribuciones magnéticas presentes condiciona los resultados.

Teniendo en cuenta que pretendemos correlacionar los resultados de las diferentes técnicas empleadas en la caracterización de los sistemas con su capacidad de absorción de energía en los experimentos de hipertermia, conviene que el estado de dilución sea similar en todos los casos. Por este motivo, para la determinación del campo coercitivo y de la imanación remanente, cuyos valores son susceptibles de ser analizados con más detalle, se ha tratado de realizar las medidas con las muestras en un estado físico que asegure la dilución, pero al mismo tiempo mantenga aproximadamente inalterada la distancia interparticular promedio y evite la reorientación física, característica de las partículas en estado líquido, que dificulta la interpretación de los experimentos. Se ensayaron diferentes formas de “congelar” la disposición que presentan las nanopartículas magnéticas en el momento en que sus momentos son volteados en un experimento de RME, y finalmente nos decantamos por la realización de medidas sobre muestras preparadas mediante la absorción de los coloides originales en papel secante. En la Figura 2.26 se presentan varios ciclos de histéresis registrados a 5 K con las muestras preparadas mediante este procedimiento. Se ha representado la imanación reducida (M/M_s) en el eje vertical para facilitar la comparación.

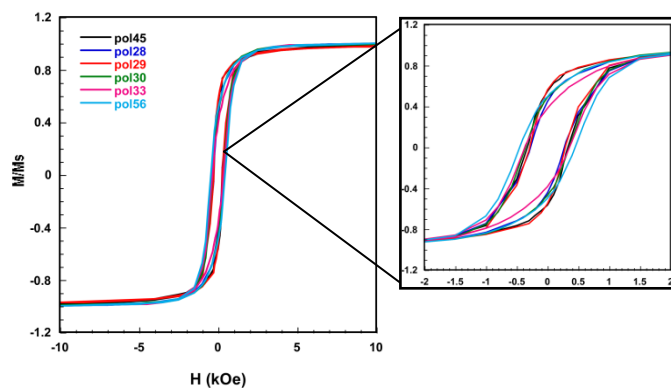


Figura 2.26. Ciclos de histéresis registrados a 5 K para las muestras Pol 28, Pol 29, Pol 30, Pol 33, Pol 45 y Pol 56.

La conclusión más relevante que puede deducirse casi inmediatamente es que el comportamiento de todas las muestras es muy semejante. Así por ejemplo, las muestras Pol 28, Pol 29, Pol 30 y Pol 45 presentan ciclos casi superpuestos, con valores muy similares del campo coercitivo y de la imanación remanente reducida, en torno a 300 Oe el primero y a 0,5 la segunda (los datos de cada muestra se presentan en la Tabla 2.6).

La interpretación de estos datos parece clara en el caso de la imanación remanente: en sistemas de partículas formados por monodominios magnéticos orientados al azar, la teoría de Stoner-Wohlfart³⁴ predice que dicho valor es igual a 0,5 para el caso de sistemas con anisotropía uniaxial, lo que está en buen acuerdo con los resultados obtenidos.

Por otra parte, según ese mismo modelo, el campo coercitivo depende de la imanación de saturación M_s , de la constante de anisotropía uniaxial K , de la temperatura T y de la temperatura de bloqueo T_B (o el volumen de la nanopartícula en su caso), a través de la siguiente expresión³⁵:

$$H_c = 0,48 \frac{2K}{M_s} \left(1 - \left(\frac{T}{T_B} \right)^n \right) \quad (2.3)$$

donde el exponente n se aproxima a 0,8 para partículas orientadas completamente al azar³⁶. Dado que en el caso de nuestras muestras, la imanación de saturación M_s no cambia significativamente más allá del posible error experimental y los esperados efectos de tamaño y agregación, el campo coercitivo H_c debe depender básicamente de la anisotropía y de la razón entre la temperatura de medida y la de bloqueo. Una estimación independiente de K a partir de las medidas de ZFC/FC nos permitirá, posteriormente, determinar la aplicabilidad de este modelo sencillo. Es de suponer, de todas formas, que la influencia de las interacciones interparticulares no sea despreciable,

³⁴ Stoner, E. C.; Wohlfarth, E. P. *Phil. Trans. Roy.Soc. A*-240, no. 4 (1948): 599-642.

³⁵Knobel, M.; Nunes, W. C.; Socolovsky, L. M.; De Biasi, E.; Vargas, J. M.; Denardin, J. C. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8, no.6 (2008): 2836-2857.

³⁶(a)Carrey, J.; Mehdaoui, B.; Respaud, M. *J. Appl. Phys.* 109, no. 8 (2011): 1-17.(b) Porto, M.; Rivas, J.; Bunde, A. *J. Appl. Physics* 85, no. 4 (1999): 2287-2292.

teniendo presente los muy diversos grados de aglomeración y de dispersión de tamaños que se observan en las imágenes de TEM³⁷.

En la Tabla 2.7 se han recogido los valores de los parámetros magnéticos más importantes M_s , M_r reducida y H_c , determinados a RT y a 5 K, junto con el tamaño medio de las partículas determinado por TEM, y la temperatura de bloqueo promedio obtenida de las medidas de ZFC/FC, tal y como se discute a continuación.

Las medidas ZFC/FC se realizaron en las muestras depositadas sobre papel secante aplicando un campo constante de 10 Oe, esto es, suficientemente pequeño respecto del campo de anisotropía intrínseco de las partículas que, en general, se puede considerar del orden de los 1000 Oe. Dichas medidas se realizaron sobre las mismas preparaciones de las muestras dispersadas en tolueno empleadas en RME y fijadas en papel de filtro, con objeto de tratar de reducir las interacciones dipolares y poder obtener temperaturas de bloqueo más fiables. Así, depositando un pequeño volumen de dispersión sobre un trozo de papel de filtro, las partículas se fijarían sobre el papel sin aglomerarse y, por tanto, sin que hubiera lugar a la aparición de interacciones dipolares importantes. Evidentemente, el método implica la introducción de una importante anisotropía de forma, pero ésta puede minimizarse si el campo externo se aplica sobre el plano del papel. Los resultados obtenidos para muestras sintetizadas con ambos precursores se representan en la Figura 2.27. Los valores de imanación se han normalizado en función del máximo de las curvas FC a fin de comparar más fácilmente los comportamientos presentados por los diferentes materiales

Es bien sabido que la posición del máximo de la curva ZFC es muy sensible al campo aplicado en los procesos de relajación ferro-superparamagnética (FM-SPM) en sistemas de partículas con interacciones. Por este motivo, en determinados casos puntuales las medidas se repitieron con campos más intensos (100 Oe) con el objeto de discriminar entre este tipo de procesos FM-SPM y otros como la transición de Verwey característica de

³⁷ Farrell, D.; Cheng, Y.; McCallum, R. W.; Sachan, M.; Majetich, S. A. *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005): 13409–13419.

la magnetita, cuya posición es poco sensible al campo de medida y cuya posible existencia puede dificultar la interpretación de estas curvas.

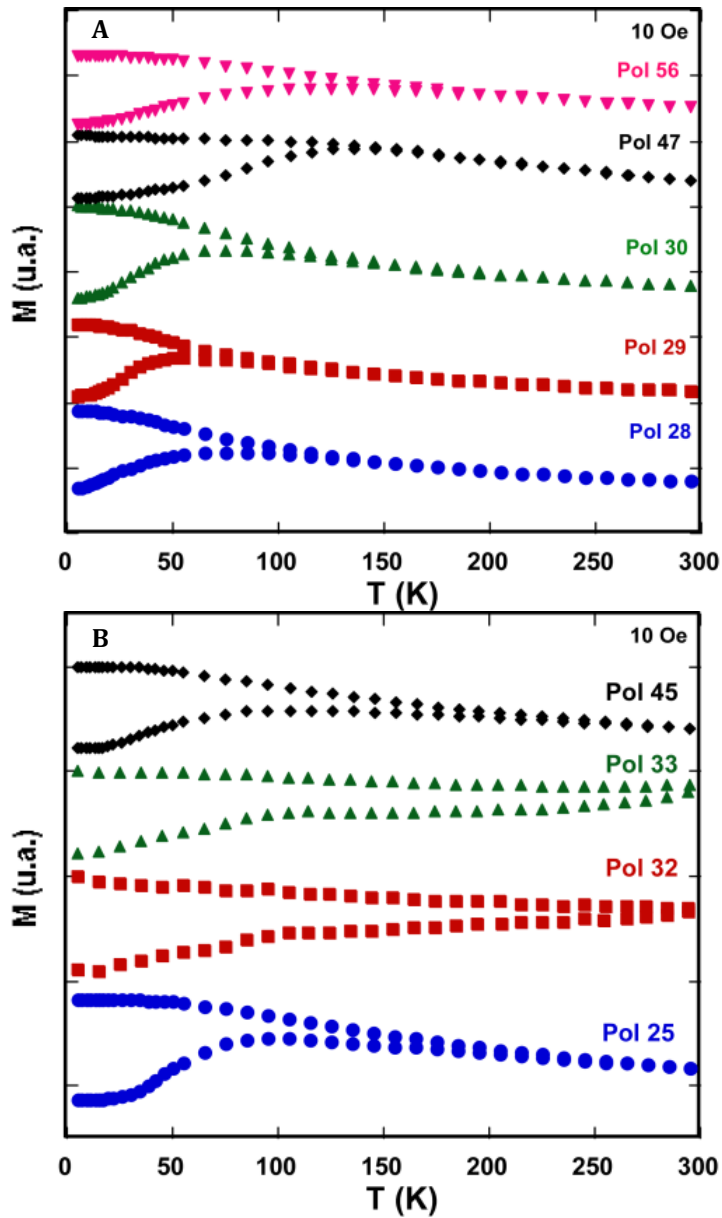


Figura 2.27. Curvas ZFC/FC normalizadas para las muestras Pol 28, Pol 29, Pol 30, Pol 47, Pol 56 (A) y Pol 25, Pol 32, Pol 33, Pol 45 (B).

La Figura 2.27. A agrupa las medidas sobre las muestras compuestas por nanopartículas de menos de 15 nm en promedio (Pol 28, Pol 29, Pol 30, Pol 47 y Pol 56) y las de la Figura 2.27. B son aquellas cuyo tamaño medio se aproxima o supera los 20 nm (Pol 25, Pol 32, Pol 33, y Pol 45). Se pretende, de este modo, diferenciar los sistemas de partículas cuyo tamaño medio se encuentra, en principio, claramente por debajo del límite superparamagnético a temperatura ambiente, de aquellos otros compuestos de partículas más grandes. Dicho límite o diámetro crítico se puede estimar mediante la expresión $V_C = 25k_B T/K$, asumiendo un valor razonable de la constante de anisotropía ($K \sim 20 \text{ kJ/m}^3$)³⁸. El dato resultante, en torno a los 20 nm, es similar al que indican gran número de experimentos en la bibliografía³⁹.

Los datos obtenidos del TEM, sugieren solo ligeras diferencias de tamaño promedio entre la muestras sintetizadas a partir del pentacarbonilo de Fe (consecutivamente Pol 28, Pol 29 y Pol 30), así como amplias dispersiones de tamaño (particularmente en la muestra Pol 30). Las curvas correspondientes de la Figura 2.27.A, están de acuerdo con este esquema: la histéresis térmica o irreversibilidad de las ramas FC y ZFC llega hasta unos 150 K, y la distribución de barreras de energía o temperaturas de bloqueo es moderadamente alta (Anexo C.3). En este grupo de muestras, los valores promedio $\langle T_B \rangle$ están sobre los 40-50 K y no muestran una correlación clara con el diámetro medio obtenido mediante el TEM. Las muestras Pol 47 y Pol 56, sintetizadas mediante $\text{Fe}(\text{acac})_3$, presentan temperaturas de bloqueo algo más elevadas, con un promedio próximo a los 80 K. Estas diferencias parecen más relacionadas con distintos grados de ensamblaje o aglomeración, tal y como se percibe en la imágenes de TEM. A este respecto, hay que recordar que el incremento de la interacción dipolar conlleva, en general, un desplazamiento de las temperaturas de bloqueo a valores más elevados⁴⁰.

A partir de los datos de $\langle T_B \rangle$ extraídos de estas medidas, tal y como se explica en el Anexo A.9, se puede estimar una constante de anisotropía

³⁸ Wang, J.; Duan, H.; Lin, X.; Aguilar, V.; Mosqueda, A. *J. Appl. Phys.* 112 (2012): 5–9.

³⁹ Thakur, M.; De, K.; Giri, S.; Si, S.; Kotal, A.; Mandal, T. K. *J. Phys.* 20, no. 14 (2008): 149801–149801.

⁴⁰(a) Saifit, A.; Dormann, J. L.; Fiorani, D.; Renaudint, P.; Jové, J. *J. Phys. C* 21 (1988) 5295–5315. (b) Dormann, J. L.; Fiorani, D.; Tronc, E., *Advances in Chemical Physics* 96 (1997): 283.

Caracterización

efectiva a partir de la expresión $K = 25k_B T_B / V$. Los valores obtenidos para las muestras Pol 28 y Pol 29 con una distribución de tamaños muy simétrica, en torno a los 11-12 nm, son aproximadamente 23 y 15 kJ/m³. Estos valores de la constante de anisotropía son congruentes con los mostrados en otros trabajos y, permiten obtener unos valores para el campo coercitivo según el modelo de Stoner y Wohlfarth³⁴ (Ecuación 2.3) que resultan ser muy similares (250 y 265 Oe) a los experimentales (270 y 290 Oe, en estas dos muestras). En el caso de la muestra Pol 30 el cálculo da un valor muy alejado del experimental (40 Oe), pero en este caso la distribución de tamaños presenta claros signos de bimodalidad y la estimación del campo coercitivo solo es aplicable a sistemas con distribuciones simples. En la muestra Pol 56 los datos calculados son también compatibles con los experimentos: una temperatura de bloqueo promedio $\langle T_B \rangle$ de 75K conduce a una K de 24 kJ/m³ y a un campo coercitivo de 460 Oe, similar al experimental de 450 Oe. Valores muy similares de K se obtienen en la muestra Pol 47 que, en este caso, lleva a un valor del campo coercitivo similar al anterior y claramente superior al experimental (330 Oe).

Como se ha comentado previamente, las muestras representadas en la Figura 2.27.B están compuestas de partículas más grandes (≥ 20 nm). En el caso de las muestras Pol 32 y Pol 33 se observa, claramente, que la temperatura de bloqueo está por encima de ambiente, puesto que las dos ramas ZFC y FC se separan en todo el intervalo de temperaturas. El incremento de la imanación en la curva ZFC desde 0 hasta 100 K, donde se produce un cambio de pendiente, está relacionado con la transición de Verwey de la magnetita⁴¹. Aunque el estudio de esta transición está fuera de los objetivos del presente estudio, baste decir desde el punto de vista del magnetismo, que esta transición implica un incremento de la anisotropía magnetocristalina a bajas temperaturas consecuencia de una deformación

⁴¹ (a) Nikiforov, V. N.; Koksharov, Y. A.; Polyakov, S. N.; Malakho, A. P.; Volkov, A. V.; Moskvina, M. A.; Khomutov, G. B.; Irkhin, V. *Journal of Alloys and Compounds* 569 (2013): 58–61. (b) Wang, J.; Chen, Q.; Li, X.; Shi, L.; Peng, Z.; Zeng, C. *Chem. Phys. Lett.* 390, no. 1–3 (2004): 55–58. (c) Salazar, J. S.; Perez, L.; Abril, O.; Phuoc, L. T.; Ihiawakrim, D.; Vazquez, M.; Greneche, J. M.; Begin-Colin, S.; Pourroy, G. *Chem. Mater.* 23 (2011): 1379–1386.

ortorrómbica⁴². Hemos constatado que la forma de la curva es muy similar a otras medidas de partículas de magnetita biomineralizadas, de alta pureza que se encuentran en la literatura, apreciándose incluso un hombro más débil sobre los 50K, que también es característico de este tipo de partículas de magnetita, cuya pureza es muy alta y difícil de igualar por cualquier procedimiento de laboratorio.

En este contexto, el máximo que se observa en las muestras Pol 25 y Pol 45 no ha de interpretarse como producto de la relajación superparamagnética, sino como una temperatura de transición de la estructura cristalina. El hecho de que aparezca a temperaturas inferiores en estas dos muestras puede estar relacionado con pequeñas variaciones de estequiometría (defecto de oxígeno) respecto a las anteriores, puesto que tal parámetro se ha postulado como determinante en la posición de la transición en otros estudios⁴³. En el caso de la muestra Pol 25, la existencia real de esta transición se aprecia mejor cuando la medida se realiza a campos más intensos (100 Oe). Se observa, además, que la forma de la curva obtenida adquiere un aspecto muy similar a las mostradas en las muestras Pol 32 y Pol 33 (Figura 2.28).

⁴² Fdez-Gubieda, M. L.; Muela, A.; Alonso, J.; García, A.; Barandiarán, M.; Ferná, R. *ACS Nano* 7, no. 4 (2013): 3297–3305.

⁴³ Shepherd, J. P.; Aragan, R.; Koenitzer, J. W.; Honig, J. M. *Phys. Rev. B* 32, no. 3 (1985): 1818–1819.

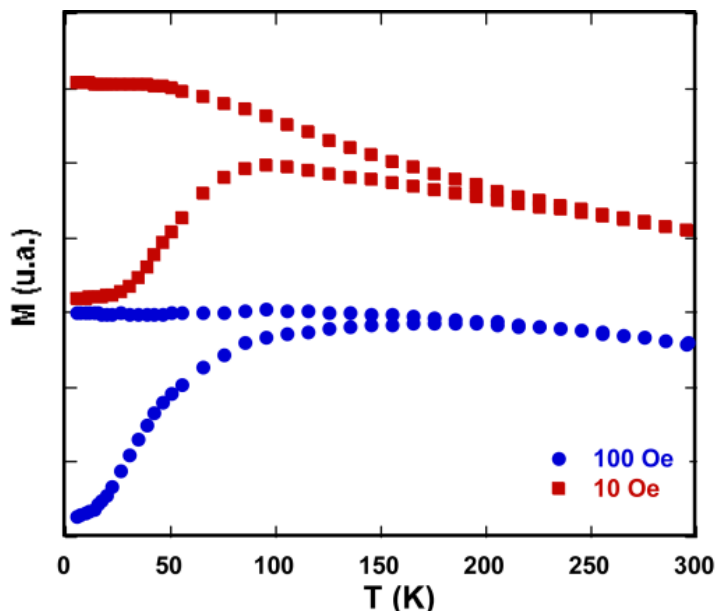


Figura 2.28. Curvas ZFC/FC de la muestra Pol 25 a campos bajos (10 Oe) y altos (100 Oe) donde se comprueba que el máximo correspondiente a la transición de Verwey no se desplaza con el campo.

La presencia de esta transición nos permite garantizar la alta pureza de la fase magnetita obtenida mediante estos métodos de preparación, puesto que, hasta la fecha, dicha transición no se ha observado de forma tan clara en partículas obtenidas mediante métodos químicos en el laboratorio.

Finalmente, cabe destacar que el análisis de las curvas magnéticas ha proporcionado información útil sobre la naturaleza de las muestras. Las medidas realizadas sobre papel de filtro han permitido observar que el grado de agregación de las partículas en dispersión acuosa no es el mismo para todas las muestras, pero puede minimizarse hasta estados prácticamente no interaccionantes.

II.9. Hipertermia Magnética

En este apartado se presentan los resultados de las medidas de absorción de energía magnética que se han realizado con varios de los sistemas de partículas descritos en los apartados precedentes.

En principio, cualquier material magnético sometido a la acción de un campo alterno de frecuencia suficientemente alta absorbe parte de la energía de ese campo y la transforma en calor. En el caso de las nanopartículas magnéticas monodominio, los mecanismos físicos que permiten esa absorción de energía se deben tanto a la rotación del momento dentro de la partícula, *relajación de Neel*, como a la rotación de la propia partícula respecto del eje del campo aplicado cuando se encuentra en un medio líquido, *relajación Browniana*. El parámetro habitualmente empleado para cuantificar la eficacia de ambos mecanismos es el llamado SAR o *índice específico de absorción (Specific Absorption Rate)*⁴⁴.

Cualquiera de estas dos variables mide la cantidad de energía transformada en calor por unidad de tiempo y masa, y viene dada por: $SAR \left(\frac{W}{g}\right) = P \left(\frac{W}{cm^3}\right) / \rho \left(\frac{g}{cm^3}\right)$. Para poder comparar los resultados obtenidos con coloides de diferente concentración de nanopartículas NP, la masa considerada es la correspondiente al componente magnético responsable de la absorción de energía, g_{NP} , por lo que el SAR se da en W/g_{NP} . Si la medida del SAR es puramente calorimétrica, la cantidad de potencia transformada en calor por gramo de coloide es simplemente $C(\Delta T/\Delta t)$, donde C (J/g·K) es el calor específico del medio (4,18 J/g K para dispersiones acuosas y 1,72 J/g K para dispersiones en tolueno) y $\Delta T/\Delta t$ es la pendiente inicial de la curva de calentamiento. Basta conocer, en este caso, la concentración x de partículas magnéticas en el coloide y la densidad del disolvente ρ_{dis} para calcular el SAR como $(xC/\rho_{dis})x(\Delta T/\Delta t)$.

El SAR es un parámetro que mide la eficacia para la absorción de energía magnética (base de la hipertermia) en términos absolutos, con independencia de la amplitud y/o frecuencia de la excitación empleada. Por

⁴⁴ Laurent, S.; Dutz, S.; Häfeli, U.; Mahmoudi, M. *Adv. Colloid Int. Sci.* 166, no. 1 (2011): 8–23.

este motivo y para facilitar la comparación entre resultados obtenidos con distintas excitaciones se ha propuesto la definición de una nueva magnitud, ILP (Intrinsic Loss Power o *pérdida de potencia intrínseca*) cuyo valor da idea de la potencia de absorción por “unidad” de excitación considerando como tal el producto de la frecuencia por el cuadrado de la amplitud del campo excitador ($f \times H^2$)⁴⁵. La razón para ello se fundamenta en el hecho de que la potencia magnética absorbida por un material cuya imanación crece linealmente con el campo aplicado es proporcional a $f \times H^2$ y, en consecuencia, el ILP es un valor constante e independiente de la frecuencia y el campo aplicado. En esta memoria los resultados más relevantes se darán tanto en unidades de SAR (W/g_{NP}) como de ILP (nHm^2/kg), para facilitar la comparación con otros datos previamente publicados en la literatura para este tipo de muestras.

La medida del aumento de temperatura en un determinado intervalo de tiempo es una medida directa, pero requiere un cuidado minucioso de las condiciones de medida (distribución geométrica del campo generado, posición de la muestra, sensor de temperatura no inductivo, aislamiento térmico, etc.). Sin embargo, el valor de SAR también puede ser obtenido de manera más segura de forma indirecta, calculando la potencia absorbida, P , como el producto del área del ciclo de histéresis generado durante un ciclo del campo excitador por su frecuencia, para lo que se necesita un trazador de ciclos de histéresis capaz de trabajar a las frecuencias requeridas en los experimentos de hipertermia (50-1000 kHz, habitualmente). Este procedimiento es ventajoso porque es mucho más sensible y preciso que el calorimétrico y permite obtener más información sobre las propiedades magnéticas de un material en concreto. Es por ello que en esta investigación los valores de SAR se han obtenido a partir de la medida de los ciclos de histéresis en un equipo diseñado en el departamento de Electricidad y Electrónica de la Facultad de Ciencia y Tecnología de UPV/EHU y descrito en el Anexo A.10⁴⁶.

⁴⁵ Pankhurst, Q.A.; Connolly, J.; Ones, S.K.; Dobson, J. J. *Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003): 167–181.

⁴⁶ Garaio, E.; Collantes, J. M.; Plazaola, F.; Garcia, J. A.; Castellanos-Rubio, I. *Measurement Science and Technology* 25, no. 11 (2014): 115702.

Las investigaciones en el campo de la hipertermia han revelado que tanto nanopartículas que exhiben histéresis⁴⁷ en una medida DC (FM), como nanopartículas que no lo hacen (SPM en condiciones de medida DC)⁴⁸ pueden producir valores altos de SAR. Los materiales ferromagnéticos duros precisan de campos magnéticos del orden de $100 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ o mayores para alcanzar la saturación. Teniendo en cuenta que debido a la limitación instrumental en el rango de frecuencias empleadas en un experimento típico (100-900 kHz), sólo se alcanzan campos de unas pocas decenas de $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$, para la generación de calor solamente se podrían explotar ciclos menores. Es por ello, que tanto en nanopartículas monodominio FMs como SPMs se requieren permeabilidades altas para obtener buenos valores de imanación a campos bajos. Varios estudios recientes proponen diversos tamaños de partícula óptimos para maximizar el SAR en función de la excitación empleada y del tipo de material magnético, fundamentalmente de sus valores de anisotropía magnética.

Para el análisis de los resultados obtenidos, se han seleccionado aquellas muestras que presentan una menor dispersión de tamaños, debido tanto a que dentro de cada grupo son las que mejor resultado han proporcionado⁷, como al hecho de que permiten un análisis más fiable de la correlación entre estos resultados y las propiedades magnéticas y morfológicas de la nanopartículas. En el caso del grupo sintetizado a partir del pentacarbonilo de Fe, las muestras presentan distribuciones estrechas de tamaños, una alta cristalinidad y homogeneidad, y permiten analizar el comportamiento de un espectro de tamaños importante: de 9 a 23 nm.

En la Figura 2.29.A se representan los valores de SAR de las muestras Pol 25, Pol 28, Pol 29, Pol 30, Pol 33, Pol 45 y Pol 47 en dispersión de tolueno en función de la amplitud del campo excitador (a una frecuencia de

⁴⁷ (a) Verde, E. L.; Landi, G. T.; Gomes, J. A.; Sousa, M. H.; Bakuzis, A. F. *J. Appl. Phys.* 111, no. 12 (2012): 49–56. (b) Ketharnath, D.; Pande, R.; Xie, L.; Srinivasan, S.; Godin, B.; Wosik, J. *Appl. Phys. Lett.* 101, no. 8 (2012): 2–5.

⁴⁸ (a) Liu, X. L.; Fan, H. M.; Yi, J. B.; Yang, Y.; Choo, E. S. G.; Xue, Jun M.; Fan, Dai Di; Ding, J. *J. Mater. Chem.* 22, no. 17 (2012): 8235. (b) Mehdaoui, B.; Meffre, A.; Carrey, J.; Lachaize, S.; Lacroix, L. Marie; Gougeon, M.; Chaudret, Bruno; Respaud, M. *Advanced Functional Materials* 21, no. 23 (2011): 4573–4581. (c) Piñeiro-Redondo, Y.; Bañobre-López, M.; Pardiñas-Blanco, I.; Goya, G.; López-Quintela, M. A.; Rivas, J. *Nanoscale Research Letters* 6, no. 1 (2011): 383.

532 kHz)⁴⁹. Se observa que la absorción de potencia aumenta de forma no lineal con el campo en todos los casos y se aprecian grandes diferencias entre las muestras, desde valores de SAR aproximadamente nulos (Pol 47) hasta máximos de 640 W/g_{NP} en el caso de la muestra Pol 25 para un campo de 14 kA/m. Estas enormes diferencias se pueden correlacionar con el diámetro promedio de las partículas de los diversos sistemas, como se muestra en la Figura 2.29.B, donde se representan los valores de SAR correspondientes a 14 kA/m en función del diámetro promedio. Se observa la existencia de un máximo para un diámetro dado que, en nuestro caso, coincide con la muestra de 19 nm. La existencia de un diámetro óptimo para una excitación de amplitud moderada se ha verificado experimentalmente en numerosos trabajos publicados en la literatura y se puede explicar, de forma simple, en el marco de la teoría de respuesta lineal (LRT, *Linear Response Theory*) como un fenómeno de resonancia: la frecuencia de excitación del campo AC se aproxima a la frecuencia“natural” del sistema que, en este caso, coincidiría con el inverso del tiempo de relajación de la imanación.

⁴⁹ (a) Lartigue, L.; Innocenti, C.; Kalaivani, T.; Awwad, A.; Sanchez Duque, M. M.; Guari, Y.; Larionova, J.; Guefrin, C.; Montero, J. L.G.; Barragan-Montero, V.; Arosio, P.; Lascialfari, A.; Gatteschi, D.; Sangregorio, C. *J. Am. Chem. Soc.* 133, no. 27 (2011): 10459–10472.(b) Thomas, L.; Dekker, L.; Kallumadil, M.; Southern, P.; Wilson, M.; Nair, S. P.; Pankhurst, Q. A.; Parkin, I. P. *J. Mater. Chem.* 19 (2009): 6529–6535.

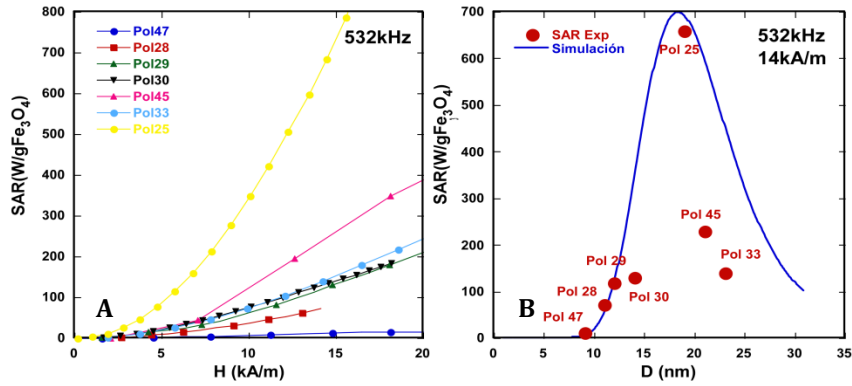


Figura 2.29. SAR en función de la amplitud de excitación AC a 532 kHz de las muestras Pol 25, Pol 28, Pol 29, Pol 30, Pol 33, Pol 45 y Pol 47 (A). SAR en función del diámetro promedio de las siete muestras, para una frecuencia de 532 kHz y un campo aplicado de 14 kA/m (B). La curva representa el cálculo del SAR mediante el modelo LRT, con un valor constante de $K=15 \text{ kJ/m}^3$ y de dispersión (0,15). La línea de trazo discontinuo sobre $D \approx 17,5 \text{ nm}$ representa el punto en el que los tiempos relajación de Neel y Brown son idénticos.

La curva que se representa superpuesta a los puntos experimentales en la Figura 2.29 se ha generado justamente mediante dicho modelo lineal (Anexo A.10) para unos valores muy concretos de la constante de anisotropía efectiva ($K=15 \text{ kJ/m}^3$), del recubrimiento orgánico de las partículas (6nm) y de la dispersión de tamaños (0,2 nm), supuestos iguales para todas las muestras. En la Figura 2.29.B se señala, así mismo, la posición de un diámetro “crítico” ($\approx 18 \text{ nm}$), que en este modelo establece la frontera entre procesos dinámicos dominados por la relajación de Neel ($\tau_N < \tau_B$, a la izquierda de la línea de trazo discontinuo) y aquellos en los que la rotación física de la partícula es el mecanismo dominante ($\tau_B < \tau_N$, a la derecha de dicha línea).

Dado que tanto el propio modelo LRT como los valores mencionados no son, en general, aplicables a todas las muestras descritas en la Figura 2.29.A, el acuerdo con nuestros datos experimentales no es perfecto, si bien los reproduce fielmente por debajo de los 20 nm. De hecho, cabe esperar una mayor discrepancia justamente en los sistemas con partículas de mayor tamaño, como se observa en la Figura 2.29.B, puesto que en éstos la susceptibilidad DC (a frecuencia muy bajas) no verifica en general el modelo

de Langevin y los resultados de DLS demuestran que tienden a formar aglomerados. Este hecho puede ser determinante puesto que por encima de los 18 nm, suponiendo una anisotropía de 15 kJ/m^3 , el proceso dominante de relajación de la imanación será de tipo browniano y por lo tanto muy sensible al radio hidrodinámico r_h ($\tau_B = 4\pi\eta r_h^3/k_B T$).

Las medidas se realizaron, en general, a tres frecuencias distintas y hasta campos máximos de unos 20 kA/m. Todos estos datos se pueden consultar en el Anexo C.4, y en este punto nos centraremos en el análisis más pormenorizado de tres muestras representativas del conjunto: Pol 25, en la se obtuvieron valores máximos de SAR, y otras dos muestras cuyo tamaño de partícula promedio las sitúa a la izquierda (Pol 29) y a la derecha (Pol 33) del máximo de la Figura 2.29.B⁵⁰.

En la Figura 2.30 se presentan los valores de SAR (A) e ILP (B) obtenidos en la muestra Pol 25 en función de la amplitud del campo excitador para tres frecuencias distintas, 1030, 532 y 149 kHz.

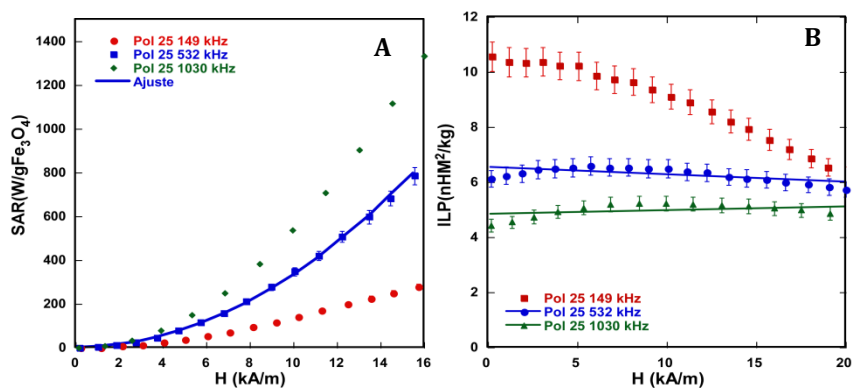


Figura 2.30. SAR de la muestra Pol 25 en tolueno frente a la amplitud de excitación, para tres frecuencias, 149, 532 y 1030 kHz (A). La línea continua corresponde con el ajuste según el modelo lineal para $K=17 \text{ kJ/m}^3$. ILP frente al campo para esas mismas tres frecuencias (B).

Los curvas de ILP en función del campo deberían colapsar a una línea recta de pendiente nula en el caso de una respuesta perfectamente lineal, y lo

⁵⁰ Liu, X. L.; Choo, E. S. G.; Ahmed, A. S.; Zhao, L. Y.; Yang, Y.; Ramanujan, R. V.; Xue, J. M.; Fan, D. D.; Fan, H. M.; Ding, J. *J. Mater. Chem. B* 2, no. 1 (2014): 120.

que se observa demuestra que esto solo es parcialmente cierto: son, en efecto, aproximadamente constantes a 532 y 1032 kHz, pero no a 149 kHz y los valores promedio dependen de la frecuencia del campo excitador (alrededor de 6,2 a 532 kHz y 5 a 1032 kHz, en nHm^2/kg). Centrándonos en una de estas curvas y realizando el ajuste al modelo LRT descrito anteriormente, se puede extraer un valor orientativo de la constante de anisotropía efectiva, incluyendo los datos de tamaño promedio y dispersión de tamaños obtenidos del TEM (Tabla 2.3). De dicho ajuste, que se superpone en la Figura 2.30.A con los datos experimentales, se obtiene un valor de $K=17 \text{ kJ/m}^3$. Este es un valor congruente con los deducidos de las medidas ZFC/FC en las muestras Pol 28 y Pol 29 (entre 21 y 16 kJ/m^3) y con el valor que se usó para la simulación de la Figura 2.29.B (15 kJ/m^3). Con este valor de la anisotropía magnética, los tiempos característicos de relajación de Néel y Browniano en esta muestra, supuesto un radio hidrodinámico de 25 nm, resultan ser del mismo orden de magnitud, aproximadamente $5 \cdot 10^{-5}$ y $5 \cdot 10^{-6}$ respectivamente, por lo que ambos fenómenos habrán de ser considerados para explicar cualquier variación del SAR producida como consecuencia de los procesos realizados para incrementar su biocompatibilidad.

La situación es distinta en el caso de la muestra Pol 33, cuyo tamaño promedio es de 23 nm con una dispersión baja (0,15 nm). Supuesto un valor de anisotropía magnética comparable al anterior, el mecanismo Browniano es mucho más rápido que el de Néel (al menos 100 veces mayor) y, por lo tanto, domina sobre éste. Esto también implica que el rendimiento de estas partículas en hipertermia está fundamentalmente determinado por el radio hidrodinámico, más que por el tamaño del núcleo inorgánico. Las curvas de SAR e ILP que se presentan en la Figura 2.31 informan de un comportamiento cuadrático frente al campo hasta 20 kA/m, aunque con una clara tendencia decreciente del ILP conforme aumenta la amplitud de excitación a cualquier frecuencia (Figura 2.31.B), alcanzando en todo caso valores de absorción de potencia (en torno a 1-2) mucho menores que en la muestra Pol 25 (≈ 6). Los experimentos de DLS en Pol 33 confirmaron que los valores del diámetro hidrodinámico eran muy elevados ($\approx 180 \text{ nm}$), mucho mayores que en la

muestra Pol 25, posiblemente debido a la existencia de aglomerados de cierto tamaño.

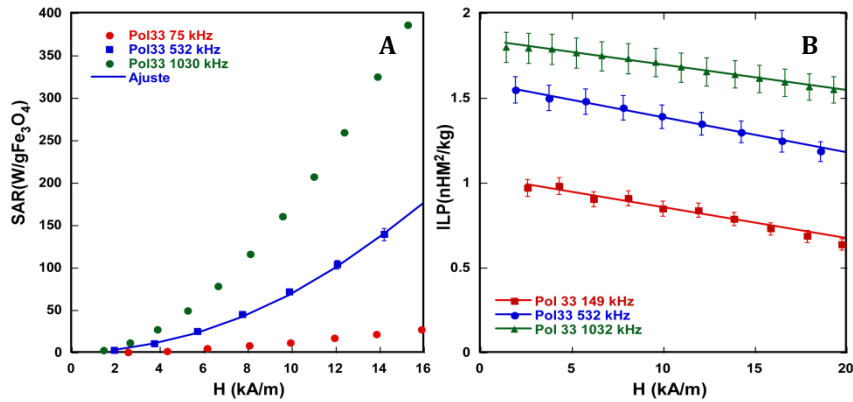


Figura 2.31. SAR la muestra Pol33 en tolueno frente a la amplitud de excitación, para tres frecuencias, 75, 532 y 1030 kHz (A). La línea continua corresponde con el ajuste según el modelo lineal para $K=15 \text{ kJ/m}^3$. ILP frente al campo para esas mismas tres frecuencias (B).

Es de interés constatar que el modelo lineal sigue funcionando razonablemente hasta unos 16 kA/m porque predice valores de SAR muy próximos a los experimentales cuando se toma dicho valor del diámetro hidrodinámico (180 nm). La curva superpuesta de la Figura 2.31.A corresponde a un ajuste del SAR a 532 kHz con el valor de la anisotropía como único parámetro libre. El valor obtenido para ésta, 15 kJ/m^3 , es casi idéntico al obtenido en la muestra Pol 25, teniendo en cuenta el nivel de simplificación de la expresión utilizada para el ajuste.

En el apartado de magnetismo, la constante de anisotropía magnética de la muestra Pol 29 se estimó a partir de las medidas de ZFC/FC obteniéndose un valor cercano a los 15 kJ/m^3 , es decir muy similar a los valores que se han estado utilizando en la discusión precedente para las muestras Pol 25 y Pol 33. Con este dato se deduce que el mecanismo de relajación de la imanación en esta muestra es puramente interno o de Néel, y que solo depende en el modelo lineal de la distribución de tamaños de partículas. Se ha realizado un ajuste de las medidas de SAR en función del campo dejando, en este caso, el promedio y la dispersión de tamaños como parámetros libres y fijando la constante de

anisotropía a 15 kJ/m^3 , por coherencia con las medidas magnéticas. Como en los casos anteriores, el ajuste que se muestra en la Figura 2.32.A es adecuado y el diámetro promedio obtenido es muy similar al determinado por TEM (11,7 nm).

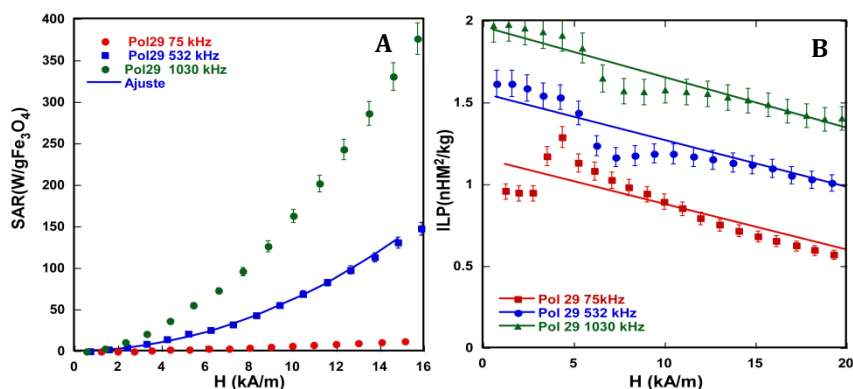


Figura 2.32. SAR de la muestra Pol 29 en tolueno frente a la amplitud de excitación, para tres frecuencias, 75, 532 y 1030 kHz (A). La línea continua corresponde con el ajuste según el modelo lineal para $K=15 \text{ kJ/m}^3$. ILP frente al campo para esas mismas tres frecuencia (B).

Mayores discrepancias se observan en la dispersión de tamaños que, en este caso, sale claramente menor que en el TEM (1,7nm frente 4 nm). En la Figura 2.32.B se observa un escalón sobre los 5 kA/m en las curvas de ILP en función del campo que no se puede relacionar con las propiedades de la muestra y que dificulta la determinación de una tendencia clara de este parámetro.

Finalmente, también se han analizado los valores de SAR de las muestras obtenidas después de la transferencia a medio acuoso de la muestra que mejor rendimiento en hipertermia ha mostrado inicialmente, Pol 25. En concreto, se analizaron las dos muestras que mayor estabilidad mostraban en concentraciones del orden de 3 mg/ml, Pol 25_PMAO y Pol 25_DMSA⁵¹. En

⁵¹ (a) Peng, E.; Ding, J.; Xue, J.M. *New J. Chem.* 38, no. 6 (2014): 2312.(b) Aqil, A.; Vasseur, S.; Duguët, E.; Passirani, C.; Benoît, J. P.; Jérôme, R.; Jérôme, C. *J. Mater. Chem.* 18, no. 28 (2008): 3352.

la Figura 2.33.A se comparan las curvas obtenidas a una frecuencia de 676 kHz con la curva correspondiente a 532 kHz de la muestra Pol 25 en tolueno.

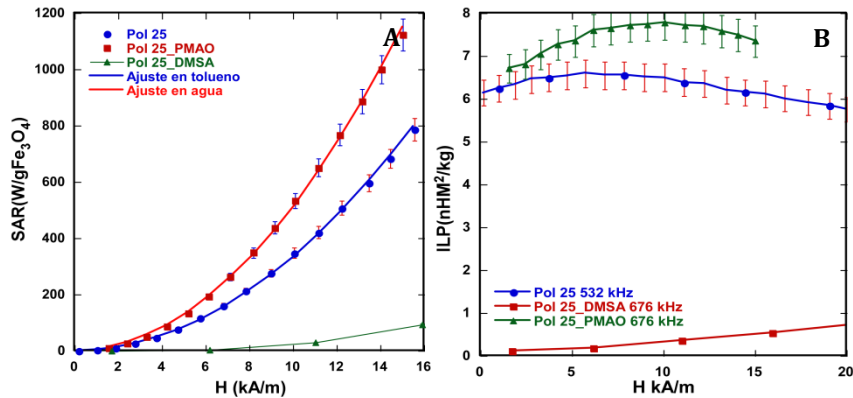


Figura 2.33. SAR de la muestras Pol 25 en Tolueno, Pol 25_PMAO y Pol 25_DMSA frente a la amplitud de excitación a 532 kHz (A). Las líneas continuas corresponden a los ajustes según el modelo lineal. ILP frente al campo para esas mismas muestras (B).

El resultado de la transferencia a agua es completamente distinto en los dos casos: la muestra con recubrimiento DMSA tiene un rendimiento de absorción mucho más pequeño que la muestra original mientras que la muestra PMAO adquiere mayor capacidad de absorción de energía magnética. La razón que explica este comportamiento es muy evidente en el caso de la muestra Pol 25_DMSA. Las imágenes de TEM y los datos extraídos del DLS señalan directamente a la formación de aglomerados o ensamblajes muy grandes, fruto de un recubrimiento colectivo, como la razón que explica un decrecimiento tan drástico del SAR (o del ILP). En este caso, tanto el incremento enorme del radio hidrodinámico (>800 nm) como de las interacciones entre partículas que tienen lugar dentro de los aglomerados, favorecen un decrecimiento fuerte de la absorción magnética.

Las imágenes de la muestra Pol 25_PMAO indican, sin embargo, que el nuevo recubrimiento polimérico actúa de forma más individual, aunque el valor obtenido para el radio hidrodinámico (78 nm) informa que sigue produciéndose un cierto ensamblaje de pocas partículas. Sea cual sea la razón de este aumento del radio hidrodinámico, el efecto resultante es un aumento

del tiempo de relajación browniano y consecuentemente un decrecimiento del SAR, según el modelo LRT. En este contexto, un aumento del SAR solo se puede explicar cómo debido a un decrecimiento de la anisotropía efectiva que compense el citado aumento del radio hidrodinámico: el ajuste de la curva experimental, suponiendo que la distribución de tamaños magnéticos es idéntica a la original, con un diámetro hidrodinámico de 180 nm (Pol 25_PMAO) arroja un valor de 13 kJ/m² para dicha constante, que es un valor significativamente distinto que el obtenido en tolueno. Esta disminución solo se puede relacionar con una variación considerable de las interacciones dipolares entre partículas^{35,52}. El ligero ensamblaje entre ellas, promovido con el nuevo recubrimiento, tiende a decrecer la anisotropía efectiva debido a un efecto de promedio de las anisotropías individuales de cada partícula.

De la discusión anterior se deduce que la respuesta de las muestras estudiadas a las amplitudes de excitación que se usarán en los experimentos in-vivo se ajusta notablemente bien al modelo de respuesta lineal (LRT). La muestra Pol 25 parece estar constituida de partículas con el tamaño más adecuado para optimizar la producción de calor con campos de entre 10-15 kA/m, y esta característica es esencial desde el punto de vista de su aplicación en hipertermia⁵³. Sin embargo, según se desprende de nuestros resultados, el proceso de transferencia a medio acuoso de este tipo de partículas, puede producir variaciones drásticas en su rendimiento final debido a que su capacidad de producción de calor es muy sensible a ligeras variaciones del estado de agregación. De cualquier modo, la mejor manera de valorar el rendimiento de la muestra Pol 25 consiste en compararlo con los resultados publicados en la literatura referidos a nanopartículas de magnetita o ferrita. En la Tabla 2.8 se presentan algunos de los más significativos, tanto los valores de SAR como los de la potencia de absorción intrínseca (ILP) que resulta de la normalización por $f \times H^2$.

⁵² (a) Nunes, W. C.; Socolovsky, L. M.; Denardin, J. C.; Cebollada, F.; Brandl, a. L.; Knobel, M. *Phys. Rev. B* 72, no. 21 (2005): 1–4. (b) Luis, F.; Torres, J. M.; Garcia, L. M.; Bartolome, J.M.; Stankiewicz, J.; Petroff, F.; Fetta, F.; Maurice, J. L.; Vaures, A. *Phys. Rev. B* 65 (2001): 2–11.

⁵³ Radovic, M.; Calatayud, M. P.; Goya, G. F.; Ibarra, M. R.; Antic', B. Spasojevic', V. *Journal of Biomedical Advanced Research* 103, no. 1 (2015): 126–134.

Tabla 2.8. Valores de H_c (a 5K), M (a RT) y T_B junto con los correspondientes tamaños de las diferentes muestras sintetizadas.

Material	D (nm)	f (kHz)	Campo (kA/m)	SAR (W/g _{Fe3O4})	ILP (nHm ² /kg)
Fe ₃ O ₄ tolueno*	19	532	14,0	650	6,1
Fe ₃ O ₄ PMAO*	19	532	14,0	780	7,5
CoFe ₂ O ₄ @MnFe ₂ O ₄ ⁵⁴	15	500	37,3	2280	3,0
MnFe ₂ O ₄ @CoFe ₂ O ₄ ⁵⁴	15	500	37,3	3034	4,0
Fe ₃ O ₄ @CoFe ₂ O ₄ ⁵⁴	15	500	37,3	2795	3,6
Zn _{0,4} Co _{0,6} Fe ₂ O ₄ @Zn _{0,4} Mn _{0,6} Fe ₂ O ₄ ⁵⁴	15	500	37,3	3886	5,6
Fe ₃ O ₄ Water ²⁸	15	870	10	630	7,2
γ-Fe ₂ O ₃ ⁵⁵	17	700	24,8	1650	3,8
Fe ₃ O ₄ ⁵⁶	40	410	10	960	23,4
Fe ₃ O ₄ ⁵⁷	14	400	24,5	447	1,9
ZnFe ₂ O ₄ ⁵⁸	18	500	37,3	1860	2,7
Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ ⁵⁸	40	500	37,3	3550	5,1
Zn _{0,4} Fe _{2,6} O ₄ @CoFe ₂ O ₄ ⁵⁸	60	500	37,3	10600	15,2
Fe ₃ O ₄ ⁵⁹	16	376	13,5	144	2,1
Fe ₃ O ₄ nanocubes; Error! Marcador no definido.	19	700	24,0	2277	5,6
Fe ₃ O ₄ nanocubes; Error! Marcador no definido.	19	325	22,0	1000	6,36

Los valores de ILP recogidos en esta tabla indican que los resultados de la muestra Pol 25 están entre los que mejor rendimiento ofrecen en hipertermia, solo superados claramente por magnetita biomineralizada (magnetosomas). Las razones para ello se fundamentan en varias características que consideramos clave: (i) excelente pureza y cristalinidad de la fase magnetita que da lugar a una alta imanación de saturación, cercana al valor correspondiente al estado masivo, (ii) dispersión relativamente pequeña de tamaños, (iii) diámetro promedio optimizado al máximo de absorción en

⁵⁴ Lee, J. H.; Jang, J. T.; Choi, J. S.; Moon, S. H.; Noh, S. H.; Kim, J. W.; Kim, J. G.; Kim, I. S.; Park, K. I.; Cheon, J. *Nat. Nanotechnol.* 6 (2011): 418.

⁵⁵ Pradhan, P. *J. Biomed. Mater. Res.* 81 (2007): 12–22.

⁵⁶ Hergt, R.; Hiergeist, R.; Zeisberger, M.; Schülerb, D.; Heyen, U.; Hilger, I.; Kaiser, W. A. *J. Magn. Magn. Mater.* 293 (2005): 80–86.

⁵⁷ Gonzales-Weimuller, M.; Zeisberger, G.; Krishnan, K. M. *J. Magn. Magn. Mater.* 321 (2009): 1947–1950.

⁵⁸ Seung-Hyun, N.; Na, W.; Jang, J. T.; Lee, J. H.; Lee, E. J.; Moon, S. H.; Lim, Y.; Shin, J. S.; Cheon, J. *Nanolett.* 12 (2012): 3716–3721.

⁵⁹ Khandhar, A. P.; Ferguson, R. M.; Krishnana, K. M. *J. App. Phys.* 109 (2011): 07B310.

las condiciones experimentales y (iv) control preciso del proceso de transferencia a fase acuosa para, al menos, no perjudicar su rendimiento final.

II.10. Discusión

El trabajo realizado sobre diferentes sistemas nanoestructurados de magnetita ha puesto de manifiesto la enorme importancia que tiene el método de síntesis empleado sobre las características del producto final y, más concretamente, sobre su respuesta en hipertermia. Así, los dos grupos de muestras preparadas, mediante los precursores $\text{Fe}(\text{CO})_5$ y $\text{Fe}(\text{acac})_3$, han presentado resultados dispares.

El método de descomposición térmica combinado con el subsiguiente crecimiento de partículas ha permitido obtener resultados muy satisfactorios. Mediante la estrategia de adiciones consecutivas y ajustando, cuidadosamente, algunos parámetros sintéticos, como el volumen de reacción, el tipo de precursor de hierro, la relación metal/ligando, los tiempos de reacción etc., se ha logrado un control bastante preciso sobre el tamaño de partícula obtenido. En este sentido, se han preparado muestras altamente monodispersas con tamaños medios comprendidos entre los 8 y los 40 nm, muy cristalinas y con una imanación de saturación cercana al valor de la magnetita en estado masivo (98 emu/g a 5 K).

Los mejores resultados por ambos métodos se han logrado tras una optimización de la síntesis a partir de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ mediante descomposición térmica, que han consistido en realizar adiciones consecutivas ajustando la temperatura de la misma a 280°C y empleando agitación mecánica y en presencia de ligandos como el ácido oleico, la oleilamina y el 1,2-hexadecanediol en exceso. Aún consiguiendo menores tamaños, presentan una gran cristalinidad y buen grado de dispersión. En el caso del $\text{Fe}(\text{acac})_3$, a partir de un tamaño de 18-20 nm, las dispersiones de tamaños se vuelven considerables, comienzan a aglomerarse y se observa una limitada estabilidad en medio acuoso.

Por otro lado, se ha comprobado que para una funcionalización adecuada es imprescindible la buena estabilidad y dispersión de las NPs de partida. De entre todos los recubrimientos estudiados, el PMAO ha permitido

dotar al sistema de las mejores características, una alta estabilidad en medio fisiológico para su posterior aplicación en tratamientos oncológicos sin que éste sufra un deterioro de sus propiedades magnéticas y su respuesta en hipertermia.

La Espectroscopia de Masas-MALDI ha demostrado ser una técnica eficaz para comprobar la funcionalización de MNPs con péptidos tipo RGD como el utilizado, siendo una alternativa a otras técnicas que, por su alta especificidad o límite de detección, no han podido revelar la presencia de dicho péptido en estos sistemas.

En el proceso de optimización de la síntesis, la espectroscopia de Resonancia Magnética Electrónica (RME) ha sido una herramienta clave; tanto para analizar la repercusión de los diferentes parámetros sintéticos en el tamaño de partícula, como para monitorizar las cribas de tamaño empleadas para la obtención de sistemas con alta monodispersidad. En este sentido, el método de medida en dispersión de tolueno resulta rápido y eficaz y ofrece resultados fiables y repetitivos. Incluso con un volumen de muestra de tan sólo 1 ml, se analiza un grupo de más de 10^{13} nanopartículas; estadísticamente mucho más representativo que los empleados en las técnicas microscópicas habituales.

Entre los resultados más interesantes obtenidos de los estudios de RME efectuados sobre las dispersiones de nanopartículas de magnetita en tolueno, se encuentra la observación de un crecimiento exponencial del valor de g con el tamaño de las partículas. Seleccionando un grupo de muestras con señales definidas en RME y tamaños de entre 6 y 23 nm determinados cuidadosamente por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), se ha podido ajustar a una curva que relaciona ambos parámetros y se adapta muy bien a lo observado en nanopartículas de magnetita dispersas en tolueno. Esta correlación comienza a perderse para NPs de más de 20 nm debido a las intensas interacciones entre ellas.

El valor de g medido en las dispersiones analizadas corresponde a un parámetro *efectivo* que depende de factores externos como el medio dispersante, Es por ello que la interpretación cuantitativa de las relaciones observadas de este parámetro con el diámetro y el SAR, puede ser muy

compleja. Aún así, queda demostrado que la técnica de RME puede ser una eficaz herramienta para evaluar directamente el tamaño de partícula y el valor de SAR de una dispersión concreta.

La posterior caracterización magnética de las muestras mediante las habituales medidas de imanación frente a campo y temperatura permite predecir, según el mecanismo de relajación imperante en cada caso, su respuesta posterior en hipertermia magnética (SAR), ha mostrado una excelente correlación entre los tamaños de partícula, los valores de g determinados por RME, las temperaturas de bloqueo y la correspondientes tasas de absorción de energía.

Asimismo, el incremento de la imanación en la curva ZFC desde 0 hasta 100K, donde se produce un cambio de pendiente en las muestras de mayor tamaño, está relacionado con la transición de Verwey de la magnetita. Esta transición implica un incremento de la anisotropía magnetocristalina a bajas temperaturas consecuencia de una deformación ortorrómbica. Aunque el estudio de esta transición está fuera de los objetivos de la presente investigación, desde el punto de vista del magnetismo, esta transición implica un incremento de la anisotropía magnetocristalina, a bajas temperaturas, consecuencia de una deformación ortorrómbica, muy similar a otras medidas de partículas de magnetita biomineralizadas, de alta pureza.

Como conclusión, se ha demostrado una vez más que los materiales nanoestructurados de magnetita son muy prometedores como potenciales agentes inductores de hipertermia magnética. Sin embargo, el adecuado control de los procesos sintéticos es indispensable para garantizar las imprescindibles mejoras en respuesta y reproducibilidad que permitirían su aplicación en terapias médicas.

II.11. Bibliografía

- Abián, J.; Carrascal, M.; Gay, M. *Proteómica* 2 (2008): 16–34.
- Aqil, A.; Vasseur, S.; Duguet, E.; Passirani, C.; Benoît, J. P.; Jérôme, R.; Jérôme, C. *J. Mater. Chem.* 18, no. 28 (2008): 3352.
- Astigarraga, E.; Barreda-Gómez, G.; Lombardero, L.; Fresnedo, O.; Castaño, F.; Giralt, M. T.; Ochoa, B.; Rodríguez-Puertas, R.; Fernández, J. A. *Anal. Chem.* 80 no.23 (2008): 9105-9114.
- Bakuzis, A. F.; Branquinho, L. C.; Luiz E Castro, L.; De Amaral Eloi, M. T.; Miotto, R. *Adv. Colloid Interfac. Sci.* 191 (2013): 1-21.
- Batlle, X.; Pérez, N.; Guardia, P.; Iglesias, O.; Labarta, A.; Bartolomé, F.; Garca, L. M.; Bartolomé, J.; Roca, A. G.; Morales, M. P.; Serna, C. J. *J. Appl. Phys.* 109, no. 7 (2011): 7–13.
- Can, M. M.; Coşkun, M.; Firat, T. *J. Nanopart. Res.* 13, no. 10 (2011): 5497–5505.
- Carbone, C.; Di Benedetto, F.; Sangregorio, C.; Marescotti, P.; Pardi, L. A.; Sorace, L. *J. Phys. Chem. C* 112 (2008): 9988–9995.
- Carrey, J.; Mehdaoui, B.; Respaud, M. *J. Appl. Phys.* 109, no. 8 (2011): 1–17.
- Castellanos-Rubio, I. *Preparation and Characterization of Pd, PdFe, Fe₃O₄; Potential Inducers of Magnetic Hyperthermia* (PhD Thesis) (University of Basque Country, Leioa, 2013).
- Castellanos-Rubio, I.; Insausti, M.; Garaio, E.; Gil de Muro, I.; Plazaola, F.; Rojo, T.; Lezama, L. *Nanoscale.* 6 (2014) 7542–7552.
- Castellanos-Rubio, I.; Insausti, M.; Gil de Muro, I.; Arias-Duque, C.; Hernández-Garrido, J.C.; Rojo, T.; Lezama, L. *J. Nanopart. Res.* 229 (2015): 1–13.
- Chen, Z. P.; Zhang, Y.; Zhang, S.; Xia, J. G.; Liu, J. W.; Xu, K.; Gu, N. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 316, no. 1–3 (2008): 210–216.
- Cullity, B. D.; Graham, C. D. *Introduction to Magnetic Materials*, 2nd ed. (Piscataway, New Jersey: Wiley-IEEE Press, 2011).
- Di Corato, R.; Quarta, A.; Piacenza, P.; Ragusa, A.; Figuerola, A.; Buonsanti, R.; Cingolani, R. Manna, L.; Pellegrino, T. *J. Mater.Chem.* 18, no. 17 (2008): 1991-1996.

- Ding, H.; Zhang, Y.; Wang, S.; Xu, J.; Xu, S. C.; Li, G. *Chem. Mater.* 24 (2012): 4572–4580.
- Dormann, J. L.; Fiorani, D.; Tronc, E., *Advances in Chemical Physics* 96 (1997): 283.
- Farrell, D.; Cheng, Y.; Mccallum, R. W.; Sachan, M.; Majetich, S. A. *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005): 13409–13419.
- Fdez-Gubieda, M. L.; Muela, A.; Alonso, J.; García, A.; Barandiara, M.; Ferna, R. *ACS Nano* 7, no. 4 (2013): 3297–3305.
- Garaio, E.; Collantes, J. M.; Plazaola, F.; Garcia, J. A.; Castellanos-Rubio, I. *Measurement Science and Technology* 25, no. 11 (2014): 115702.
- Gatteschi, D.; Fittipaldi, M.; Sangregorio, C.; Sorace, L. *Angew. Chem.* 51, no. 20 (2012): 4792–4800.
- Gazeau, F.; Bacri, J. C.; Gendron, F.; Perzynski, R.; Raikher, Y. L.; Stepanov, V. I.; Dubois, E. *J. Magn. Mater.* 186, no. 1–2 (1998): 175–187.
- Glennon, B. *Colloidal Nanoparticles in Biotechnology* (New York, New Jersey: John Wiley & Sons, 2003).
- Gonzales-Weimuller, M.; Zeisberger, G.; Krishnan, K. M. *J. Magn. Mater.* 321 (2009): 1947–1950.
- Guardia, P.; Di Corato, R.; Lartigue, L.; Wilhelm, C.; Espinosa, A.; Garcia, M.; Gazeau, F. Manna, L.; Pellegrino, T. *ACS Nano* 6, no. 4 (2012): 3080–3091.
- Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Murphy, R. C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, no. 9 (2007): 1646–1652.
- Hergt, R.; Hiergeist, R.; Zeisberger, M.; Schülerb, D.; Heyen, U.; Hilger, I.; Kaiser, W. A. *J. Magn. Mater.* 293 (2005): 80–86.
- Kempe, S.; Metz, H.; Mäder, K. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74, no. 1 (2010): 55–66.
- Ketharnath, D.; Pande, R.; Xie, L.; Srinivasan, S.; Godin, B.; Wosik, J. *Appl. Phys. Lett.* 101, no. 8 (2012): 2–5.
- Khandhar, A. P.; Ferguson, R. M.; Krishnana, K. M. *J. App. Phys.* 109 (2011): 07B310.
- Knobel, M.; Nunes, W. C.; Socolovsky, L. M.; De Biasi, E.; Vargas, J. M.; Denardin, J. C. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8, no.6 (2008): 2836-2857.

Bibliografía

- Kovalenko, M. V.; Bodnarchuk, M. I.; Lechner, R. T.; Hesser, G.; Schäffler, F.; Heiss, W. *J. Am. Chem. Soc.* 129, no. 20 (2007): 6352–6353.
- Kulhari, H.; Pharm, M.; Pooja, D.; Pharm, M.; Shrivastava, S.; Pharm, M. S. *Nanomedicine* 11 (2015): 1511–1520.
- Kumari, S.; Stevens, D.; Kind, T.; Denkert, C. *Analytical Chemistry* 83 (2011): 5895.
- Lartigue, L.; Innocenti, C.; Kalaivani, T.; Awwad, A.; Sanchez Duque, M. M.; Guari, Y.; Larionova, J.; Gueírin, C.; Montero, J. L.G.; Barragan-Montero, V.; Arosio, P.; Lascialfari, A.; Gatteschi, D.; Sangregorio, C. *J. Am. Chem. Soc.* 133, no. 27 (2011): 10459–10472.
- Laurent, S.; Dutz, S.; Häfeli, U.; Mahmoudi, M. *Adv. Colloid Int. Sci.* 166, no. 1 (2011): 8–23.
- Lee, J. H.; Jang, J. T.; Choi, J. S.; Moon, S. H.; Noh, S. H.; Kim, J. W.; Kim, J. G.; Kim, I. S.; Park, K. I.; Cheon, J. *Nat. Nanotechnol.* 6 (2011): 418.
- Lenart, V. M.; Gómez, S. L.; Calatayud, M. P.; Goya, G. R. *Cond. Mat.* (2014)1402.1134.
- Levy, M.; Quarta, A.; Espinosa, A.; Figuerola, A.; Wilhelm, C.; García-Hernández, M.; Genovese, A.; Falqui, A.; Alloyeau, D.; Buonsanti, R.; Cozzoli, P. D.; García, M. A.; Gazeau, F.; Pellegrino, T. *Chem. Mater.* 23, no. 18 (2011): 4170–4180.
- Lin, C. J.; Sperling, R. A.; Li, J. K.; Yang, T. Y.; Li, P. Y.; Zanella, M. Chang, W. H.; Parak, W. *Small* 4, no. 3 (2008): 334–341.
- Liu, X. L.; Choo, E. S. G.; Ahmed, A. S.; Zhao, L. Y.; Yang, Y.; Ramanujan, R. V.; Xue, J. M.; Fan, D. D.; Fan, H. M.; Ding, J. *J. Mater. Chem. B* 2, no. 1 (2014): 120.
- Liu, X. L.; Fan, H. M.; Yi, J. B.; Yang, Y.; Choo, E. S. G.; Xue, Jun M.; Fan, Dai Di; Ding, J. *J. Mater. Chem.* 22, no. 17 (2012): 8235.
- Luis, F.; Torres, J. M.; Garcia, L. M.; Bartolome, J.M.; Stankiewicz, J.; Petroff, F.; Fettar, F.; Maurice, J. L.; Vaures, A. *Phys. Rev. B* 65 (2001): 2–11.
- Lyklema, J., *Fundamentals of Interface and Colloid Science*, 1st ed. (Wageningen, Netherlands, Elsevier, 1995).
- Ma, M.; Zhang, Y.; Yu, W. *Colloids and Surfaces A* 212 (2003): 219–226.

- Mandal, K.; Mitra, S.; Kumar, P. A. *Europhys. Lett.* 75 (2006) 618–623.
- Mehdaoui, B.; Meffre, A.; Carrey, J.; Lachaize, S.; Lacroix, L. Marie; Gougeon, M.; Chaudret, Bruno; Respaud, M. *Advanced Functional Materials* 21, no. 23 (2011): 4573–4581.
- Meriaux, C.; Franck, J.; Wisztorski, M.; Salzet, M.; Fournier, I. *Journal of Proteomics* 73, no. 6 (2010): 1204–1218.
- Nikiforov, V. N.; Koksharov, Y. A.; Polyakov, S. N.; Malakho, A. P.; Volkov, A. V.; Moskvina, M. A.; Khomutov, G. B.; Irkhin, V. *Journal of Alloys and Compounds* 569 (2013): 58–61.
- Noginov, M. M.; Noginova, N.; Amponsah, O.; Bah, R.; Rakhimov, R.; Atsarkin, V. A. *J. Magn. Mater.* 320, no. 18 (2008): 2228–2232.
- Noginova, N.; Weaver, T.; Giannelis, E.; Bourlinos, a.; Atsarkin, V.; Demidov, V. *Phys. Rev. B* 77 (2008): 014403.
- Nunes, W. C.; Socolovsky, L. M.; Denardin, J. C.; Cebollada, F.; Brandl, a. L.; Knobel, M. *Phys. Rev. B* 72, no. 21 (2005): 1–4.
- Pankhurst, Q.A.; Connolly, J.; Ones, S.K.; Dobson, J. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003): 167–181.
- Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, Dmitry; Rogach, A. L.; Keller, S.; Rädler, J.; Natile, G.; Parak, W. J. *Nano Lett.* 4, no. 4 (2004): 703–707.
- Peng, E.; Ding, J.; Xue, J. M. *New J. Chem.* 38, no. 6 (2014): 2312.
- Piñeiro-Redondo, Y.; Bañobre-López, M.; Pardiñas-Blanco, I.; Goya, G.; López-Quintela, M. A.; Rivas, J. *Nanoscale Research Letters* 6, no. 1 (2011): 383.
- Porto, M.; Rivas, J.; Bunde, A. *J. Appl. Physics* 85, no. 4 (1999): 2287–2292.
- Pradhan, P. *J. Biomed. Mater. Res.* 81 (2007): 12–22.
- Puolitaival, S.M.; Burnum, K. E.; Cornett, D. S.; Caprioli, R. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, no. 6 (2008): 882–886.
- Qu, H.; Caruntu, D.; Liu, H.; O'Connor, C. J. *Langmuir* 27, no. 6 (2011): 2271–2278.
- Radovic, M.; Calatayud, M. P.; Goya, G. F.; Ibarra, M. R.; Antic´, B. Spasojevic´, V. *Journal of Biomedical Advanced Research* 103, no. 1 (2015): 126–134.

Bibliografía

- Raikher, Y. L.; Stepanov, V. I. *Phys. Rev. B* 50, no. 9 (1994): 6250–6259.
- Saifit, A.; Dormann, J. L.; Fiorani, D.; Renaudint, P.; Jové, J. *J. Phys. C* 21 (1988) 5295–5315.
- Salado, J.; Insausti, M.; Lezama, L.; Gil de Muro, I.; Goikolea, E., Rojo, T. *Chem. Mater.* 23 (2011): 2879–2885.
- Salazar, J. S.; Perez, L.; Abril, O.; Phuoc, L. T.; Ihiawakrim, D.; Vazquez, M.; Greneche, J. M.; Begin-Colin, S.; Pourroy, G. *Chem. Mater.* 23 (2011): 1379–1386.
- Schmool, D. S.; Rocha, R.; Sousa, J. B.; Santos, J. a M; Kakazei, G. N.; Garitaonandia, J. S.; Lezama, L. *J. App. Phys.* 101, no. 10 (2007): 103907.
- Seung-Hyun, N.; Na, W.; Jang, J. T.; Lee, J. H.; Lee, E. J.; Moon, S. H.; Lim, Y.; Shin, J. S.; Cheon, J. *Nanolett.* 12 (2012): 3716–3721.
- Sezer, G.; Prandolini, M. J.; Prisner, T. F. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, no. 31 (2009): 6626–6637.
- Shepherd, J. P.; Aragan, R.; Koenitzer, J. W.; Honig, J. M. *Phys. Rev. B* 32, no. 3 (1985): 1818–1819.
- Signor, L.; Erba, E. B. *Journal of Visualized Experiments* 79 (2013): 1–7.
- Stoner, E. C.; Wohlfarth, E. P. *Phil. Trans. Roy. Soc. A*-240, no. 4 (1948): 599–642.
- Thakur, M.; De, K.; Giri, S.; Si, S.; Kotal, A.; Mandali, T. K. *J. Phys.* 20, no. 14 (2008): 149801–149801.
- Thomas, L.; Dekker, L.; Kallumadil, M.; Southern, P.; Wilson, M.; Nair, S. P.; Pankhurst, Q. A.; Parkin, I. P. *J. Mater. Chem.* 19 (2009): 6529–6535.
- Verde, E. L.; Landi, G. T.; Gomes, J. A.; Sousa, M. H.; Bakuzis, A. F. *J. Appl. Phys.* 111, no. 12 (2012): 49–56.
- Wang, J.; Chen, Q.; Li, X.; Shi, L.; Peng, Z.; Zeng, C. *Chem. Phys. Lett.* 390, no. 1–3 (2004): 55–58.
- Wang, J.; Duan, H.; Lin, X.; Aguilar, V.; Mosqueda, A. *J. Appl. Phys.* 112 (2012): 5–9.
- Xiao, J. F.; Zhou, B.; Ressom, H. W. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 32 (2012): 1.

Yulikov, M.; Lueders, P.; Farooq Warsi, M.; Chechik, V.; Jeschke, G. *Phys.*

Chem. Chem. Phys. 14, no. 30 (2012): 10732.

Zhang, L.; He, R.; Gu, H. C. *App. Surf. Sci.* 253, no. 5 (2006): 2611–2617.

CAPÍTULO III
ENSAYOS PRECLÍNICOS

Capítulo III. Ensayos Preclínicos

El desarrollo de un fármaco o tratamiento engloba su seguridad, eficacia, formulación y fabricación. Normalmente, los estudios de seguridad comienzan con diversos experimentos denominados estudios preclínicos. Cuando estos estudios prevén que el fármaco candidato es seguro, se inicia su evaluación en seres humanos en una serie de estudios conocidos como ensayos clínicos.

Los estudios preclínicos son pruebas que se llevan a cabo en un contexto científicamente controlado con utilización de cultivos celulares y animales como modelos. La finalidad de los estudios preclínicos es predecir cómo actúa el organismo sobre el candidato a fármaco (farmacocinética), cómo actúa el candidato a fármaco sobre el organismo (farmacodinámica) y si el candidato a fármaco puede entrañar posibles riesgos para la salud o efectos secundarios tóxicos¹.

La información derivada de estos estudios es vital ya que permite que los investigadores calculen una posología segura para los seres humanos en ensayos clínicos en fase I. Aunque se exige que las empresas farmacéuticas presenten datos de modelos animales a las autoridades sanitarias como parte del proceso de aprobación de medicamentos, las empresas están adoptando medidas para reducir el número de animales utilizados en los estudios debido a problemas éticos y al coste que conllevan las instalaciones.

Los modelos animales incrementan, en gran medida, la capacidad de los científicos de estudiar la eficacia y la seguridad de los fármacos candidatos a medicamentos nuevos². En la validación de objetivos, los investigadores pueden utilizar ratones con genes desactivados (knock-out) o activados (knock-in). A los ratones con genes desactivados se les altera genéticamente para eliminar las versiones murinas de genes responsables de enfermedades humanas. Estos genes también pueden activarse para crear modelos murinos de enfermedades humanas como cáncer, diabetes, alzheimer y parkinson. Los

¹ Díaz, E.; García, J. *Oncología Clínica Básica* (Madrid, España: Arán Ediciones, 2000): 346-348.

² Zhang, D.; Luo, G.; Ding, X.; Lu, C. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2 no. 6 (2012): 549-561.

candidatos a medicamentos se analizan en estos animales, lo que permite que los investigadores comprueben la aparición de efectos adversos secundarios antes de administrarlos a seres humanos.

Inicialmente, muchos estudios de seguridad y toxicidad de fármacos se realizan en cultivos celulares. La creación de modelos de líneas celulares ha disminuido el número de animales necesarios para los estudios (con la consiguiente reducción del coste y el tiempo) y contribuye a acelerar el proceso de desarrollo de medicamentos.

Cuando los ensayos preclínicos aportan pruebas suficientes de que un candidato a fármaco es seguro, las empresas presentan una solicitud de Fármaco nuevo en investigación (IND) a la EMEA (Agencia Europea de Medicamentos). Una vez que la EMEA aprueba el IND, las empresas pueden comenzar a realizar ensayos clínicos escalonados en seres humanos. De hecho, recientemente se ha aprobado un tratamiento local con nanopartículas ferromagnéticas de óxido de hierro para pacientes con tumores cerebrales empleando hipertermia magnética combinada con radioterapia³.

Una vez se ha concluido la caracterización fisicoquímica y magnética de los materiales a estudio, resulta esencial una completa determinación de su toxicidad, ya que todas estas propiedades pueden resultar muy significativas para sus efectos a escala biológica⁴.

Así, y con objeto de dirigir las nanopartículas (NPs) preparadas, cuyas propiedades se han definido previamente, hacia su posible aplicación como fármacos en terapias contra el cáncer, se han preparado con las mismas fluidos magnéticos para, posteriormente, realizar ensayos *in vitro* en cultivos celulares para la evaluación de su toxicidad⁵. Finalmente, se han llevado a cabo los

³ Maier-Hauff, K.; Ulrich, F.; Nestler, D.; Niehoff, H.; Wust, P.; Thiesen, B.; Orawa, H.; Budach, V.; Jordan, A. *J. Neurooncol.* 103 (2011): 317–324.

⁴ Warheit, D. B., *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 101 (2008): 183–185.

⁵ (a) Karlsson, H. L.; Cronholm, P.; Gustafsson, J.; Möller, L. *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008): 1726–1732. (b) Pfaller, T.; Colognato, R.; Nelissen, I.; Favilli, F.; Casals, E. Ooms, D.; Leppens, H.; Ponti, J.; Stritzinger, R.; Puentes, V. *Nanotoxicology* 4 (2010): 52–72. (c) Wang, B.; Feng, W.; Zhu, M.; Wang, Y.; Wang, M.; Gu, Y.; Ouyang, H.; Wang, H.; Li, M.; Zhao, Y. *J. Nanopart. Res.* 11 (2009): 41–53. (e) Xiao-Feng, P., Bo, D.; Qiang, Z. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9 (2009): 1369–1373. (f) Xuan, S.; Wang, F.; Lai, J. M. Y.; Sham, K. W. Y.; Wang, Y. X. J.; Lee, S. F.; Yu, J. C.; Cheng, C. H. K.; Leung, K. C. F. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3 (2011): 237–244.

ensayos *in vivo*⁶ en un modelo animal con el objeto de estudiar su efecto en experimentos de hipertermia magnética.

III.1. Ensayos in vitro

Una cuestión clave en la evaluación de la utilidad de los núcleos magnéticos, como es el caso de las NPs de magnetita, en aplicaciones biomédicas es la evaluación de su toxicidad potencial, ya sea debida a su inherente composición química o como consecuencia de sus propiedades a nanoescala. De este modo, es necesario comprobar la mejor adecuación de estas nanopartículas a sistemas biológicos, a través de la modificación de su capa superficial para aportar una mayor solubilidad acuosa, biocompatibilidad, y bioreconocimiento. Las NPs compuestas por óxidos de hierro presentan, teóricamente, una baja citotoxicidad aunque con el propósito de estudiar la influencia de sus características superficiales en la toxicidad, es prioritario evaluar su viabilidad celular frente a distintas líneas celulares.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las MNPs ya se han empleado para diferentes fines en investigación biomédica. Una de las principales aplicaciones es el marcaje *in vitro* de las células madre, lo que les permite ser rastreadas posteriormente *in vivo* tras su trasplante⁷. También existen agentes de contraste comerciales que contienen MNPs de óxido de hierro, aprobados para su uso clínico para imagen por resonancia magnética, y que están disponibles comercialmente⁸. Entre los más destacados se encuentran los óxidos de hierro recubiertos con carboxidextrano, como el Resovist⁹, los óxidos de hierro recubiertos con sílice, como el Ferumoxsil¹⁰ o el Feruglose NC100150 (óxidos de hierro recubiertos con PEG)¹¹.

⁶ Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fahling, H.; Krause, J.; Wlodarczyk, W.; Sander, H.; Vogl, T.; Felix, R. *Int. J. Hyperthermia* 13, no. 6 (1997): 587-605.

⁷ Soenen, S.; De Cuyper, M. *Contrast Media Mol. Imaging* 4 (2009): 207-219.

⁸ Soenen, S.; De Cuyper, M. *Nanomedicine* 5 no. 8(2010):1261-1275.

⁹ Yang, L.; Xia, Y.; Zhao, H.; Zhao, J.; Zhu, X. *J. Huazhong Univ. Sci. Techn. Med. Sci.* 26 (2006):489-92.

¹⁰ Jung, C. W. *Magn. Reson. Imaging*. 13 (1995):675-91.

¹¹ Kellar, K. E.; Fujii, D. K.; Gunther, W. H.; Briley-Saebo, K.; Bjornerud, A.; Spiller, M.; Koenig S. H. *J. Magn. Reson. Imaging*. 11 (2000):488-94.

Aunque se ha observado que estas nanopartículas de óxido inducen ligera o nula toxicidad celular en estudios con distintas células eucariotas¹², también se ha registrado citotoxicidad hidróxidos metálico laminares (LMHs)¹³. Además, todavía no está claro si, incluso en ausencia de citotoxicidad, se pueden producir otras respuestas celulares como consecuencia de la exposición a estas MNPs, tales como daño en el ADN, estrés oxidativo, disfunción de la membrana mitocondrial o alteraciones en la dinámica del ciclo celular. De los resultados obtenidos hasta la fecha, en lo referente a la citotoxicidad de las MNPs de óxidos de hierro, se deduce que no son en absoluto concluyentes, probablemente debido al uso de MNPs con diferente tamaño, carga, estado de agregación, pureza o recubrimiento, y a los diferentes sistemas de evaluación utilizados¹⁴, por lo que se requieren estudios detallados con diferentes variedades de MNPs, ya que la interacción de éstas con los sistemas celulares puede diferir de forma importante¹⁵.

El organismo humano contiene cantidades relativamente elevadas de hierro, pero la presencia de este metal a concentraciones más elevadas que las fisiológicas puede ser extremadamente tóxica. En condiciones fisiológicas, los iones de hierro (II y III) están unidos a proteínas como la ferritina, la transferrina y la hemosiderina, ya que su presencia aislada (como la causada en los casos de intoxicación por el metal) produce daños graves en los tejidos; así estos iones se acumulan en reservorios endógenos como reserva de hierro corporal para su uso posterior⁸. El hierro tiene la capacidad de aceptar y donar electrones fácilmente a través de su interconversión entre las formas Fe (II) y Fe (III), propiedad que lo convierte en un compuesto sumamente útil¹⁶. Por lo tanto, la homeostasis del hierro se halla estrictamente controlada.

¹² (a)Aydeev, M. V.; Mucha, B.; Lamszus, K.; Vékás, L.; Garamus, V. M.; Feoktystov, A. V.; Marinica, O.; Turcu, R.; Willumeit, R. *Langmuir* 26 (2010): 8503–8509.(b) Cheng, F. Y.; Su, C. H.; Yang, Y. S.; Yeh, C. S.; Tsai, C. Y.; Wu, C. L.; Wu, M. T.; Shieh, D. B. *Biomaterials* 26 (2005): 729–738.(c) Hildebrand, H.; Kühnel, D.; Potthoff, A.; Mackenzie, K.; Springer, A.; Schirmer, K. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 158 (2010): 65–73.

¹³ Choi, S. J.; Oh, J.M.; Choy, J. H. *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009): 463–471.

¹⁴ Zhao, J.; Castranova, V. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 14 (2011): 593–632.

¹⁵ Kunzmann, A.; Andersson, B.; Vogt, C.; Feliu, N.; Ye, F.; Gabrielsson, S.; Toprak, M.S.; Buerki-Thurnherr, T.; Laurent, S.; Vahter, M. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253 (2011): 81–93.

¹⁶ Kim, J. E.; Shin, J. Y.; Cho, M. H. *Arch. Toxicol.* 86 (2012): 685–700.

Se piensa que los posibles efectos citotóxicos del hierro libre se deben a su habilidad, al igual que otros iones metálicos de transición, de generar en conjunción con el oxígeno especies reactivas de oxígeno (ROS)¹⁷, que pueden causar la peroxidación de las membranas lipídicas, alterar la función mitocondrial¹⁸, afectar a otras funciones celulares como la capacidad de proliferación o activación de procesos proinflamatorios¹⁹ y dañar a otros constituyentes celulares orgánicos como las proteínas o el ADN, lo que puede conducir a nuevos efectos tóxicos (genotóxicos)²⁰ (Figura 3.1).

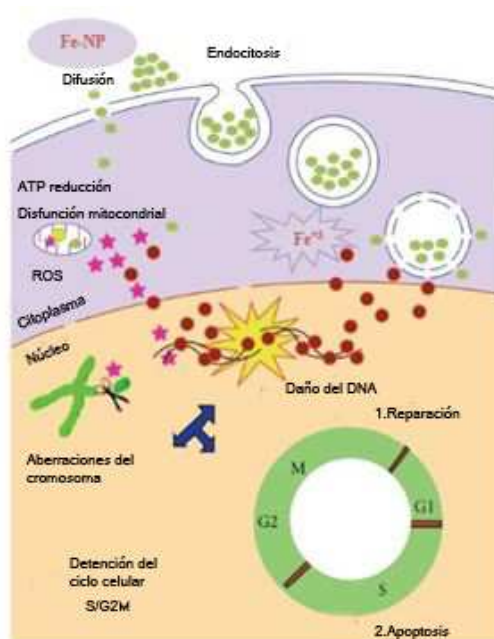


Figura 3.1. Ilustración de la captación de nanopartículas de óxido de hierro, y los mecanismos a través de los cuales se puede generar toxicidad para las células²¹.

¹⁷ Pisanic, T. R.; Jin, S.; Shubayev, V. I. *Nanotoxicity: From Health Risk to In Vitro and In Vivo Models, Nanotoxicity* (Laurel and Little Rock, USA: John Wiley & Sons, 2009).

¹⁸ Au, C.; Mutkus, L.; Dobson, A.; Riffle, J.; Lalli, J.; Aschner, M. *Biol. Trace Elem. Res.* 120 (2007): 248–256.

¹⁹ Zhu, M. T.; Feng, W. Y.; Wang, B.; Wang, T. C.; Gu, Y. Q.; Wang, M.; Wang, Y.; Ouyang, H.; Zhao, Y. L.; Chai, Z. F. *Toxicology* 247 (2008): 102–111.

²⁰ Auffan, M.; Rose, J.; Wiesner, M. R.; Bottero, J. Y. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 157 (2009): 1127–1133.

²¹ AshaRani, P. V.; Low KahMun, G.; Hande, M. P.; Valiyaveetil, S. *ACS Nano* 3 (2009): 279–290.

Los ensayos *in vitro* ayudan a evaluar la toxicidad potencial, proporcionando, así, los ensayos en animales información objetiva y complementaria sobre los mecanismos de acción de las nanopartículas para intentar establecer la relación entre la concentración de nanopartículas en una zona concreta y su posible efecto citotóxico²². Los ensayos se pueden realizar en diferentes líneas celulares mediante cultivos de las mismas o en epitelios reconstruidos disponibles comercialmente²³.

Actualmente, se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Se distinguen varios tipos de cultivos celulares: cultivo de órganos, cultivo de explantes, cultivo de células primario y cultivo organotípico (Figura 3.2)²⁴.

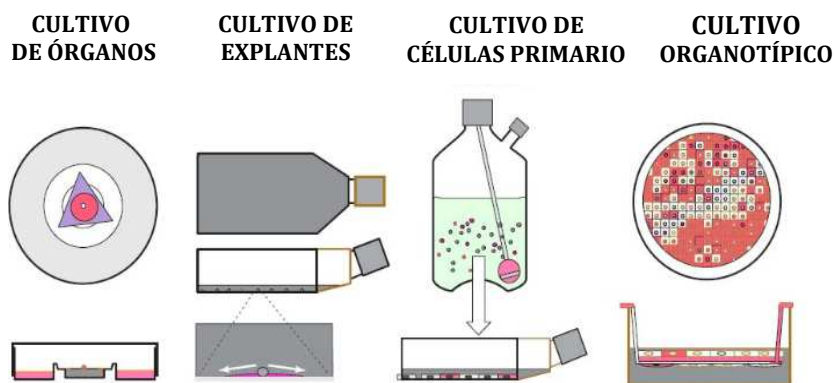


Figura 3.2. Representación esquemática del proceso de deposición de los cultivos celulares.

En el cultivo de órganos se coloca el órgano sobre una rejilla situada en la interfase líquido-gas de un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos. Este tipo de cultivo permite mantener, al menos en

²² (a)Maurici, D.; Aardema, M.; Corvi, R.; Cléber, M.; Krul, C.; Laurent, C.; Loprieno, N.; Pasanen, M.; Pfuhrer, S.; Phillips, B.; Sabbioni, E.; Sanner, T.; Vanparys, P. *Altern. Lab. Anim.* 33, no. 1 (2005): 117–130.(b) Valdiglesias, V.; Costa, C.; Sharma, V.; Kiliç, G.; Pásaro, E.; Teixeira, J.P.; Dhawan, A.; Laffon, B. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 57 (2013): 352–361.

²³ Berwald, Y.; Sachs, L. *Nature* 200 (1963): 1182–1184.

²⁴ Pocard, M.; Isukui, H.; Salmon, R. J.; Dutrillaux, B.; Poupon, M. F. *In Vivo* 10 (1996): 463–469.

parte, la arquitectura característica del tejido *in vivo*. Se conservan las interacciones histológicas y, gracias a ello, este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados, por lo que representan una buena réplica del tejido de origen²⁵. Sin embargo, no crecen mucho (la proliferación celular se limita a las células embrionarias de la periferia) y no se pueden propagar. Se necesita un nuevo explante para cada experimento lo que supone mucho más trabajo y una limitada reproducibilidad de la muestra. El cuantificar resulta difícil y la cantidad de material que se puede cultivar es reducida. En el caso del cultivo por explantes, se coloca un fragmento de tejido o de órgano en la interfase sólido-líquido de un soporte de vidrio o de plástico. Las células se adhieren a la superficie y las células de la periferia del explante pueden migrar y proliferar por la superficie del soporte. Los cultivos organotípicos constan de varios tipos celulares que interactúan entre sí de forma que intenta parecerse lo más posible a la original. El objetivo final de este tipo de cultivos es la creación *in vitro* de tejidos u órganos completamente funcionales que puedan ser utilizados en injertos o en trasplantes. Los cultivos organotípicos constituyen la base de la disciplina denominada ingeniería de tejidos.

Sin embargo, el tipo de cultivo más utilizado es el cultivo celular primario²⁶. Se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas. La disgregación celular se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos. En estos cultivos se pierden las interacciones célula-célula y las interacciones de la célula con la matriz extracelular. Sin embargo, las células son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente. Cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia. En esta etapa, las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene. Por ello, al cabo de un tiempo hay que trasplantar las células a un nuevo soporte. Esta operación se denomina subcultivo o pase.

²⁵ Doyle, A. Griffiths, J. B.; Newell, D. G.; *Cell and tissue culture: laboratory procedures* (New York, New Jersey: John Wiley and Sons, 1995).

²⁶ Cambier, J. C.; Gauld, S. P.; Merrell, K. T.; Vilen, B. J. *Nature Reviews Immunology* 7 (2007): 633-643.

Los sucesivos cultivos así formados se denominan una línea celular. La formación de una línea celular a partir de un cultivo primario implica que: aumenta el número de células obtenidas, acaban predominando uno o dos tipos celulares (los que tienen mayor tasa de crecimiento), la población celular se hace uniforme y homogénea y sus características se conservan durante las sucesivas generaciones²⁷.

En condiciones normales, las líneas celulares tienen una vida finita que, según el tipo de célula, se puede prolongar entre 20 y 100 generaciones. Superado ese límite, las células entran en una etapa que se denomina senescencia en la que pierden su capacidad de proliferar y mueren. Sin embargo, algunas células (como las células de roedores y las células tumorales) evitan la senescencia y dan lugar a líneas celulares continuas, que crecen indefinidamente. Estas células pueden surgir de forma espontánea (exposición a radiaciones ionizantes o a carcinógenos químicos) o inducida (infección vírica o transfección de ADN) y son el resultado de un cambio genotípico denominado transformación. El modo normal de proliferación de la mayor parte de las células, con excepción de las células hematopoyéticas maduras es el crecimiento en monocapa, lo cual significa que las células se adherirán al sustrato y, en esa forma, inician la proliferación. Muchas líneas celulares son anclaje-dependientes, es decir, no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato.

En 1983, un ensayo colorimétrico cuantitativo para la supervivencia celular y la proliferación celular de mamíferos fue propuesto por Mosmann²⁸. El ensayo depende de la reducción de la sal de tetrazolio MTT (3-(4,5-dimethylthazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) por la deshidrogenasa mitocondrial de las células viables para formar un producto de formazán azul. El resultado de la reducción es un cambio de color de la molécula MTT. Las mediciones de absorbancia relativas a un control determinan el porcentaje restante de las células viables después de su tratamiento con concentraciones variables de una determinada sustancia. Este método ha demostrado ser una gran

²⁷ Martínez, P. A.; Navarro, M. A. *Rev. Oncol.* 5, no. 4 (2003):184-191.

²⁸ (a) Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* 65, no. 1-2 (1983): 55-63.(b) Denizot, F.; Lang, R. *J. Immunol. Methods* 89, no. 2 (1986): 271-277.

alternativa al recuento de células por inclusión/exclusión de colorante, el control de la liberación de ^{51}Cr a partir de células lisadas, o la incorporación de [3H]-timidina en el ADN celular. El ensayo MTT es muy común en estudios de citotoxicidad por su precisión, rapidez y relativa sencillez. Además, resulta muy rentable debido al número de pruebas que se pueden realizar en un tiempo, eludiendo el problema de la presencia de radioisótopos o la eliminación de materiales contaminados.

Así, se han llevado a cabo ensayos de citotoxicidad de las nanopartículas recubiertas con el polímero PMAO y con TESPMA y funcionalizadas con RGD, para evaluar su viabilidad con la línea celular Vero mediante el método MTT.

III.1.1. Procedimiento experimental

Con la intención de mejorar la estabilidad de las nanopartículas en alguna de las muestras se llevó a cabo la funcionalización con un derivado del polietilenglicol, polietilenglicol metil éter amina (amino-PEG, $\text{C}_3\text{H}_9\text{ON}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$), bloqueando las cargas superficiales que puedan quedar libres tras la adición del *linker* y previamente al bloqueo con TRIS 1 M. El procedimiento es similar al descrito en el Capítulo I para la adición del linker a los grupos $-\text{COOH}$ mediante el método de las carbodimidias. Así, tras la activación de los grupos carboxílicos superficiales con la molécula de EDC, se adicionaron 10 μl de la molécula modificada con el grupo amino del *linker* dejando reaccionar durante 30 min. en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 10 μl de amino-PEG 0,1 mg/ml, dejando la mezcla en agitación durante 2 h. a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas las cargas con TRIS 1 M, se realiza limpieza y se adicionan las cantidades 0,1 ml de una disolución acuosa $4,4 \times 10^{-4}\text{M}$ del compuesto Arg-Gly-Asp-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂N₃ como se ha descrito previamente. La dispersión obtenida se nombra como Pol 43_PMAO_RGDPEG.

De forma similar se procedió para la adición de amino-PEG a las nanopartículas con TESPMA. En una disolución de 0,7 mg de NPs Fe₃O₄@TESPMA se adicionaron 100 μl de EDC 0,1 mg/ml y 10 μl de la molécula modificada con el grupo amino del *linker* dejando reaccionar

Ensayos Preclínicos

durante 2h. Posteriormente, se añadieron 10 µl de amino-PEG 0,1 mg/ml, dejando la mezcla en agitación durante 2 h. a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas las cargas con TRIS 1 M, se realiza limpieza y se adicionan las cantidades 0,1 ml de una disolución acuosa $4,4 \times 10^{-4}$ M del compuesto Arg-Gly-Asp-NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂N₃. Tras el proceso de limpieza final, la dispersión obtenida se nombra como Pol 43_TESPMA_RGDPEG.

Para ambas disoluciones de NPs se procedió a determinar la concentración de hierro mediante la técnica de espectroscopia UV-Vis utilizando el calibrado con el método KSCN (Anexo A.3).

Antes de comenzar el ensayo de citotoxicidad las NPs fueron esterilizadas haciéndolas pasar por un filtro de 0,2 µm bajo condiciones estériles dentro de una campana Telstar BIO IIA.

La preparación de los cultivos celulares se realizó de la forma siguiente. Las células crecieron en un medio DMEM (medio celular con glucosa, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico, bicarbonato sódico y L-Alanina-L-Glutamina) modificado con antibióticos (penicilina, estreptomina y glutamina). Se realizó en condiciones estériles la siembra de células Vero en una placa ELISA de 96 pocillos, sembrando 7500 células en un volumen de 100 µl por pocillo y teniendo en cuenta que cada concentración se repitió por quintuplicado con el fin de obtener una buena estadística.

Paralelamente, se preparó una disolución madre de la muestra a evaluar con una concentración de 1mg/ml Fe en medio de cultivo. Tras esterilizarla con un filtro de 0,2 µm, se prepararon finalmente diluciones a partir de ésta con concentraciones de 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 y 0,1 mg/ml Fe.

Una vez transcurridas 24 h de la incubación de las células a 37 °C en una atmósfera al 5% en CO₂, se intercambió el medio de cultivo por la correspondiente disolución de nanopartículas, salvo en el caso del control, que proporcionará el dato de 100% de viabilidad, donde se añadió medio de cultivo nuevo, y la placa se volvió a dejar incubando con las nanopartículas durante otras 24 h en las mismas condiciones. Finalmente, se sustituyó el contenido de cada pocillo por 200 µl de MTT (200 µg/ml en DMEM) y se dejó reaccionar durante 3 horas a 37 °C. Tras ese tiempo, el formazán creado en las células fue centrifugado a 1200 r.p.m. durante 1h y, posteriormente,

diluido añadiendo 0,3 ml de DMSO (dimetilsulfóxido) en cada placa para cuantificar la cantidad de cristales a 570 nm en un lector de microplacas Thermoscientific Multiscan Go.

Con los valores de absorbancia obtenidos y tomando como blanco la media de seis valores de absorbancia del DMSO, se calculó el porcentaje de viabilidad celular a partir de la siguiente expresión:

$$\%Viabilidad = \frac{A_m}{A_c} \times 100 \quad (3.1)$$

donde A_m y A_c son el valor medio de absorbancia de la muestra y del control, respectivamente. Para el cálculo de la desviación estándar relativa del parámetro de viabilidad, $\frac{\sigma_V}{V}$, se empleó la siguiente ecuación²⁹:

$$\frac{\sigma_V}{V} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_{A_m}}{A_m}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{A_c}}{A_c}\right)^2} \quad (3.2)$$

donde σ_{A_m} y σ_{A_c} son la desviación estándar de la absorbancia de la muestra y del control, respectivamente.

Los porcentajes de viabilidad celular que resultaron del ensayo MTT de nanopartículas para las distintas muestras se presentan en función de la concentración de hierro, donde las barras de error reflejan la desviación estándar relativa (Figura 3.3).

²⁹ Miller, J. C.; Miller, J. N. *Estadística para Química Analítica* (Wilmington, Delaware: Addison Wesley Iberoamerican, 1993).

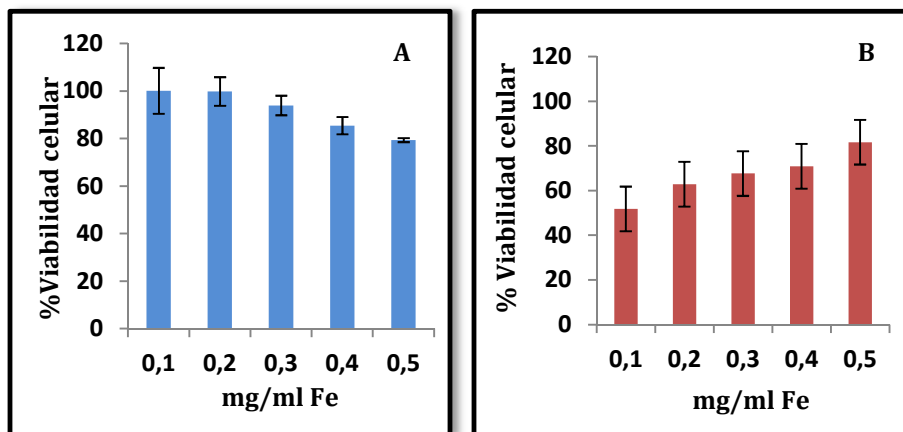


Figura 3.3. Ensayos MTT de citotoxicidad para las muestras (A) Pol 43_PMAO_RGDPEG y (B) Pol 43_TESPMA_RGDPEG.

Los niveles de muerte celular detectada en la muestra Pol 43_PMAO_RGDPEG, donde el tamaño del núcleo de magnetita medido por TEM es de 19 nm aprox., son despreciables a bajas concentraciones y en las más elevadas (0,5 mg/ml Fe) se obtienen valores de viabilidad celular superiores al 80%. Esto revela una mínima variación de la actividad metabólica celular en comparación con las células control, hecho que está en buen acuerdo con la respuesta citotóxica observada en estudios previos con NPs recubiertas con PEG³⁰, PMAO-PEG³¹ o carbohidratos³².

En el caso de las células tratadas con Pol 43_TESPMA_RGDPEG, la viabilidad celular va aumentando con la concentración de las mismas. Este resultado no es habitual y, podría ser explicado en base a las medidas de radio hidrodinámico en las que se observa que las NPs funcionalizadas con TESPMA muestran un alto grado de agregación (864,0±0,5 nm). Este hecho se traduce en una aglomeración sobre las células estudiadas y, con ello, una interferencia con el ensayo MTT utilizado. Por lo tanto, mientras que en el sistema NPs_PMAO_RGDPEG (Figura 3.3.A) el ensayo celular resulta

³⁰ (a) Niidome, T.; Yamagata, M.; Okamoto, Y.; Akimaya, Y.; Takahashi, H.; Kawano, T.; Katamaya, Y.; Niidome, Y.; J. Control. Rel. 114 (2006): 343-347. (b) De la Fuente, J. M.; Berry, C. C.; Riehle, M. O.; Curtis, A. S. G. Langmuir 22 (2006): 3286-3293.

³¹ Yu, W. W.; Chang, E.; Sayes, C. M.; Drezek, R.; Corvin, V. L. Nanotechnology 17 (2006): 4483-4487.

³² Rojo, J.; Díaz, V.; De la Fuente, J. M.; Segura, I.; Barrientos, A. G.; Riese, H. H.; Bernad, A.; Penadés, S. ChemBioChem 5 (2004): 291-297.

adecuado y reproducible, para el segundo caso (Figura 3.3.B) es difícil discernir el nivel de toxicidad celular que implican las NPs funcionalizadas con TESPMA.

Así, considerando los resultados obtenidos de los ensayos de citotoxicidad mostrados en el presente trabajo, se observa que, en general, las MNPs de 19 nm funcionalizadas con PMAO_RGDPEG analizadas, muestran un bajo potencial citotóxico sobre las células por lo que resultarían adecuadas para continuar con los ensayos *in vivo*.

III.2. Ensayos in vivo

Los llamados modelos *in vivo* o modelos animales, constituyen sistemas experimentales de gran utilidad en la investigación, por cuanto permiten la aplicación de técnicas de análisis que no pueden emplearse en humanos por razones éticas. Por otra parte, estos modelos brindan informaciones que no pueden ser obtenidas mediante técnicas *in vitro*, donde los resultados experimentales no siempre reproducen lo que ocurre en el organismo como un todo. El uso de animales de experimentación permite la caracterización del riesgo químico y es un paso imprescindible para cumplir con los requisitos legales. En las investigaciones farmacológicas, los ensayos con animales de experimentación resultan imprescindibles para la búsqueda y aplicación de posibles medidas terapéuticas encaminadas tanto a la prevención³³ como al tratamiento de las enfermedades³³. Estos ensayos, una vez realizados, permiten medir la eficacia y seguridad de determinado producto ya sea de origen sintético o natural, en diferentes patologías.

Con el fin de profundizar en el conocimiento acerca de aspectos tan dispares como la carcinogénesis, la respuesta a las drogas administradas, formación de metástasis, etc³⁴... dentro del área de la medicina oncológica, es posible trasplantar tejido tumoral al sitio anatómico apropiado en los animales, de manera que se desarrolle una metástasis de forma y localización similar a la que se observa en tumores en humanos.

³³(a)Guda, K.; Upender, M. B.; Belinsky, G.; Flynn, C.; Nakanishi, M.; Marino, J. N.; Ried, T.; Rosenberg, D. W. *Oncogene* 23 (2004): 3813–3821.(b) Corpet, D. E.; Pierre, F. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12 (2003): 391–400.

³⁴ Bibby, M. C.; Conors, T. *Eur. J. Cancer* 40 (2004): 852–857.

El modelo animal ideal debe replicar fielmente todos los aspectos del tumor desarrollado en humanos. Esto incluye la adquisición de una alteración genética con los cambios subsiguientes en el comportamiento celular y la biología tumoral³⁵. Además, el modelo tumoral debe ser práctico: el tumor tomado debe ser predecible y consistente, con una alta incidencia de afectación en animales en un estrecho margen de tiempo³⁶. Aunque los modelos utilizados habitualmente se aproximan a las características del cáncer humano, ninguno de los modelos reúne todos estos criterios. Por tanto, para cada cuestión experimental específica que se estudie, es necesario elegir el modelo más adecuado³⁷.

Los experimentos realizados en el presente estudio están enfocados a estudiar los efectos terapéuticos de las NPs magnéticas en hipertermia magnética en el cáncer colo-rectal. En este tipo de neoplasias, el 30-50% de los afectados desarrollan metástasis hepáticas que en un 15-25% están ya presentes en el momento del diagnóstico³⁸. Los tratamientos curativos que habitualmente se utilizan son la exéresis quirúrgica que ofrece tasas de supervivencia a los cinco años en torno al 25-58%³⁹ y en los casos no susceptibles de cirugía⁴⁰, la quimioterapia podría suponer una alternativa. Sin embargo los tiempos de supervivencia que se consiguen rondan los 10-17 meses⁴¹.

En este contexto, se han desarrollado nuevas opciones terapéuticas locales con las que se intenta conseguir supervivencias similares a las obtenidas con la cirugía. Estas terapias se encuadran en dos tipos de procedimientos que pueden incluso ser combinados, las técnicas de ablación

³⁵ Hann, B.; Balmain, A., *Current Opinion in Cell Biology* 13 (2001): 778-784.

³⁶ Rosenberg, M. P.; Bortner, D. *Cancer Metast. Rev.* 17 (1998): 295-299.

³⁷ Heijstek, M. W.; Kranenburg, O.; Borel Rinkes, I. H. M. *Dig. Surg.* 22 (2005): 16-25.

³⁸ (a) Ballantyne, G. H.; Quin, J. *Cancer* 71, no. 12 (1993):4252-66. (b) Millikan, K. W.; Staren, E. D.; Doolas, A. *Surg. Clin. North. Am.* 77, no.1 (1997):27-48.

³⁹ Haddad, A. J.; Bani Hani M.; Pawlik, T. M. *Int. J. Surg. Oncol.* (2011):285840.

⁴⁰ Penna, C.; Nordlinger, B. *British Medical Bulletin* 64, no. 1 (2002): 127-140.

⁴¹ (a) Spitz, F. R. *The M. D. Anderson Surgical Oncology Handbook* (Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 1999): 223-225. (b) Saltz, L. B.; Cox, J. V.; Blanke, C.; Rosen, L. S.; Fehrenbacher, L.; Moore, M. J.; Maroun, J. A.; Ackland, S. P.; Locker, P. K.; Pirota, N.; Elfring, G. L.; Miller, L. L. *N. Engl. J. Med.* 343, no. 13 (2000): 905-14. (c) Douillard, J. Y.; Cunningham, D.; Roth, A. D.; Navarro, M.; James R. D.; Karasek, P.; Jandik, P.; Iveson, T.; Carmichael, J.; Alakl, M.; Gruia, G.; Awad, L.; Rougier, P. *Lancet* 355, no. 9209 (2000): 1041-7.

percutánea y los procedimientos terapéuticos intrarteriales. En las técnicas de ablación percutánea las metástasis hepáticas se abordan directamente, para insertar en ellas agujas de diversos calibres con las que conseguir una necrosis tisular mediante un incremento térmico (termoablación mediada por radiofrecuencia o por microondas).

Por otro lado, en los procedimientos intrarteriales se administran por vía arterial hepática selectiva diferentes combinados terapéuticos, en un intento de abordar las neoplasias a través de su lecho vascular. Se han desarrollado varias terapias por vía intravascular a base de combinados de micropartículas embolizantes, agentes quimioterápicos o isótopos radiactivos. Sin embargo, el éxito de estos procedimientos es relativo. Todo ello obliga a seguir investigando sobre nuevas posibilidades terapéuticas como la utilización de termoterapias basadas en la aplicación de nanopartículas magnéticas⁴².

La aplicación de estas sustancias en la terapia oncológica se sustenta en dos tipos de procedimientos: la inyección directa en el lecho tumoral, o la administración intravascular con diferentes agentes dirigidos⁴³. En territorio hepático, resultaría una elección adecuada la administración intrarterial de las MNPs, dado que la vascularización de las metástasis e incluso de las micrometástasis depende del árbol arterial.

Entre algunos de los métodos más eficaces para la implantación de tumores se encuentra la implantación quirúrgica ortotópica de células tumorales con alto potencial metastatizante; por ejemplo, en el colon de ratones desnudos, lo que da lugar a una rápida y eficiente formación de numerosas metástasis en el hígado (100%), ganglios linfáticos y bazo⁴⁴.

⁴² Johannsen, M.; Gneveckow, U.; Thiesen, B.; Taymoorian, K.; Cho, C. H.; Waldöfner, N.; Scholz, R.; Jordan, A.; Loening, S. A.; Wust, P. *Eur. Urol.* 52, no. 6 (2007): 1653-62.

⁴³ (a) Hilger, I.; Hiergeist, R.; Hergt, R.; Winnefeld, K.; Schubert, H.; Kaiser, W. A. *Inv. Radiol.* 37, no. 10(2002): 580-6. (b) Moroz, P.; Metcalf, C.; Gray, B. N. *BioMetals* 1, no. 3(2003): 455-64.

⁴⁴ (a)Fu, X.; Herrera, H.; Kubota, T.; Hoffman, R. M. *Anticancer Res.* 12 (1992): 1395-1397. (b) Fu, X. Y.; Besterman, J. M.; Monosov, A.; Hoffman, R. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991): 9345-9349. (c) Rashidi, B.; Sun, F. X.; Jiang, P.; An, Z.; Gamagami, R.; Moossa, A. R.; Hoffman, R. M. *Anticancer Res.* 20 (2000): 715-720. (d) Fukurawa, T.; Kubota, T.; Watanabe, M.; Kuo, T. H.; Nishibori, H.; Kase, S.; Saikawa, S.; Tanino, H.; Teramoto, T.; Ishibiki, K. *Sur. Today* 23 (1993): 420-423. (e) Sun, F. X.; Sasson, A. R.; Jiang, P.; An, Z.;

También pueden inducirse metástasis hepáticas en el ratón por inyección intraesplénica o por inyección directa intraportal de células de cáncer colorectal, aunque la eficiencia de formación de metástasis es más baja⁴⁵. Estos modelos resultan muy adecuados tanto para estudiar muchos aspectos de la formación de metástasis, como para analizar la eficacia de nuevos agentes terapéuticos.

Así, el objetivo de este estudio está dirigido a provocar una necrosis térmica tumoral selectiva en las ratas que han desarrollado tumores hepáticos, mediante infusión de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con RGD y posterior exposición a un inductor de radiofrecuencia.

De este modo, se han realizado estudios de distribución y depósito de las NPs previamente y posteriormente al experimento de hipertermia, se han realizado estudios de hipertermia *in vivo* en ratas tumorales sin infusión de NPs y estudios de hipertermia *in vivo* en ratas tumorales infundidas con NPs administradas por vía intrarterial esplénica, por vía intrarterial femoral o inyección directa.

III.2.1. Procedimiento experimental

El estudio se llevó a cabo en ratas macho WAG / RijCrl, de cuatro meses de edad y un peso aproximado de 300 gramos, siguiendo el protocolo aprobado por el Comité de Ética para el Bienestar Animal (CEBA) de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU: CEBA/140/P02-01/2010/AlonsoVarona.

Para inducir los tumores colo-rectales en el hígado de los animales, estos se colocaron en posición decúbito supino bajo anestesia de isoflurano, se inocularon en el lóbulo hepático izquierdo mediante una inyección subcapsular de 0,05 ml ($5 \cdot 10^6$ células/ml) de solución de Hank que contiene las células singénicas de adenocarcinoma de colon (línea celular: CC-531) con una aguja de 27G.

Gamagami, R.; Li, L.; Moossa, A. R.; Hoffman, R. M. *Clin. Exp. Metastasis* 17 (1999): 41–48.(f)Zong, L. *Mol. Ther.* 9 (2004): 650–657.

⁴⁵ (a)Matsuda, I.; Konno, H.; Tanaka, T.; Nakamura, S. *Surg. Today* 31 (2001): 414–420.(b) Mayhew, E. G.; Goldrosen, M. H.; Vaage, J.; Rustum, Y. M. *J. Natl. Cancer Inst.* 78 (1987): 707–713.(c) Weese, J. L.; Emoto, S. E.; Sondel, P. M., *Dis. colon Rectum* 30 (1987): 503–507.

Durante el crecimiento del tumor, dentro de los implantes aparecen áreas de necrosis tisular; cuyo tamaño se correlaciona directamente con el volumen del tumor. Estos focos de necrosis son indistinguibles de los inducidos por hipertermia o cualquier otro tratamiento, por lo que es necesario establecer su extensión teórica antes de tratar los tumores. Para ello, se recurrió a la técnica de ultrasonidos para estimar el porcentaje de necrosis tumoral en estos tumores hepáticos utilizando un sistema clínico "XVision MyLab60" (Esaote) equipado con una sonda lineal multifrecuencia de 6-18MHz. Para realizar una estimación del valor de los volúmenes de los tumores se utilizó la fórmula: $[\pi/6 \times (A \times B \times C)]$, donde A, B y C son los diámetros más largos en proyección axial, coronal y sagital medidos en cm, de forma que el porcentaje de necrosis tumoral podría ser cuantificado mediante la fórmula: $\text{Necrosis (\%)} = 0,67 + [11,65 \times \text{Volumen tumoral (ml)}]^{46}$. Los implantes tumorales se dejaron evolucionar hasta los 35 días para lograr el volumen tumoral deseado. Se realizó el control ecográfico bajo anestesia de isoflurano y los animales que no desarrollaron tumor fueron descartados (Figura 3.4)

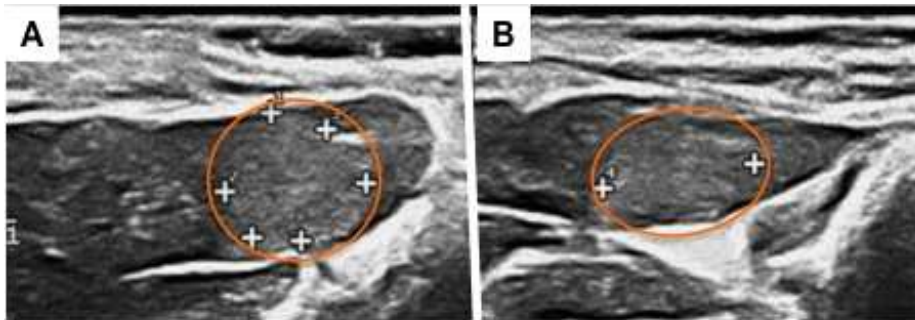


Figura 3.4. Imagen ecográfica de un corte longitudinal (A) y transversal (B) del hígado. La zona enmarcada por la elipse muestra un implante con un volumen de $0,8 \text{ cm}^3$.

En los animales que desarrollaron el tumor se procedió a la infusión de las NPs. Para ello se procedió a preparar disoluciones de NPs a partir de las muestras Pol 25_ PMAO_RGD, Pol 43_ PMAO_RGD y Pol 43_ PMAO_RGDPEG. Así, una vez determinada por espectroscopia UV-Vis la

⁴⁶ Echevarria, J. J.; Garcia-Alonso, I.; Herrero, B.; Aizpurua, J. M.; Saiz-López, A. *SERAM 2014. Sociedad Española de Radiología Médica* (2014).

Ensayos Preclínicos

concentración de hierro y, por tanto, de magnetita, se procedió a dispersar las muestras en una disolución 1/10 (v/v) de PBS 10 mM en agua destilada hasta alcanzar concentraciones en torno a 1 mg/ml de hierro.

La infusión de NPs en el hígado se llevó a cabo en el Departamento de Cirugía, Radiología y Medicina Física de la Facultad de Medicina de la UPV/EHU. La inyección se realizó bajo anestesia con diazepam (15mg/kg intraperitoneal), ketamina (80 mg/kg intraperitoneal) y medetomidina (0,5 mg/kg intraperitoneal). A través de una laparotomía media, se insertó una microcánula (0.014 "OD) en la arteria esplénica, y se colocó un videoclip Yasargil para estabilizarlo. Mediante la utilización de una bomba de infusión, se infundió 1 ml de solución salina o fluido magnético. Una vez que se eliminó la microcánula, se aplicó firmemente en el lugar de la punción durante cinco minutos una esponja de gelatina hemostática. Sin retirar el agente hemostático, se cerró la laparotomía, y se administraron analgésicos: meloxicam (2 mg/kg por vía subcutánea) más buprenorfina (0,05 mg/kg por vía subcutánea).

Una vez infundidas las NPs, en algunos casos se realizó estudios de resonancia magnética de imagen para observar la distribución de las NPs. Transcurridas 24 horas, las ratas se encuentran en buenas condiciones.

Los diferentes experimentos de hipertermia magnética se realizaron en un equipo específicamente diseñado para animales pequeños en el Departamento de Electricidad y Electrónica de la Facultad de Ciencia y Tecnología de UPV/EHU (Anexo A.10) (Figura 3.5). Así, los animales se someten a un inductor de radiofrecuencia, bajo anestesia general de Valium+Ketamina, con una frecuencia aplicada de 606 kHz y una intensidad de 14 kA/m hasta alcanzar 43°C en sensor de control y estabilización térmica, variando la intensidad (6-14 kA/m), hasta completar un total de 21 min .Para monitorizar la temperatura se insertaron sondas térmicas en hígado sano, tumor y recto/estómago. Cuando la tercera sonda estaba en el recto, ésta monitorizaba la temperatura central del animal fuera del campo magnético, y cuando estaba en estómago monitorizaba la temperatura del animal en el interior de la bobina inductora. Una cuarta sonda comprobaba la temperatura

ambiente en el inductor. En cada uno de los experimentos realizados se utilizaron dos ratas sin infundir como control.

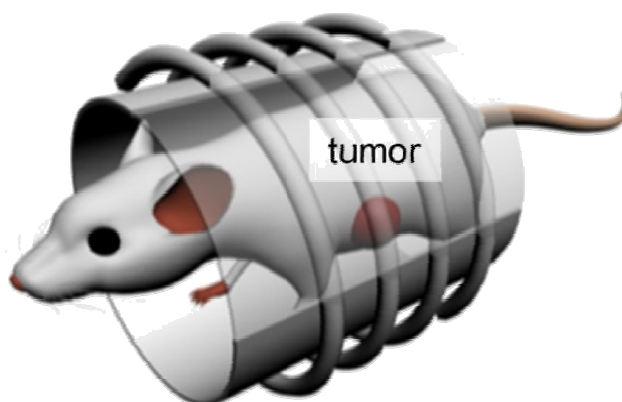


Figura 3.5. Esquema del tratamiento de hipertermia in vivo. Se sitúa la rata con el injerto tumoral dentro de una bobina de inducción.

Seguidamente, y después de transcurridas 24 h desde el experimento de hipertermia magnética, se programó el sacrificio de los animales. Se tomaron muestras de hígado y tumor para estudio histológico habitual y tinción de hierro en su caso.

III.2.2. Hipertermia magnética en ratas infundidas con NPs por inyección directa tumoral.

Los primeros ensayos realizados han ido dirigidos a testear la viabilidad de las NPs funcionalizadas en la consecución de hipertermia al ser inyectadas directamente en el tumor. Para ello se prepararon disoluciones de NPs a partir de la muestras Pol 43_ PMAO_RGD y Pol 43_ PMAO_RGDPEG. Para ello, una vez determinada la concentración de hierro y, por tanto, de magnetita, se procedió a dispersarlas en un medio salino que aporte una concentración de sales mínima necesaria a la muestra para que no resulte dañina en medio fisiológico, sin llegar a agregar las NPs. De este modo, se diluyó cada muestra en una disolución 1/10 (v/v) de PBS 10 mM (buffer salino de fosfato) en agua destilada hasta alcanzar concentraciones en torno a 1 mg/ml de hierro .

Ensayos Preclínicos

Así, la disolución Pol 43_PMAO_RGD en 1/10 PBS se infundió en dos animales (2N, 3N), con lesiones tumorales hepáticas de 35 días de evolución. En los animales 2V y 3R, se infundió la solución Pol 43_PMAO_RGDPEG en 1/10 PBS, mejorando su internalización. Los animales 1N y 3V sirvieron de control. En estos animales, se inyectó un volumen de suspensión de MNP proporcional al volumen del implante y que osciló entre el 50 y el 70%. En la Tabla 3.1 aparecen recogidas las condiciones en la que se realizaron los experimentos, así como la cantidad de Fe infundido.

Tabla 3.1. Condiciones del experimento de la infusión intratumoral de MNPs.

Animal (Peso en g)	Solución en 1/10 PBS	Vol. Tumoral (ml)	Fe infundido (mg)	Incidencias
2N (260)	Pol 43_PMAO_RGD	0,59	0,37	Infusión en 10 min
3N (300)	Pol 43_PMAO_RGD	0,46	0,41	Infusión en 10 min
2V (280)	Pol 43_PMAO_RGDPEG	1,26	1,05	Infusión en 10 min
3R (256)	Pol 43_PMAO_RGDPEG	0,63	0,53	Infusión en 10 min
1N.B (240)	-	0,43	-	
3V.B (290)	-	0,41	-	

Las ratas infundidas se colocaron en el inductor de radiofrecuencia y después de aplicarles una radiación electromagnética de 606 kHz en condiciones de campo de 14 kA, se sacrificaron y se realizaron los estudios histológicos para evaluar el grado de necrosis tumoral. Los resultados del experimento de hipertermia aparecen reflejados en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Resultados del experimento de hipertermia por infusión intratumoral de MNPs.

Animal	ΔT_{Recto} (°C)	$\Delta T_{\text{Hígado}}$ (°C)	ΔT_{Tumor} (°C)	Incidencias	Necrosis Tumoral (%)		Necrosis Hepática (%)
					Ultras.	Hist.	
2N	1,6	5,2	7,3	–	7	15	0
3N	2,9	8,7	8	–	6	20	1
2V	2,6	6,2	5,5	–	15	20	2
3R	2,3	5,4	6	–	8	5	2
1N.B	1,5	7,1	4,2	Muerte tras hipertermia	6	–	–
3V.B	1,0	6,8	7,4	Muerte tras hipertermia	5	–	–

Los animales no infundidos murieron en las horas siguientes a la aplicación de la hipertermia, lo cual podría ser debido al proceso de anestesia unido al posterior tratamiento de hipertermia. No se observan variaciones significativas en los incrementos de temperatura en los animales infundidos con las nanopartículas magnéticas con respecto a los de control, tanto en el hígado como en el tumor. Sin embargo, en los estudios histológicos relativos al grado de necrosis tumoral (Nec. Hist.) se observó cierto grado de destrucción tumoral extensa en tres animales (2N, 3N, 2V), superior a la esperable por su volumen tumoral valorado con ultrasonidos (% de Nec. Prob.). Los porcentajes de necrosis tumoral oscilaron entre el 5 y el 20% y, sin embargo, los resultados de la necropsia mostraron mínimas lesiones hepáticas (0-2%).

III.2.3. Estudio de la distribución de las nanopartículas en tejido hepático.

Sin embargo, el objetivo de esta investigación no era realizar hipertermia magnética en tumores después de realizar la infusión directa de las nanopartículas, si no que se trata de vehiculizar las NPs hacia la zona tumoral aprovechando la afinidad de las moléculas RGD por las integrinas sobreexpresadas y mediante una infusión intrarterial dirigir los fluidos hacia la

Ensayos Preclínicos

zona tumoral. Se ha procedido a realizar un estudio en este sentido por lo que, previamente a la hipertermia magnética, se requiere estudiar la distribución de las NPs en el tejido tumoral.

Con este objetivo se prepararon disoluciones de fluidos magnéticos con la muestras Pol 25_PMAO_RGD, que fueron infundidas en los animales 35 días después de la inducción tumoral. Para ello, se adicionaron a 1 ml de disolución PBS 1/10 las disoluciones acuosas de NPs obteniéndose concentraciones de Fe en el intervalo de 0,73-1,27mg/ml. Se realizó la infusión del fluido en cuatro ratas de laboratorio (3N, 4N, 3R, 4R) mediante vía intrarterial, utilizándose dos animales como control (2R, 3A) (Tabla 3.3). Se llevaron a cabo medidas de resonancia de imagen para comprobar la influencia de la presencia del Fe en la intensidad de la señal. La identificación de los depósitos de hierro en los hígados infundidos se llevó a cabo recogiendo muestras de hígado para el análisis por ICP y para la realización de los estudios histológicos, mediante necropsia inmediatamente después de la realización de la Resonancia Magnética (RM).

Tabla 3.3. Cuantificación mediante ICP-MS de la concentración de hierro en el tejido hepático sano y en el tejido tumoral.

Animal	Vol. Infus. (ml)	Fe infundido (mg)	[Fe] ($\mu\text{g/g}$)	
			Tejido hepático sano	Tejido Tumoral
3N	0,95	0,70	246,7	60,4
4N	0,62	0,62	223,9	80,2
3R	0,81	0,64	270,6	73,4
4R	0,55	0,70	331,4	71,0
2R (control)			138,3 ⁴⁷	71,56
3A (control)			138,3 ⁴⁷	26,44

⁴⁷ Echevarria, J. J.; García-Alonso Montoya, I.; Miguélez Vidales, J. L.; Sanz Sánchez, F.; Plazaola Muguruza, F.; Insausti Peña, M.; Etxebarria Loizate, N.; Fernández-Ruanova, B. *Radiología* 54, no. 3 (2012): 251-259.

En las primeras 12 horas tras la infusión de las NPs, se sometió a los animales a estudios de RM en un equipo Siemens Symphony a 1,5T. Se midieron las secuencias axial y coronal STIR, DP* y T2*, en busca de cambios en la intensidad de la señal compatibles con la presencia de nanopartículas de hierro. En la Figura 3.6 se muestran fotografías de las secuencias realizadas a tres de las ratas. Mediante la secuencia STIR se localizaron las masas tumorales hepáticas (círculo naranja), mientras que con las secuencias DP* (Figura 3.6.C y D) y T2* (Figura 3.6.E y F), específicas para la excitación del hierro, se valoró la variación en la hipointensidad por la posible acumulación de las nanopartículas funcionalizadas, tanto en el hígado sano como en el tumor.

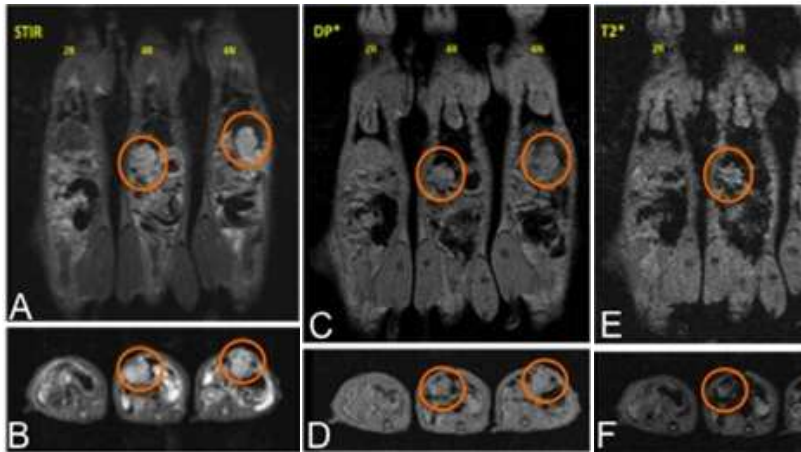


Figura 3.6. Secuencias STIR (A, B), DP*(C, D) y T2*(E, F) de RM de los animales 2R (control, izquierda), 4R (centro) y 4N (derecha). Los círculos naranjas enmarcan las metástasis hepáticas.

Se observa una caída de la intensidad de la señal en el parénquima hepático sano de las ratas con NPs infundidas que puede ser debida a una captación inespecífica del hierro por parte de las células de Kupffer. En el tejido tumoral apenas se observa caída de la hipointensidad, salvo en zonas periféricas y en algunos pequeños focos intratumorales, hecho indicativo de la escasa difusión de las partículas Pol 25_PMAO_RGD al interior del tumor, quedándose depositadas en el estroma fibrovascular peritumoral.

Para comprobar esta hechos se realizó el análisis de hierro mediante ICP-MS de los hígados de las ratas, obteniéndose los datos que aparecen reflejados en la Tabla 3.3. Aunque en todos los casos existe una cantidad de hierro endógeno presente en el organismo se puede observar una concentración de hierro hasta cuatro veces menor en el tejido tumoral que en el tejido hepático sano, deduciéndose que se produce la acumulación de NPs en el tejido sano. Además, en el hígado sano infundido con MNP se encontró una concentración de hierro de $268,2 \pm 46,3 \mu\text{g}$, aproximadamente el doble a la detectada en el tejido sano de animales que no recibieron aporte de hierro exógeno ($138,3 \pm 51,6 \mu\text{g}$)⁴⁷ y la concentración de hierro determinada en los implantes tumorales de ratas infundidas con Pol 25_PMAO_RGD ($71,3 \pm 8,2 \mu\text{g}$) era ligeramente superior a la cantidad de hierro encontrado en el tejido tumoral de los animales control ($49,0 \pm 31,9 \mu\text{g}$). Este hecho, parece indicar que aunque la mayoría de las nanopartículas se encuentran en el tejido sano, una parte de ellas quedaría adherida a los implantes tumorales.

Estos datos aparecen representados en el gráfico de barras de la Figura 3.7 y son indicativos de que al menos una parte de las nanopartículas funcionalizadas queda adherida a los implantes tumorales, a pesar de que la mayor parte del Fe se encuentra acumulado en el tejido sano.

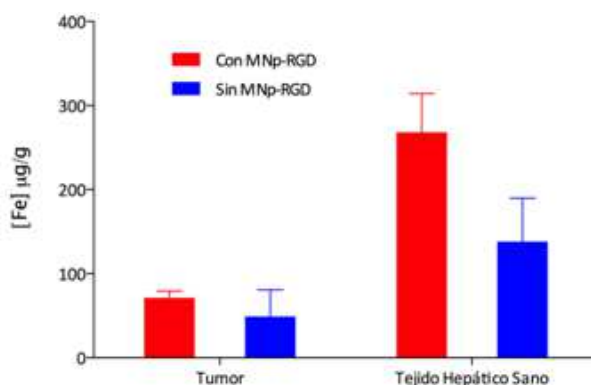


Figura 3.7. Gráfico de barras que representa la media y la SD de la concentración de hierro en microgramos por gramo de tejido tumoral y de tejido sano, de hígados infundidos con MNP-RGD (rojo) y no infundidos con MNP-RGD (azul).

Finalmente, se realizaron los estudios histológicos mediante tinción de Perl's con azul de Prusia, pigmento con alto contenido en ferrocianuro de potasio. En el organismo el hierro se puede encontrar tanto en forma férrica (Fe (III)) y ferrosa (Fe (II)). El ión férrico se tiñe por el método de Perl's, reaccionando con el ferrocianuro de potasio para dar un complejo de ferrocianuro férrico, de color azul brillante, de forma que los depósitos de hierro adquieren tonalidad azul. En la Figura 3.8 se aprecian cortes histológicos con diferentes depósitos de hierro.

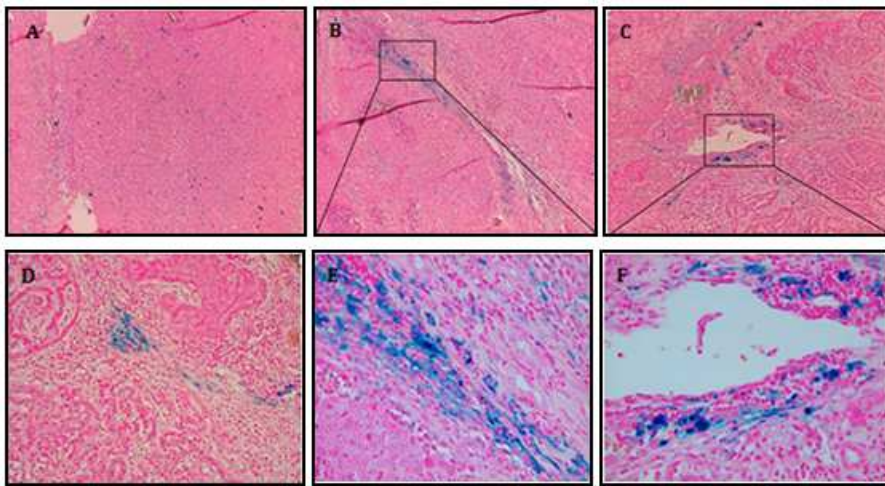


Figura 3.8. Cortes histológicos con tinción de azul de Prusia del hígado de la rata 4R. Fotografías A, B, C, D, E y F realizadas a 100, 100, 100, 200, 400 y 400, respectivamente.

En la Figura 3.8.A. se muestra el parénquima hepático sano con células de Kupffer teñidas de azul por los depósitos citoplasmáticos de hierro, de forma que las nanopartículas quedarían atrapadas por las células del sistema monocito-macrófago, sin poder depositarse en las estructuras vasculares. En la Figura 3.8.B-F se muestran distintas zonas con tinción azul que corresponden a los depósitos de hierro en el tejido fibrovascular en diferentes localizaciones: en el estroma fibrovascular peritumoral (Figura 3.8.B y E), en el límite entre tejido hepático sano y tumor (Figura 3.8.D), en el estroma fibrovascular de algunos ejes vasculares intratumorales y en el endotelio o

intersticio peri-endotelial de capilares tumorales (Figura 3.8.C y F). De esta forma se puede justificar los datos observados en resonancia de imagen en los que la reducción de la hipointensidad en el tejido tumoral era mínima y parecía localizarse en la periferia de los implantes y en algunos focos dispersos y sin embargo, en el tejido sano, se podía visualizar una gran caída de la intensidad.

III.2.4. Hipertermia magnética en ratas infundidas con NPs por vía intrarterial.

Se prepararon disoluciones con NPs recubiertas con PMAO y funcionalizadas con RGD (Pol 25_PMAO_RGD y Pol 43_PMAO_RGD) y otras a partir de nanopartículas funcionalizadas además con PEG (Pol 43_PMAO_RGDPEG) a las cuales se añadió 1 ml de la disolución 1/10 PBS. Se realizaron los análisis de hierro y se determinaron sus concentraciones obteniéndose valores de hierro en el intervalo de 1,1-1,5 mg/ml. Estos fluidos se infundieron en animales con lesiones tumorales hepáticas de 35 días de evolución, utilizando los animales 3A y 4R de control.

Así, las nanopartículas Pol 25_PMAO_RGD se infundieron a los animales 1V, 2V', 3V, 4V, 5V y las Pol 43_PMAO_RGD en las ratas 1A, 2A, 3A y 4N. Por otra parte, las disoluciones de la muestra Pol 43_PMAO_RGDPEG en 1/10 PBS se infundieron vía intrarterial en otros dos animales (1R y 4V'). Este último procedimiento se realizó añadiendo el PEG para intentar favorecer la internalización de las MNPs en el tumor además de realizar una exclusión vascular del lóbulo lateral izquierdo (LLI), mediante pinzado reversible del hilio vascular, con la intención de obtener una mayor migración de MNPs hacia el tumor. En la Tabla 3.4 aparecen recogidas las características de los animales utilizados, así como los volúmenes y cantidades de disolución inyectadas.

Tabla 3.4. Condiciones de la infusión intrarterial de las MNPs.

Animal (Peso en g)	Solución En 1/10 PBS	Vol. Tumoral (ml)	Fe infundido (mg)	Incidencias
1V (275)	Pol 25_RGD	0,43	1,5	Infusión en 10 min
2V' (295)	Pol 25_RGD	0,55	1,5	Infusión en 10 min
3V (252)	Pol 25_RGD	0,48	1,5	Se extravasa muestra
4V (270)	Pol 25_RGD	0,26	1,5	Infusión en 10 min
5V (275)	Pol 25_RGD	0,60	1,5	Infusión en 10 min
1A (230)	Pol 43_RGD	0,22	1,3	Infusión en 10 min
2A (256)	Pol 43_RGD	0,42	1,1	Infusión en 10 min
3A (273)	Pol 43_RGD	0,45	1,3	Infusión en 10 min
4N (276)	Pol 43_RGD	0,83	1,3	Infusión en 10 min
1R (200)	Pol 43_RGDPEG	0,61	1,3	Infusión en 10 min
4V' (220)	Pol 43_RGDPEG	0,49	1,1	Muerte tras infusión
3A.B (260)	–	0,34	–	
4R.B (300)	–	0,26	–	

Aunque en algunos de los ensayos realizados previamente, algunas de las disoluciones causaron trombos o quemaduras químicas en el lugar de la infusión, en estos ensayos en los que se han infundidos las nanopartículas, a través de la arteria esplénica, directamente en la arteria hepática, no se observaron singularidades excepto en el caso del fallecimiento del animal 4V', que pudo ser debido a la anestesia o a la técnica de infusión.

Ensayos Preclínicos

Las ratas infundidas se colocaron en el inductor de radiofrecuencia y se les aplicó una radiación electromagnética de 606 kHz y un campo magnético de 14 kA. La rata nombrada como 3V murió tras finalizar el procedimiento de hipertermia, probablemente debido al extravasado de nanopartículas que se produjo alrededor del tronco celiaco. Todos los animales se sacrificaron entre 3 y 7 horas tras la hipertermia. Los implantes tumorales fueron separados del tejido hepático del lóbulo lateral izquierdo y divididos en dos mitades, para análisis histológico con objeto de evaluar el grado de necrosis tumoral, y para el análisis por ICP-MS. Los resultados del experimento de hipertermia aparecen reflejados en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Resultados del experimento de hipertermia por infusión intrarterial de las nanopartículas.

Animal	ΔT_{Recto} (°C)	ΔT_{Higado} (°C)	ΔT_{Tumor} (°C)	Incidencias	Necrosis Tumoral (%)		Necrosis Hepática (%)
					Ultras.	Hist.	
1V	2,9	9,0	9,1	–	6	91	10
2V'	3,2	7,1	8,2	–	7	99	3
3V	5,5	11,6	12,1	Muerte tras hipertermia	6	85	5
4V	6,5	8,9	6,8	–	4	3	7
5V	8,0	9,1	8,9	–	8	7	9
1A	2,0	8,2	9,0	–	3	25	30
2A	3,1	7,0	9,8	–	6	40	20
3A	3,8	6,3	7,2	–	6	15	0
4N	4,9	7,8	7,4	–	10	13	3
1R	2,2	6,6	6,3	–	8	5	10
4V'	–	–	–	–	6	–	4
3A.B	3,2	6,0	5,9	–	5	3	
4R.B	2,1	6,4	5,8	–	4	0	

En lo referente al aumento de temperatura puede observarse que la aplicación de un campo magnético alterno genera incrementos de temperatura de hasta 5.9°C en animales sin nanopartículas. Sin embargo este incremento es superior en los animales a los que se les han inyectado las nanopartículas y además, son en general superiores en los animales V, en los cuales se inyectaron más cantidad de nanopartículas. Por otra parte, se pudo observar que ese calentamiento se produce de forma similar en la zona tumoral o en el tejido hepático sano, a pesar de haber demostrado anteriormente que la cantidad mayor de nanopartículas se concentra en la zona sana absorbidas, principalmente, por las células de Kupffer.

En los estudios histológicos relativos al grado de necrosis tumoral se observó una destrucción tumoral extensa en tres animales (1V, 2V', 3V), muy superior a lo esperable por su volumen tumoral valorado con ultrasonidos (% de Nec. Prob.) (Figura 3.9), prácticamente sin ocasionar daño manifiesto en el tejido hepático sano.

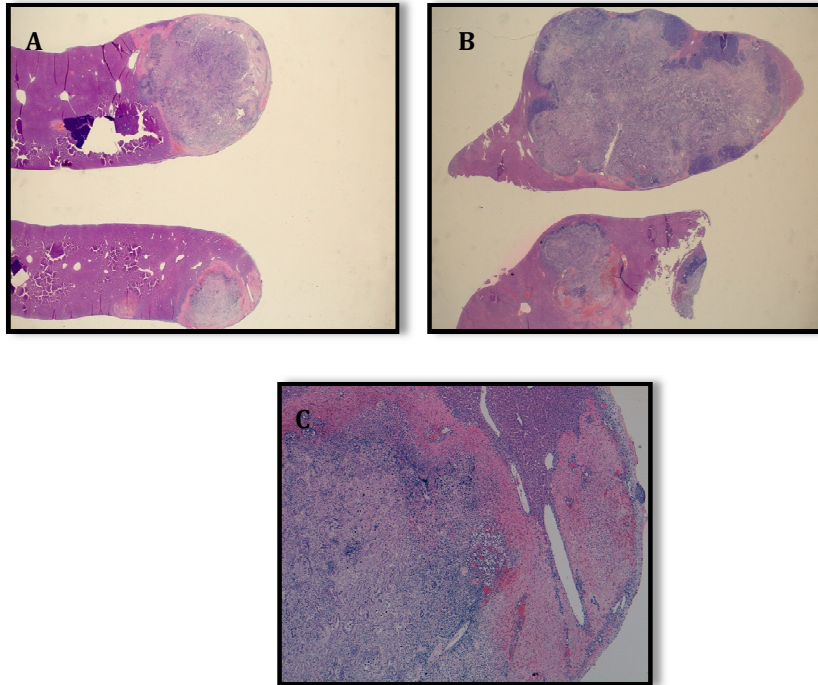


Figura 3.9. Macrofotografía de las ratas 2V' (A) y 3V (B). Necrosis tumoral (azul pálido) muy extensa y focos de tumor viable (azul oscuro). Banda de necrosis de hepatocitos peri-tumorales (rosa claro) en 2V'. C) Rata 2V'. 4x. Necrosis tumoral, resto tumoral viable y necrosis de hepatocitos peri-tumorales.

En los estudios histológicos del tejido hepático, solo se observó necrosis de hepatocitos peri-tumorales en los animales 2V' y 3V. En las otras ratas no se observaron lesiones supuestamente por calor en el hígado sano. Los porcentajes de necrosis hepática oscilaron entre el 0 y el 30%.

III.3. Discusión

Las muestras utilizadas para los estudios de citotoxicidad consisten en partículas con un tamaño medio de 19 nm aproximadamente cuyos tamaños hidrodinámicos oscilan entre 100 y 120 nm en el caso de la muestra Pol 43 o Pol 25 con PMAO y mayor de 1000 nm en el caso de la muestra Pol 43 con TESPMA. Este último con menor carga superficial negativa debido al menor número de grupos carboxilos.

El test de supervivencia celular de las células Vero mediante los ensayos MTT mostró que las partículas de magnetita recubiertas de ácido Poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO) y funcionalizadas con RGD y PEG no son tóxicas para las células en el intervalo de concentraciones desde 0,1 a 0,5 mg Fe/ml. Sin embargo, el método MTT para las NPs de magnetita recubiertas de TESPMA resultó inconcluyente debido a su alta agregación.

Los resultados obtenidos en el ensayo MTT demuestran que las partículas recubiertas por PMAO, unido a moléculas del RGD modificado y al PEG se pueden utilizar para diversas aplicaciones biomédicas que requieran su internalización celular. Anteriormente ya se había demostrado que las partículas recubiertas con PMAO tampoco tuvieron efectos citotóxicos para las células³¹.

Respecto a las pruebas *in vivo*, y en el caso de las inyecciones intratumorales no se apreciaron claras diferencias en los incrementos térmicos de los animales. Además, los resultados de la necropsia mostraron mínimas lesiones hepáticas. Los porcentajes de necrosis tumoral oscilaron entre el 15 y el 20%.

Los estudios de biodistribución de las nanopartículas funcionalizadas con RGD y estabilizadas para soportar un medio fisiológico, han demostrado un comportamiento satisfactorio, adhiriéndose parcialmente al tejido tumoral. Aunque la mayor cantidad de hierro ha resultado fagocitado por las células de Kupffer del hígado sano, las MNPs-RGD también se han depositado selectivamente en el espacio intersticial de los lechos tumorales debido a la especial afinidad de los péptidos RGD por las integrina $\alpha_v\beta_3$ sobreexpresadas en los mismos⁴⁸.

La técnica de exclusión vascular del lóbulo lateral izquierdo hepático fue inefectiva a la hora de conseguir evitar el aporte arterial de MNPs. Parece que la técnica excluyó el flujo venoso, pero no el arterial.

⁴⁸(a)Hutteman, M.; Mieog, J. S. D.; Van der Vorst, J.R.; Dijkstra, J.; Kuppen, P. J. K.; Van der Laan, A. M. A. *Eur. J. Surg. Oncol.* 37, no. 3 (2012): 252–257.(b) Wu, Y.; Cai, W.; Chen, X. *Mol. Imaging Biol.* 8, no. 4 (2006): 223–226.

Por otro lado, en las ratas infundidas por vía intrarterial con la suspensión PEGilada, se apreció hierro hepático en cantidad similar a lo apreciado en los experimentos anteriores. La suspensión usada no parece disminuir la captación de las MNPs por los macrófagos.

Se ha observado que aunque los incrementos de temperaturas son similares en el tejido hepático sano y en el tumoral, el grado de necrosis tumoral alcanzado es muy superior, de forma que parece que se estuviera evitando un sobrecalentamiento de este tejido hepático debido a dos fenómenos diferentes. En primer lugar, el flujo sanguíneo portal puede funcionar eficazmente como un intercambiador de calor, refrigerando el tejido calentado por las nanopartículas. Y, por otra parte, si las NPs se internalizan en la célula pueden ser modificadas por los lisosomas y perder capacidad de movimiento, por lo que los tiempos de relajación cambiarían drásticamente y, por lo tanto, también su capacidad de calentamiento⁴⁹.

Por otra parte, se ha puesto de manifiesto la destrucción del tejido tumoral en 3 animales sin ocasionar daño manifiesto en el tejido hepático sano. Sin embargo, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las tinciones de Perl's y en ICP-MS, serían factores de diferente naturaleza los que habría que considerar para explicar ese efecto. Así se puede mencionar, el calentamiento inducido por las corrientes de Foucault generadas en el equipo inductor de radiofrecuencia, la mayor sensibilidad térmica de las células tumorales frente a las sanas o la vascularización tumoral intrínsecamente deficiente.

Tomando en consideración todos estos datos, y con la finalidad de mejorar la afinidad selectiva de las MNPs-RGD, sería preciso encontrar un mecanismo para evitar que las MNPs-RGD sean atrapadas por las células de Kupffer, bien inhibiendo específicamente su actividad o bien saturándolas de hierro con bajas tasas de absorción específica (SAR), administrado previamente a la infusión de las MNPs-RGD. Además, habría que conseguir un depósito intratumoral homogéneo, hecho complicado debido a la pobre

⁴⁹(a)Kolosnaja-Tabi, J.; Di Corato, R.; Lartigue, L.; Marangon, I.; Guardia, P.; Silva, A. K A.; Luciani, N.; Clément, O.; Flaud, P.; Singh, J. V.; Decuzzi, P.; Pellegrino, T.; Wilhelm, C.; Gazeau, F. *ACS Nano* 8, no. 5 (2014): 4268-4283.(b) Lévy, M.; Gazeau, F.; Bacri, J. C.; Wilhelm, C.; Devaud, M. *Phys. Rev. B* 84, no. 7 (2011).

vascularización del tejido tumoral, pero que se podría lograr en parte si se consiguieran infundir suspensiones con mayor concentración de nanopartículas de hierro. Todas estas cuestiones son las que quedan abiertas y planteadas al dar por finalizar este trabajo y requerirían de una continuación en la investigación en esta línea de trabajo.

III.4. Bibliografía

- AshaRani, P. V.; Low KahMun, G.; Hande, M. P.; Valiyaveettil, S. *ACS Nano* 3 (2009): 279–290.
- Au, C.; Mutkus, L.; Dobson, A.; Riffle, J.; Lalli, J.; Aschner, M. *Biol. Trace Elem. Res.* 120 (2007): 248–256.
- Auffan, M.; Rose, J.; Wiesner, M. R.; Bottero, J. Y. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 157 (2009): 1127–1133.
- Avdeev, M. V.; Mucha, B.; Lamszus, K.; Vékás, L.; Garamus, V. M.; Feoktystov, A. V.; Marinica, O.; Turcu, R.; Willumeit, R. *Langmuir* 26 (2010): 8503–8509.
- Ballantyne, G. H.; Quin, J. *Cancer* 71, no. 12 (1993):4252-66.
- Berwald, Y.; Sachs, L. *Nature* 200 (1963): 1182–1184.
- Bibby, M. C.; Conors, T. *Eur. J. Cancer* 40 (2004): 852–857.
- Cambier, J. C.; Gauld, S. P.; Merrell, K. T.; Vilen, B. J. *Nature Reviews Immunology* 7 (2007): 633-643.
- Cheng, F. Y.; Su, C. H.; Yang, Y. S.; Yeh, C. S.; Tsai, C. Y.; Wu, C. L.; Wu, M. T.; Shieh, D. B. *Biomaterials* 26 (2005): 729–738.
- Choi, S. J.; Oh, J.M.; Choy, J. H. *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009): 463–471.
- Corpet, D. E.; Pierre, F. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12 (2003): 391–400.
- De la Fuente, J. M.; Berry, C. C.; Riehle, M. O.; Curtis, A. S. G. *Langmuir* 22 (2006): 3286-3293.
- Denizot, F.; Lang, R. *J. Immunol. Methods* 89, no. 2 (1986): 271–277.
- Díaz, E.; García, J. *Oncología Clínica Básica* (Madrid, España: Arán Ediciones, 2000): 346-348.
- Douillard, J. Y.; Cunningham, D.; Roth, A. D.; Navarro, M.; James R. D.; Karasek, P.; Jandik, P.; Iveson, T.; Carmichael, J.; Alakl, M.; Gruia, G.; Awad, L.; Rougier, P. *Lancet* 355, no. 9209 (2000): 1041-7.
- Doyle, A. Griffiths, J. B.; Newell, D. G.; *Cell and tissue culture: laboratory procedures* (New York, New Jersey: John Wiley and Sons, 1995).
- Echevarría, J. J.; García-Alonso Montoya, I.; Miguélez Vidales, J. L.; Sanz Sánchez, F.; Plazaola Muguruza, F.; Insausti Peña, M.; Etxebarria

- Loizate, N.; Fernández-Ruanova, B. *Radiología* 54, no. 3 (2012): 251–259.
- Echevarria, J. J.; Garcia-Alonso, I.; Herrero, B.; Aizpurua, J. M.; Saiz-López, A. *SERAM 2014. Sociedad Española de Radiología Médica* (2014).
- Fu, X. Y.; Besterman, J. M.; Monosov, A.; Hoffman, R. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991): 9345–9349.
- Fu, X.; Herrera, H.; Kubota, T.; Hoffman, R. M. *Anticancer Res.* 12 (1992): 1395–1397.
- Fukurawa, T.; Kubota, T.; Watanabe, M.; Kuo, T. H.; Nishibori, H.; Kase, S.; Saikawa, S.; Tanino, H.; Teramoto, T.; Ishibiki, K. *Sur. Today* 23 (1993): 420–423.
- Guda, K.; Upender, M. B.; Belinsky, G.; Flynn, C.; Nakanishi, M.; Marino, J. N.; Ried, T.; Rosenberg, D. W. *Oncogene* 23 (2004): 3813–3821.
- Haddad, A. J.; Bani Hani M.; Pawlik, T. M. *Int. J. Surg. Oncol.* (2011):285840.
- Hann, B.; Balmain, A., *Current Opinion in Cell Biology* 13 (2001): 778–784.
- Heijstek, M. W.; Kranenburg, O.; Borel Rinke, I. H. M. *Dig. Surg.* 22 (2005): 16–25.
- Hildebrand, H.; Kühnel, D.; Potthoff, A.; Mackenzie, K.; Springer, A.; Schirmer, K. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 158 (2010): 65–73.
- Hilger, I.; Hiergeist, R.; Hergt, R.; Winnefeld, K.; Schubert, H.; Kaiser, W. A. *Inv. Radiol.* 37, no. 10(2002): 580-6.
- Hutteman, M.; Mieog, J. S. D.; Van der Vorst, J.R.; Dijkstra, J.; Kuppen, P. J. K.; Van der Laan, A. M. A. *Eur. J. Surg. Oncol.* 37, no. 3 (2012): 252–257.
- Johansen, M.; Gneveckow, U.; Thiesen, B.; Taymoorian, K.; Cho, C. H.; Waldöfner, N.; Scholz, R.; Jordan, A.; Loening, S. A.; Wust, P. *Eur. Urol.* 52, no. 6 (2007): 1653-62.
- Jordan, A.;Scholz, R.; Wust, P.; Fahling, H.; Krause, J.; Wlodarczyk, W.; Sander, H.; Vogl, T.; Felix, R. *Int. J. Hyperthermia* 13, no. 6 (1997): 587-605.
- Jung, C. W. *Magn. Reson. Imaging.* 13 (1995):675–91.

- Karlsson, H. L.; Cronholm, P.; Gustafsson, J.; Möller, L. *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008): 1726–1732.
- Kellar, K. E.; Fujii, D. K.; Gunther, W. H.; Briley-Saebo, K.; Bjornerud, A.; Spiller, M.; Koenig S. H. *J. Magn. Reson. Imaging.* 11 (2000):488–94.
- Kim, J. E.; Shin, J. Y.; Cho, M. H. *Arch. Toxicol.* 86 (2012): 685–700.
- Kolosnjaj-Tabi, J.; Di Corato, R.; Lartigue, L.; Marangon, I.; Guardia, P.; Silva, A. K. A.; Luciani, N.; Clément, O.; Flaud, P.; Singh, J. V.; Decuzzi, P.; Pellegrino, T.; Wilhelm, C.; Gazeau, F. *ACS Nano* 8, no. 5 (2014): 4268–4283.
- Kunzmann, A.; Andersson, B.; Vogt, C.; Feliu, N.; Ye, F.; Gabrielsson, S.; Toprak, M.S .; Buerki-Thurnherr, T.; Laurent, S.; Vahter, M. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253 (2011): 81–93.
- Lévy, M.; Gazeau, F.; Bacri, J. C.; Wilhelm, C.; Devaud, M. *Phys. Rev. B* 84, no. 7 (2011).
- Maier-Hauff, K.; Ulrich, F.; Nestler, D.; Niehoff, H.; Wust, P.; Thiesen, B.; Orawa, H.; Budach, V.; Jordan, A. *J. Neurooncol.* 103 (2011):317–324.
- Martínez, P. A.; Navarro, M. A. *Rev. Oncol.* 5, no. 4 (2003):184-191.
- Matsuda, I.; Konno, H.; Tanaka, T.; Nakamura, S. *Surg. Today* 31 (2001): 414–420.
- Maurici, D.; Aardema, M.; Corvi, R.; Cléber, M.; Krul, C.; Laurent, C.; Loprieno, N.; Pasanen, M.; Pfuhrer, S.; Phillips, B.; Sabbioni, E.; Sanner, T.; Vanparys, P. *Altern. Lab. Anim.* 33, no. 1 (2005): 117–130.
- Mayhew, E. G.; Goldrosen, M. H.; Vaage, J.; Rustum, Y. M. *J. Natl. Cancer Inst.* 78 (1987): 707–713.
- Miller, J. C.; Miller, J. N. *Estadística para Química Analítica* (Wilmington, Delaware: Addison Wesley Iberoamerican, 1993).
- Millikan, K. W.; Staren, E. D.; Doolas, A. *Surg. Clin. North. Am.* 77, no.1 (1997):27-48.
- Moroz, P.; Metcalf, C.; Gray, B. N. *BioMetals* 1, no. 3(2003): 455-64.
- Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* 65, no. 1-2 (1983): 55-63.
- Niidome, T.; Yamagata, M.; Okamoto, Y.; Akimaya, Y.; Takahashi, H.; Kawano, T.; Katamaya, Y.; Niidome, Y.; *J. Control. Rel.* 114 (2006): 343-347.

- Penna, C.; Nordlinger, B. *British Medical Bulletin* 64, no. 1 (2002): 127–140.
- Pfaller, T.; Colognato, R.; Nelissen, I.; Favilli, F.; Casals, E. Ooms, D.; Leppens, H.; Ponti, J.; Stritzinger, R.; Puntès, V. *Nanotoxicology* 4 (2010): 52–72.
- Pisanic, T. R.; Jin, S.; Shubayev, V. I. *Nanotoxicity: From Health Risk to In Vitro and In Vivo Models, Nanotoxicity* (Laurel and Little Rock, USA: John Wiley & Sons, 2009).
- Pocard, M.; Isukui, H.; Salmon, R. J.; Dutrillaux, B.; Poupon, M. F. *In Vivo* 10 (1996): 463–469.
- Rashidi, B.; Sun, F. X.; Jiang, P.; An, Z.; Gamagami, R.; Moossa, A. R.; Hoffman, R. M. *Anticancer Res.* 20 (2000): 715–720.
- Rajo, J.; Díaz, V.; De la Fuente, J. M.; Segura, I.; Barrientos, A. G.; Riese, H. H.; Bernad, A.; Penadés, S. *ChemBioChem* 5 (2004): 291-297.
- Rosenberg, M. P.; Bortner, D. *Cancer Metast. Rev.* 17 (1998): 295.299.
- Saltz, L. B.; Cox, J. V.; Blanke, C.; Rosen, L. S.; Fehrenbacher, L.; Moore, M. J.; Maroun, J. A.; Ackland, S. P.; Locker, P. K.; Pirota, N.; Elfring, G. L.; Miller, L. L. *N. Engl. J. Med.* 343, no. 13 (2000): 905-14.
- Soenen, S.; De Cuyper, M. *Contrast Media Mol. Imaging* 4 (2009): 207–219.
- Soenen, S.; De Cuyper, M. *Nanomedicine* 5 no. 8(2010):1261-1275.
- Spitz, F. R. *The M. D. Anderson Surgical Oncology Handbook* (Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 1999): 223-225.
- Sun, F. X.; Sasson, A. R.; Jiang, P.; An, Z.; Gamagami, R.; Li, L.; Moossa, A. R.; Hoffman, R. M. *Clin. Exp. Metastasis* 17 (1999): 41–48.
- Valdiglesias, V.; Costa, C.; Sharma, V.; Kiliç, G.; Pásaro, E.; Teixeira, J.P.; Dhawan, A.; Laffon, B. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 57 (2013): 352–361.
- Wang, B.; Feng, W.; Zhu, M.; Wang, Y.; Wang, M.; Gu, Y.; Ouyang, H.; Wang, H.; Li, M.; Zhao, Y. *J. Nanopart. Res.* 11 (2009): 41–53.
- Warheit, D. B., *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 101 (2008): 183–185.
- Weese, J. L.; Emoto, S. E.; Sondel, P. M., *Dis. colon Rectum* 30 (1987): 503–507.
- Wu, Y.; Cai, W.; Chen, X. *Mol. Imaging Biol.* 8, no. 4 (2006): 223–226.

- Xiao-Feng, P., Bo, D; Qiang, Z. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9 (2009): 1369–1373.
- Xuan, S.; Wang, F.; Lai, J. M. Y.; Sham, K. W. Y.; Wang, Y. X. J.; Lee, S. F.; Yu, J. C.; Cheng, C. H. K.; Leung, K. C. F. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3 (2011): 237–244.
- Yang, L.; Xia, Y.; Zhao, H.; Zhao, J.; Zhu, X. *J. Huazhong Univ. Sci. Techn. Med. Sci.* 26 (2006):489–92.
- Yu, W. W.; Chang, E.; Sayes, C. M.; Drezek, R.; Corvin, V. L. *Nanotechnology* 17 (2006): 4483-4487.
- Zhang, D.; Luo, G.; Ding, X.; Lu, C. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2 no. 6 (2012): 549-561.
- Zhao, J.; Castranova, V. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 14 (2011): 593–632.
- Zhu, M. T.; Feng, W. Y.; Wang, B.; Wang, T. C.; Gu, Y. Q.; Wang, M.; Wang, Y.; Ouyang, H.; Zhao, Y. L.; Chai, Z. F. *Toxicology* 247 (2008): 102–111.
- Zong, L. *Mol. Ther.* 9 (2004): 650–657.

CONCLUSIONES

Del estudio llevado a cabo sobre los diferentes sistemas de magnetita nanoparticulada preparados se han podido extraer las siguientes conclusiones:

- El método de *descomposición térmica* y las sucesivas adiciones de reactivos permiten preparar nanopartículas de magnetita de tamaño controlado en el intervalo de 6 a 40 nm.

- Empleando $\text{Fe}(\text{CO})_5$ como precursor es posible preparar nanopartículas con diámetros relativamente grandes sin perder la estabilidad necesaria para posibles aplicaciones biomédicas y con una buena respuesta en hipertermia magnética.

- Los materiales así preparados presentan una elevada cristalinidad y pureza, lo que les proporciona elevadas imanaciones de saturación, comparables a las de la magnetita en estado masivo. En las medidas ZFC/FC se comportan como los sistemas biomineralizados, permitiendo observar la transición de Verwey.

- Los polímeros anfifílicos como el *PMAO* permiten estabilizar las nanopartículas de magnetita obtenidas mediante el método de descomposición térmica en medio fisiológico. Además, reducen la constante de anisotropía efectiva de las partículas dando lugar a un incremento significativo de su *índice específico de absorción (SAR)*.

- La *Espectroscopia de Masas-MALDI* ha demostrado ser una buena alternativa a distintos ensayos colorimétricos específicos para determinados aminoácidos con el fin de comprobar la presencia del RGD modificado en los sistemas nanoparticulados en los que se obtiene un bajo rendimiento en la funcionalización.

- La *Resonancia Magnética Electrónica (RME)* permite evaluar la polidispersidad de las partículas en suspensión. En muestras de elevada homogeneidad pueden correlacionar muy bien los valores de *g efectivo* con los diámetros de partícula determinados por TEM.

- El tamaño de partícula, el valor de *g efectivo* y la potencia de absorción de microondas se relacionan claramente en muestras con una

distribución de tamaños estrecha y sin agregaciones. Las partículas con diámetros en torno a 18 nm permiten conseguir elevados valores de SAR.

- La estabilidad coloidal de las nanopartículas es un factor que condiciona de manera fundamental la aplicabilidad de estos sistemas, determinando en primer lugar su propia viabilidad celular.

- La estabilidad coloidal de los sistemas estudiados decrece rápidamente al superar las nanopartículas un diámetro crítico de aproximadamente 20 nm por efecto de las interacciones dipolares que favorecen la agregación de las NPs.

- Los primeros experimentos de biodistribución realizados en tejido hepático de rata *in vivo* han demostrado que las nanopartículas de magnetita estabilizadas en medio fisiológico y funcionalizadas con RGD se adhieren al tejido tumoral, sin ser capturadas en su totalidad por las células de Kupffer.

- Los experimentos de hipertermia magnética con infusión intrarterial *in vivo* muestran que con las NPs seleccionadas es posible provocar un alto grado de necrosis tumoral sin deteriorar el tejido hepático sano.

ANEXOS

A. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

B. REACTIVOS

C. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

ANEXO A.

Técnicas Experimentales

En este anexo se incluyen las condiciones de medida y una descripción teórica de las técnicas experimentales empleadas en esta investigación. Se comenzará con la exposición de las técnicas de uso más habituales, tales como el Análisis Termogravimétrico, Espectroscopia IR, Espectroscopia UV-Vis y Espectroscopia Masas-MALDI, Difracción de Rayos X, Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y la Dispersión Dinámica de Luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS). Se describirán después los fundamentos de la técnica de Resonancia Magnética Electrónica (RME) y los aspectos básicos de los dos tipos de magnetómetros que se han usado en este trabajo, SQUID y VSM. Además, se incluirá una explicación más detallada de los fenómenos físicos que dan lugar a las curvas ZFC/FC en sistemas nanoparticulados y, asimismo, el modelo cuantitativo SPM para partículas no interaccionantes que se ha empleado en el análisis de las curvas ZFC/FC y M(H). Finalmente, se describirá el sistema utilizado para las medidas de Hipertermia Magnética, con un repaso de la teoría de la absorción de energía magnética en partículas monodominio sometidas a una excitación AC. A diferencia del resto de la memoria, donde en las secciones dedicadas al estudio magnético se ha empleado el sistema de unidades *CGS gaussiano*, las ecuaciones que describen la absorción de energía magnética están en unidades del *Sistema Internacional* de medida (S.I).

A.1. Análisis Termogravimétrico (TGA)

Los análisis termogravimétricos se han realizado con objeto de conocer la estabilidad del producto, así como la cantidad de ligando presente en los sistemas nanoparticulados. Para ello se ha empleado un equipo NETZSCH STA 449C, utilizando 10 mg de muestra aproximadamente con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, en atmosfera de argón, en el intervalo de 20 a 900 °C.

El término análisis térmico (TA) se emplea para designar al conjunto de técnicas experimentales que describen el comportamiento de una muestra en función de la temperatura, esta última sujeta a un programa de calentamiento. Dentro de las técnicas TGA destacan el análisis termodiferencial (DTA), la calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el análisis termogravimétrico (TGA) como técnicas más habituales¹. En el presente trabajo se han realizado medidas de TGA-DTA para determinar la cantidad de materia orgánica presente en las muestras.

Las ventajas de las técnicas TGA son:

- La muestra puede ser estudiada en un amplio intervalo de temperaturas haciendo uso de varios programas de calentamiento.
- Admite que la muestra se encuentre en estados de agregación bastante variados (fluidos, geles, sólidos, etc.).
- Se necesita relativamente poca cantidad de muestra.
- Permite el control de la atmosfera utilizada durante los experimentos.

Las medidas que se recogen en la presente memoria se han realizado de forma dinámica, esto es, calentando la muestra siguiendo un programa predeterminado, habitualmente lineal, a temperatura variable. Otras formas de medir comprenden el registro de la masa en función del tiempo transcurrido, a una temperatura constante (*isotermas*) y el calentamiento de la muestra hasta una masa constante para una serie de temperaturas dadas (*cuasi-isoterma*).

¹ Brown, M. *Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications* (London, U.K.: Chapman and Hall, 1988).

Asimismo, se debe mencionar que entre los diversos factores que influyen en la termogravimetría se encuentran los siguientes².

- *Factores instrumentales*: velocidad de calentamiento del horno, atmósfera, geometría del crisol y del horno, composición del crisol, velocidad de adquisición de datos y sensibilidad del mecanismo de adquisición.
- *Factores propios de la muestra*: cantidad de muestra, solubilidad de la muestra en los gases desprendidos, tamaño de partícula, calor de reacción, grado de empaquetamiento, naturaleza de la muestra y conductividad térmica.
- *Fuentes de error específicas de la técnica*: efecto de flotación, efecto del horno (convección, turbulencia) y errores en la medida de la temperatura.

Cuando la forma de la curva TGA no es aclaratoria y resulta complejo realizar un análisis eficiente de los datos desprendidos en la medida, la extensión en que se dan los cambios y la temperatura a la que ocurren, a menudo se representa la derivada numérica de la TGA que se conoce como DTG, termogravimetría derivada. Una curva DTG es la representación de la velocidad de la variación de la masa con respecto al tiempo o a la temperatura.

A.2. Espectroscopía Infrarrojo (IR)

El empleo de la espectroscopia infrarroja (IR) tiene por objeto la identificación de diversos tipos de enlace, así como la presencia de grupos funcionales específicos que forman parte del compuesto estudiado, todo ello a partir de la asignación de aquellas frecuencias en la región de infrarrojo que producen la vibración de tensión o deformación de los enlaces implicados. En nuestro contexto, resulta especialmente útil para confirmar la presencia de las

² West, A. R. *Solid State Chemistry and Its Applications* (Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, 1984).

moléculas orgánicas empleadas para el recubrimiento de las nanopartículas y/o el modo de coordinación de éstas.

Los espectros infrarrojos de las muestras estudiadas se han realizado, en un espectrofotómetro FTIR-8400S Shimadzu, en el intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} . Para llevar a cabo las medidas, se han preparado previamente pastillas compuestas por una mezcla de bromuro potásico y el compuesto a caracterizar, en una concentración del 0.5 %. El bromuro potásico, de calidad espectroscópica FLUKA, fue previamente secado en un horno y las pastillas se obtuvieron mediante la aplicación de una presión aproximada de 10 Tm.cm^{-2} .

Los espectros de absorción en la región del infrarrojo tienen lugar consecuencia de que los átomos enlazados vibran a frecuencias dentro de esta región. Estos cambios de energía se producen por las transiciones energéticas de los grupos atómicos al cambiar de unos estados vibracionales y rotacionales a otros. Cada grupo atómico o molécula tiene un espectro de absorción característico y está compuesto por distintas bandas de absorción, cada una de ellas debidas a un tipo de enlace determinado (caracterizado por la fuerza de enlace y los átomos que lo forman) y a su modo de vibrar³ (Figura A. 1).

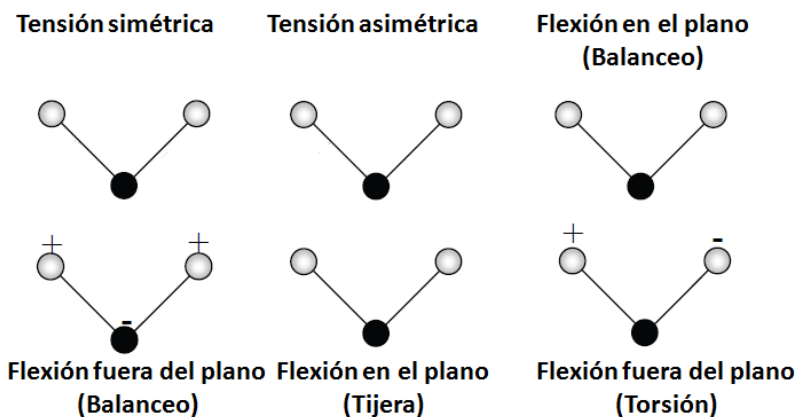


Figura A. 1. Distintos modos de vibración de una molécula triatómica.

³ Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds* (New York, New Jersey: John Wiley&Sons, 1986).

Las reglas de selección indican que una transición vibracional está permitida, cuando ocurre entre dos niveles energéticos contiguos; es decir, cuando $\Delta v = \pm 1$ (donde $v = 0, 1, 2, 3 \dots$ es el número cuántico vibracional). Esta regla de selección se refiere al modelo de oscilador armónico. Pero si se tiene en cuenta la anarmonicidad, la regla de selección previamente mencionada no es tan restrictiva, $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3 \dots$ (no obstante, va disminuyendo la probabilidad de las transiciones que corresponden a los últimos términos).

Otra de las condiciones que debe cumplirse para que una transición vibracional sea activa en el infrarrojo, es que debe haber un cambio neto en el momento dipolar de la molécula o grupo atómico, es decir, en el espectro infrarrojo no se pueden registrar los modos de vibración de moléculas diatómicas formadas por el mismo átomo tales como por ejemplo H_2 y N_2 (Figura A. 2).

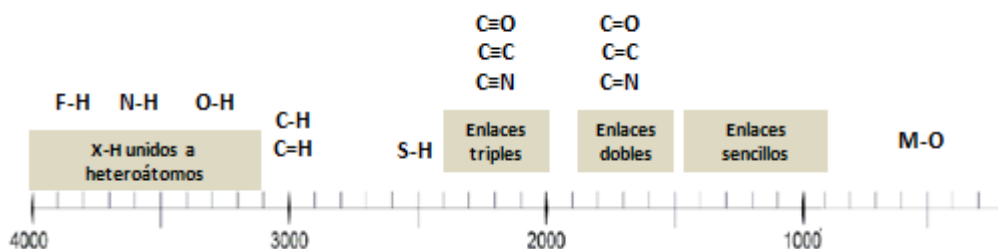


Figura A. 2. Energía a la que se encuentran los modos de vibración de los enlaces entre átomos más comunes.

La frecuencia a la que aparece cada vibración es inversamente proporcional a la masa reducida de los átomos que lo forman y directamente proporcional a la fortaleza del enlace. Las energías a las que suelen aparecer los enlaces más comunes de las moléculas se muestran en la Figura A. 2.

A.3. Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

La espectroscopia UV-Vis se ha empleado para monitorizar el proceso de para la determinación de la concentración de hierro de las muestras de Fe_3O_4 en los pasos de recubrimiento y de funcionalización con el péptido RGD así como previamente a los ensayos preclínicos por el método del tiocianato potásico (Capítulos II y III). De este modo, el hierro reacciona con el tiocianato dando un compuesto, soluble, de color rojo intenso que absorbe a 474 nm. Hay que emplear gran exceso de tiocianato para aumentar la intensidad de la coloración y deben estar presentes ácidos fuertes tales como el ácido clorhídrico o nítrico para evitar la hidrólisis del ion férrico.

Por ello, para llevar a cabo esta determinación se requiere de un calibrado con un estándar de hierro 0,1 mg/ml (Sigma-Aldrich, 1000 mg/ml). Se procede a digerir 25 μl de las diferentes muestras de magnetita en 175 μl ácido nítrico a 60 °C durante dos horas. Posteriormente se diluyen las muestras digeridas en 1,8 ml de agua destilada. En el momento de realizar las medidas se añaden diferentes volúmenes tanto de estas alícuotas como de la disolución estándar sobre una disolución de KSCN 1,5M en agua destilada 1/3 (v/v) en la misma cubeta de medida. Finalmente, se mide su absorbancia a 474 nm, realizando tres réplicas para cada muestra.

Las medidas fotométricas se han realizado utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV Mini 1240 a temperatura ambiente. El intervalo espectral 340-1100 nm se cubre con una lámpara halógena y la región UV, 200-340 nm con una lámpara de deuterio. La precisión de las medidas para la longitud de onda y la absorbancia es de $\pm 1,0$ nm y $\pm 0,005$ (a absorbancia de 1,0), respectivamente. Igualmente, la repetitividad es de $\pm 0,3$ nm y $\pm 0,002$ (a absorbancia de 1,0), respectivamente. El detector es un fotodiodo de Si y el monocromador se trata de una red de difracción cóncava.

Un rasgo característico de muchos complejos metálicos del *bloque d* es su color cuyo origen es la absorción de luz en la región visible (380-750 nm). Si uno un compuesto absorbe la longitud correspondiente al rojo (~750 nm) reflejará el color complementario a éste, es decir, el azul (~380 nm). Los estudios de los espectros electrónicos de complejos metálicos proporcionan

información sobre la estructura y el enlace, aunque la interpretación de los espectros no siempre es sencilla. Las absorciones surgen de las transiciones entre niveles de energía electrónicos, para los compuestos de coordinación del *bloque d* podemos diferenciar entre dos tipos de transiciones:

- Transiciones entre orbitales pertenecientes al metal que poseen carácter *d* (transiciones d-d).
- Transiciones entre orbitales moleculares pertenecientes al metal y a los ligandos que transfieren carga del metal al ligando o del ligando al metal.

Las bandas de absorción de los espectros electrónicos son con frecuencia anchas; la absorción de un fotón del UV-Vis ocurre en ~10-18 s mientras que las vibraciones y rotaciones moleculares tiene lugar más lentamente. Por lo tanto, una transición electrónica es una “instantánea” de una molécula en un estado vibracional o rotacional determinado y de ahí se deduce que el espectro electrónico va a registrar un intervalo de energía correspondiente a diferentes estados vibracionales y rotacionales. Las transiciones electrónicas cumplen las siguientes reglas de selección:

- *Regla de selección de espín*: $\Delta S = 0$: Las transiciones pueden ocurrir desde estado singlete a singlete o triplete a triplete y así sucesivamente, pero un cambio de multiplicidad de espín está prohibido.
- *Regla de selección de Laporte*: Debe haber un cambio de paridad: $g \leftrightarrow u$ ó $u \leftrightarrow g$ corresponden a transiciones permitidas; por el contrario, $g \leftrightarrow g$ y $u \leftrightarrow u$ son transiciones prohibidas. Esto conduce a la regla de selección: $\Delta l = \pm 1$.

Una transición prohibida por espín se convierte en permitida si, por ejemplo, un estado singlete se mezcla en alguna medida con un estado triplete. Esto es posible por *acoplamiento espín orbita* pero para los metales *3d*, el grado de mezcla es pequeño así las bandas asociadas con transiciones prohibidas por espín son muy débiles. Las transiciones *d-d* permitidas por espín siguen estando prohibidas por Laporte; sin embargo, su observación se explica por un mecanismo denominado *acoplamiento vibrónico*. Un complejo octaédrico posee un centro de simetría pero las vibraciones moleculares pueden provocar su pérdida temporal. En un instante en el que la molécula no

tiene centro de simetría, puede ocurrir la mezcla de orbitales d y p . Como el tiempo de vida de la vibración ($\approx 10^{-13}$ s) es mayor que el de una transición electrónica ($\approx 10^{-18}$ s), puede darse una transición $d-d$ que implique un orbital con carácter de mezcla dp , aunque la absorción todavía será relativamente débil. En una molécula que no es centrosimétrica (por ejemplo, tetraédrica), puede ocurrir la mezcla dp en mayor medida y de esta manera la probabilidad de transiciones $d-d$ es mayor que en un complejo centrosimétrico. Esto conduce a que los complejos tetraédricos sean de color más intenso que los complejos octaédricos, y es que las transiciones electrónicas de un complejo tetraédrico son más probables.

Por otro lado, las bandas de absorción en las regiones Ultravioleta - Visible que presentan los compuestos orgánicos se asocian con transiciones electrónicas en la capa de valencia. Los electrones involucrados en dichas transiciones corresponden a aquellos más débilmente atraídos por el conjunto de núcleos atómicos. A estos efectos resulta conveniente recordar la clasificación convencional de las transiciones electrónicas posibles dentro de la capa de valencia de los compuestos orgánicos:

1. Transiciones $\sigma\sigma^*$: $\lambda < 150$ nm. Se presentan en todos los compuestos orgánicos. Este tipo de transiciones se dan sobre todo en hidrocarburos que únicamente poseen enlaces σ C-H o C-C. Son en general de gran energía (UV de vacío) e intensidad.

2. Transiciones $n\sigma^*$: Se presentan en compuestos con heteroátomos (O, N, S, Haluros), generalmente en la región cercana a los 200 nm. La intensidad es variable dependiendo de la naturaleza del orbital n .

3. Transiciones $\pi\pi^*$: Presentes solo en compuestos insaturados. En ausencia de conjugación estas transiciones se presentan en UV de vacío. Y dan lugar a bandas intensas que pueden aparecer en el intervalo 200-700 nm si el compuesto presenta insaturación conjugada.

4. Transiciones $n\pi^*$. Presentes en compuestos insaturados con heteroátomos (grupos carbonilo, nitro, azo, tiocarbonilo). Dan lugar a bandas débiles usualmente en la región UV cercana (200-300 nm).

A.4. Difracción de Rayos X

Los difractogramas realizados en este trabajo se han registrado en un difractómetro Philips PW1710 del Servicio General de Rayos X de la UPV/EHU. Este instrumento presenta una geometría Bragg-Brentano y está equipado con anticátodo de Cu. Las condiciones de medida aplicadas en el generador han sido 40 kV y 40 mA, y los difractogramas obtenidos se han registrado en el intervalo de $15^\circ < 2\theta < 85^\circ$ cada $0,02^\circ$, con un tiempo de paso de 1,25 s.

Los rayos X son una radiación electromagnética con longitudes de onda, λ , del mismo orden de magnitud (unos pocos Å) que los parámetros de celda de los cristales⁴. Cuando esta radiación incide sobre la nube electrónica de los átomos de una red cristalina, éstos se convierten en emisores puntuales de esa misma radiación. La radiación emitida por cada átomo se expande en forma de onda esférica e interfiere con la creada por los átomos del entorno. La interferencia resultante puede ser destructiva o constructiva. Las direcciones en las que la interferencia es constructiva coinciden con las que debería llevar la radiación incidente si fuese reflejada por los diferentes planos atómicos que componen la red cristalina. Este principio de reflexión queda recogido de forma sencilla en la conocida Ley de Bragg:

$$\lambda = 2d_{hkl}\text{sen}\theta$$

(A. 1)

donde θ es el ángulo de incidencia de la radiación y d_{hkl} es la distancia entre dos planos consecutivos definidos por un vector de componentes hkl .

Una de las ventajas de la difracción de rayos X respecto a otros tipos de la difracción es, precisamente, la alta resolución en d_{hkl} cuando se mide un difractograma en muestra policristalina en condiciones idóneas.

Sin embargo, esta técnica también presenta un inconveniente importante: la magnitud de la interacción de los rayos X con los átomos es proporcional al número atómico (Z) de los mismos. Esto significa que si una

⁴ Jenkins, R.; Snyder, R. L., *Introduction to X-Ray Powder Diffractometry* (New York, New Jersey: John Wiley & Sons, 1996).

muestra se compone de átomos muy próximos en la tabla periódica, esta técnica no será capaz de distinguirlos debido a la pequeña diferencia porcentual en número de electrones. Este efecto se repite cuando en un compuesto se encuentran presentes simultáneamente átomos con números atómicos muy diferentes: en dicho caso la dispersión de los rayos X por los átomos con Z pequeño queda enmascarada por la de aquellos con números atómicos elevados. Asimismo, la difracción de los rayos X también es dependiente del ángulo de dispersión, θ , de tal modo que cuanto mayor sea el valor de $\sin(\theta/\lambda)$ menor es el poder de dispersión.

A.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión se ha empleado para caracterizar las muestras estructural y morfológicamente. Este estudio permite la determinación de la homogeneidad de las nanopartículas así como su distribución de tamaños y dispersión, lo cual es de gran relevancia debido a la dependencia de éstas con las propiedades del material (Figura A. 3).

Los estudios TEM presentados en esta memoria se han realizado con un microscopio Philips CM200 equipado con microanálisis EDX y WDX instalado en el Servicio General de Microscopía Electrónica y Microanálisis de la UPV/EHU. Se ha trabajado a 200 kV utilizando un portamuestras de inclinación simple tanto para la imagen como para la difracción.

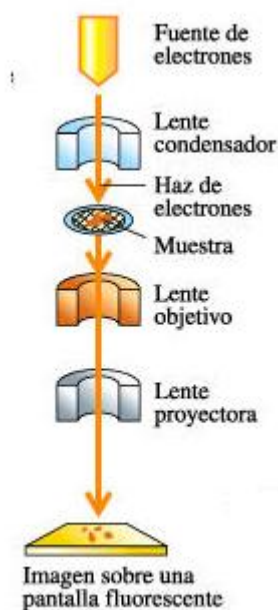


Figura A. 3. Esquema de un microscopio electrónico de transmisión.

La condición indispensable que debe cumplir cualquier muestra para ser observada a través de un microscopio de transmisión es que sea electrón-transparente. Además, debe permanecer estable ante la exposición al haz de electrones, no descomponerse ni cambiar de estructura fácilmente y debe ser representativa de la muestra originaria.

Con el fin de adecuar las nanopartículas de la presente investigación a los requerimientos típicos para TEM, éstas se dispersaron dependiendo de su naturaleza en tolueno o agua, disolventes que no alteran la composición de la rejilla donde irán soportadas las partículas. A continuación, se depositaron varias gotas de la dispersión sobre una rejilla de cobre con sustrato de carbono, sobre la que se adhieren las partículas dispersas y, una vez evaporado el disolvente, pudieron analizarse.

Las diferentes técnicas de microscopía electrónica se basan en el análisis de los efectos que los electrones producen en una sustancia cuando éstos interactúan con la misma. Un esquema de estos efectos se muestra en

la Figura A. 4. Los adecuados sistemas de detección para cada uno de los procesos, permiten obtener información sobre la muestra irradiada⁵.

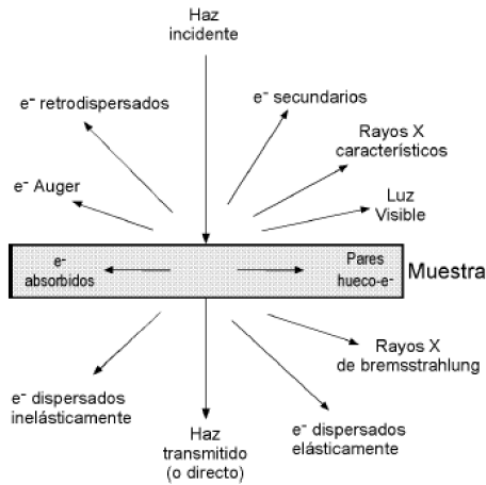


Figura A. 4. Efectos producidos en una muestra cuando ésta es irradiada con un haz de electrones.

Los contrastes que se observan en la imagen final se forman por las interferencias entre las fases de las ondas electrónicas que interactúan con la muestra, por lo que este modo de adquisición recibe el nombre de *contraste de fases*. Para que la imagen obtenida se halle libre de las variaciones locales de intensidad que tienen lugar durante el proceso, la muestra debe ser lo suficientemente delgada (condición de *electrón-transparenta*).

La mayoría de los electrones que penetran en la muestra serán transmitidos, aunque dependiendo del intercambio energético que tenga lugar entre éstos y los átomos de la muestra, cabe distinguir tres casos: *i*) que el electrón no interactúe y atraviese la muestra sin pérdida energética, *ii*) que durante la interacción no exista pérdida de energía (proceso de *scattering* o dispersión elástica de naturaleza ondulatoria) y *iii*) que colisione con las partículas subatómicas de manera que exista una pérdida de energía que se

⁵ Goldstein, J. I.; Yakowitz, H.; Lifshin, E.; Colby, J. W.; Coleman, J. R. *Practical Scanning Electron Microscopy* (New York, New Jersey: Plenum Press, 1975).

manifestará en forma de rayos X o electrones secundarios (*scattering* o dispersión inelástica de naturaleza corpuscular). Un porcentaje superior al 95 % logra atravesar la muestra mientras que una fracción mínima es retrodispersada, es decir, el electrón es dispersado con un ángulo $> 90^\circ$ y vuelve a emerger de la superficie⁶.

Los rayos X característicos generados se pueden analizar conforme a su longitud de onda (WDX) y al contrastar las intensidades obtenidas con la de una serie de estándar, se consigue un análisis cuantitativo de las concentraciones de los diferentes elementos químicos. Otra posibilidad que tiene el equipo es la de analizar mediante la medida de Dispersión de Energías de Rayos X (EDX). En este caso, se cuantifica la energía generada, en lugar de la intensidad, y permite una determinación simultánea de los elementos presentes en la muestra, ya que la emisión de los rayos X crea líneas espectrales a frecuencias que son específicas para cada elemento. Este segundo modo de análisis es más rápido pero menos preciso que el basado en la medida de las longitudes de onda (WDX).

Por otra parte, se puede producir la difracción de los electrones incidentes en la muestra en un conjunto de planos atómicos, generando los denominados diagramas de difracción electrónicos. Aquellas reflexiones que cumplan la ley de Bragg generarán un diagrama de un conjunto de puntos (Figura A. 5). Cuando se trata de una muestra policristalina se obtienen anillos de difracción, ya que la disposición aleatoria de los granos del material generará el cumplimiento de la condición de Bragg de interferencia constructiva en mayor grado. La anchura, el diámetro y la proximidad entre los anillos proporcionan información sobre la estructura, puesto que cada anillo representa la difracción de una familia de planos en concreto.

⁶ Williams, D. B.; Carter, B. C. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science* (New York and London: Plenum Press, 1996).

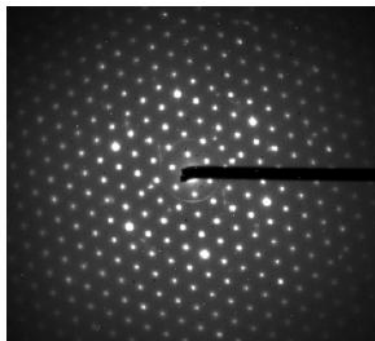


Figura A. 5. Patrón de difracción de electrones característico de una muestra monocristalina.

Del análisis de estos patrones pueden extraerse tanto los espaciados interplanares como el ángulo formado entre los distintos planos cristalográficos, hecho que permitirá conocer, en la mayoría de los casos, la orientación relativa de la muestra con respecto al haz incidente, además de identificar las fases presentes en la imagen.

A.6. *Dispersión Dinámica de Luz (DLS)*

El radio hidrodinámico y el potencial Zeta de las dispersiones acuosas de las nanopartículas de Fe_3O_4 fueron medidos mediante un Zetasizer (Zetasizer Nano S, Malvern).

Cuando un haz de luz incide sobre una partícula pequeña se dispersa en todas direcciones siempre que su tamaño sea mucho menor que la longitud de onda de la luz incidente (por debajo de 250 nm). Si la fuente luminosa es un láser, es decir, monocromática y coherente, se observan fluctuaciones de la intensidad de luz dispersada debidas al movimiento Browniano de las partículas cuando éstas se encuentran en disolución. Esta dependencia temporal de la intensidad está relacionada con la variación de las distancias interparticulares en el medio líquido que produce una serie ininterrumpida de interferencias constructivas y destructivas de dicha intensidad. El análisis de estas fluctuaciones de intensidad permite obtener información sobre el movimiento de los centros dispersores de luz, es decir, de las nanopartículas en suspensión (

Figura A. 6).

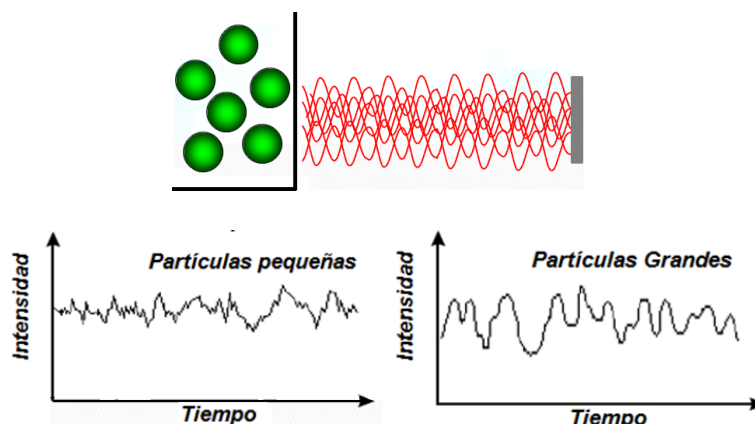


Figura A. 6. *Fluctuaciones de intensidad de la dispersión de luz por un conjunto de partículas grandes en la parte superior, y pequeñas, en la inferior.*

Para que este análisis proporcione información fiable sobre el tamaño de estas nanopartículas, la disolución objeto de estudio debe estar libre, en el mayor grado posible, de polvo en suspensión o agregados de gran tamaño, por lo que dicha disolución suele ser filtrada y/o centrifugada previamente. La información dinámica de las partículas se obtiene de la función de autocorrelación de la intensidad de luz detectada durante el experimento. La función de autocorrelación de segundo orden se genera de la siguiente manera:

$$g^2(\mathbf{q}; \tau) = \frac{\langle I(\mathbf{t})I(\mathbf{t} + \tau) \rangle}{\langle I(\mathbf{t}) \rangle^2} \tag{A. 2}$$

donde $g^2(q;\tau)$ es la función de autocorrelación de segundo orden para un valor determinado del vector de onda q , del retraso τ , e I la intensidad de luz. Esta función exhibe un decrecimiento exponencial con el tiempo debido al movimiento o difusión de los centros dispersores que, al cabo de cierto tiempo característico, anula completamente la correlación de la intensidad dispersada entre los estados inicial y final. La función de autocorrelación de primer orden $g^1(q;\tau)$ se extrae de la función de autocorrelación de segundo orden mediante la ecuación de Siegert (A. 3).

$$g^2(\mathbf{q}; \tau) = 1 + \beta [g^1(\mathbf{q}; \tau)]^2 \tag{A. 3}$$

donde el parámetro β es el factor de correlación que depende de la geometría particular del experimento. El tratamiento de los datos de la función de correlación es muy simple en el caso de sistemas muy monodispersos (Índice de Polidispersidad, I.P, entre 0,05 y 0,08) en los que el ajuste de dicha función se puede realizar mediante una única función exponencial:

$$g^1(\mathbf{q}; \tau) = \exp(-\Gamma\tau) \tag{A. 4}$$

de donde se obtiene Γ , que es la velocidad de decaimiento (*decay rate*). El coeficiente de difusión translacional D , está relacionado con Γ para un ángulo

o intervalo de ángulos entre la luz incidente y la dispersada mediante la Ecuación (A. 5).

$$\Gamma = q^2 D_t \quad q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{A. 5})$$

donde λ es la longitud de onda de la luz incidente, n_0 es el índice de refracción de la muestra y θ es el ángulo que forma el detector respecto a la celda de medida. De esta manera, la representación de Γ/q^2 vs q^2 sirve para determinar el coeficiente de Difusión D_t del cual se extrae el radio hidrodinámico r_h , haciendo uso de la Ecuación de Stokes-Einstein ((A. 6):

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_h} \quad (\text{A. 6})$$

donde η es la viscosidad y r_h es radio hidrodinámico promedio (*Z average*) suponiendo partículas esféricas. En el caso más general de una suspensión formada por una distribución de partículas de diferente tamaño, con un I.P entre 0,08 y 0,7, la función de autocorrelación se ajusta a una función multiexponencial. De esta forma, la función de autocorrelación es la suma de los procesos de decaimiento correspondientes a cada una de los tamaños presentes en la población de partículas (A. 7).

$$g^1(q; \tau) = \sum_{i=1}^n G_i \Gamma_i \exp(-\Gamma_i \tau) = \int G(\Gamma) \exp(-\Gamma \tau) d\Gamma \quad (\text{A. 7})$$

De esta manera, se obtiene información sobre la distribución de tamaños de partícula presentes en la suspensión coloidal. El resultado directo de la medida es una distribución de intensidades de luz estando cada componente relacionada con un tamaño determinado de la distribución de partículas (distribución de intensidades). Sin embargo, dado que la intensidad debida a partículas grandes es mucho mayor que la correspondiente a partículas pequeñas, incluso para poblaciones iguales, en el caso de distribuciones asimétricas o multimodales es habitual la conversión de la distribución de intensidades a una distribución de volúmenes y/o de números de partículas para lo que se hace uso de la Teoría de Mie o solución de Lorentz-Mie de las ecuaciones de Maxwell para la dispersión de radiación

electromagnética por una esfera, lo que requiere un conocimiento de las propiedades ópticas del medio coloidal.

A.7. Espectroscopia de Masas-MALDI

La espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS) se introdujo en el ámbito del análisis de biomoléculas al final de la década de los años 70 del siglo pasado con la aparición de diversas técnicas de ionización suave, como la desorción por campo eléctrico (FD), la desorción por plasma (PD) y la ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB)⁷. Estas técnicas permitían la ionización de moléculas termolábiles de gran tamaño, como los péptidos y las proteínas, sin producir la extensiva degradación característica de las denominadas técnicas de ionización dura, cuyo representante de referencia es el impacto electrónico.

En especial el FAB⁸, desarrollado a partir de las técnicas de espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), constituyó la herramienta básica para el análisis y secuenciación de péptidos durante más de una década. Posteriormente, en el inicio de los años 90, otros dos métodos de ionización suave, el electrospray (ESI) y la desorción por láser asistida por matriz (MALDI), tomaron el relevo al FAB y se constituyeron en los pilares básicos de la espectrometría de masas en la proteómica contemporánea.

El desarrollo de analizadores de masa (Figura A. 7) de creciente resolución y velocidad de análisis ha sido primordial en este proceso. En contraste con los métodos de ionización por ESI y MALDI, con una tecnología que quedó prácticamente establecida en los primeros años después de su aparición, el incremento continuo de las prestaciones de los analizadores de iones ha ido marcando y ampliando los límites con los que el personal investigador ha podido abordar el estudio del proteoma por espectrometría de masas en los últimos años⁹.

⁷ Roepstorff, P.; Richter, W. J. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 789 (1992): 118-119.

⁸ Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 7 (1981) 325-327.

⁹ Abián, J.; Carrascal, M.; Gay, M. *Proteómica* 2 (2008): 16-34.

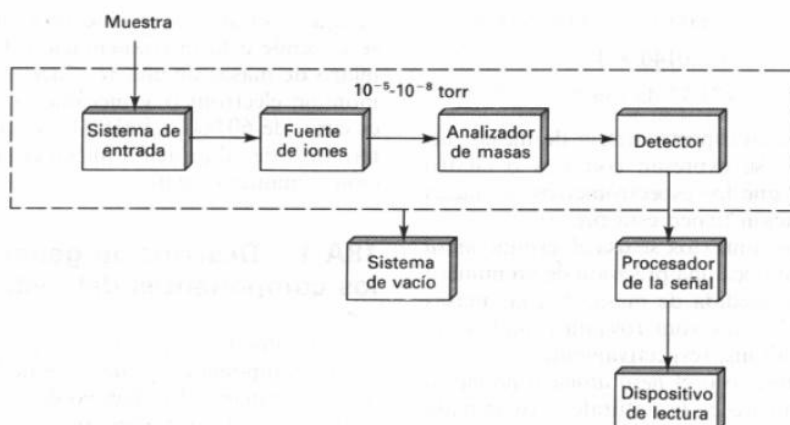


Figura A. 7. Componentes de un espectrómetro de masas.

De los cuatro grandes grupos en que pueden dividirse los analizadores de masas, analizadores de sectores (eléctricos, E y/o magnéticos, B), de cuadrupolo (Q), de tiempo de vuelo (TOF) y de confinamiento de iones (Ion Traps, Orbitraps, y analizadores de resonancia ciclotrónica de iones, ICR), sólo los primeros no tienen una utilización amplia en proteómica. Las ventajas únicas que ofrecían en el pasado los sistemas de sectores en cuanto a su resolución y a su capacidad para llevar a cabo colisiones de alta energía para la secuenciación de péptidos, puede ser proporcionada ahora por sistemas relativamente menos complejos, voluminosos y costosos como los analizadores de tiempo de vuelo provistos de reflectrón (reTOF) o el *Orbitrap*.

Los métodos más recomendados para introducir proteínas u otras macromoléculas en espectrómetros de masas son la electronebulización y la ionización/desorción asistida por matriz (MALDI). La mayoría de las veces, el MALDI se usa con un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo, que puede medir m/z hasta 10^6 . Para preparar una muestra destinada a MALDI, se mezcla $1\ \mu\text{L}$ de una disolución de analito $10\ \mu\text{M}$ con un $1\ \text{ml}$ de una disolución $1\text{-}100\ \text{mM}$ de un compuesto que absorbe en el ultravioleta, como el ácido-2,5-dihidroxibenzoico (la matriz), directamente en una sonda que se ajusta a la fuente del espectrómetro. Al

evaporarse el líquido deja una mezcla íntima de pequeños cristales de la matriz más el analito.

Para introducir los iones en fase gaseosa al espectrómetro de masas se dirige directamente hacia la muestra un breve impulso (de 600 ps) procedente de un láser de infrarrojos o ultravioleta (

Figura A. 8). La matriz se vaporiza y se expande en fase gaseosa, arrastrando en ella al analito. La elevada proporción matriz/muestra impide la asociación de las moléculas de analito, y suministra las especies iónicas que transfieren carga al analito, la mayoría del cual transporta una única carga. Poco después de que los iones se expanden en la fuente, se aplica un impulso de voltaje a la placa posterior, que lanza los iones dentro del espectrómetro. El poder de resolución es de 10^3 - 10^4 Da, y la exactitud de las medidas puede ser de 0,005-0,05%.

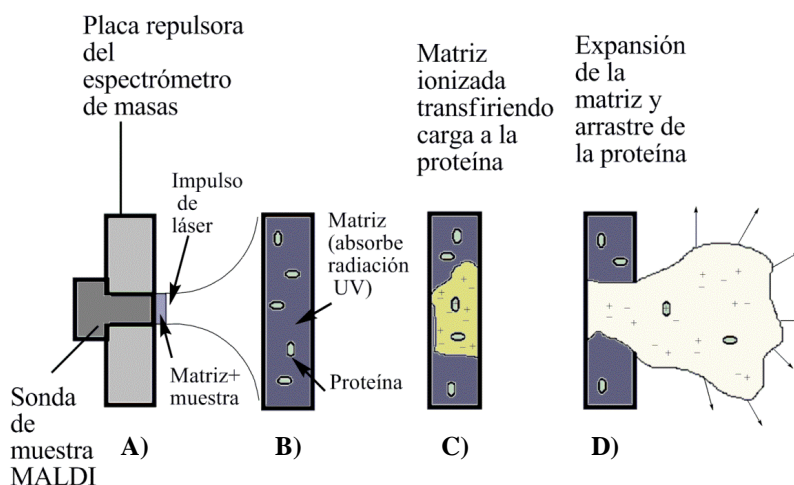


Figura A. 8. Secuencia del proceso de ionización/desorción por láser ayudado por la matriz. A) Mezcla desecada de analito y matriz depositada sobre una sonda que se inserta en la placa posterior de la fuente de iones. B) Vista ampliada del impulso láser que incide sobre la muestra. C) La matriz se ioniza y vaporiza por el láser, transfiriendo la carga al analito. D) El vapor se expande formando una pluma supersónica.

La ionización MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz), acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo), es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas que permite el análisis de biomoléculas (biopolímeros como proteínas, péptidos y azúcares) y moléculas orgánicas grandes (como polímeros, dendrímeros y otras macromoléculas) que tienden a hacerse frágiles y fragmentarse cuando son ionizadas por métodos más convencionales¹⁰.

En esta técnica la muestra se mezcla con la matriz en exceso sobre una superficie de metal, de tal forma que ambas cocristalizan cuando se evapora el solvente. Esta preparación se somete a pulsos cortos de láser en alto vacío lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz se convierte en energía de excitación y en transferencia de H⁺ a la muestra (ionización) dando lugar, normalmente, a especies monocargadas que son analizadas mediante TOF. Este analizador permite la determinación de la masa en una región de alto vacío mediante una medida muy precisa del período de tiempo, desde la aceleración de los iones en la fuente hasta que impactan con el detector.

Las muestras depositadas, se analizan mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, obteniéndose un espectro de masas (MS) denominado “Huella Peptídica”. Adicionalmente, se obtienen espectros de fragmentación (MS/MS) de las 3-5 masas mayoritarias dentro de cada una de las huellas peptídicas. La identificación se puede realizar automáticamente mediante el sistema GPS (Global Protein Server) acoplado a los datos del TOF-TOF, combinando ambos tipos de espectros (MS-MS/MS) obtenidos para cada muestra y usando como motor de búsqueda MASCOT (MatrixScience, UK) sobre bases de datos públicas de secuencias de proteínas. Sin embargo, para muestras complejas cuyas posibilidades de fragmentación son muy elevadas se requiere de un estudio más exhaustivo donde las bases de datos resultan orientativas.

¹⁰ Wang, Q.; Jakubowski, J. A.; Sweedler, J. V.; Bohn, P. W. *Anal.Chem.* 76, no. 1 (2004): 1-8.

A.8. Resonancia Magnética Electrónica (RME)

Los espectros de RME se han registrado en un espectrómetro Bruker ELESYS que opera en bandas X y Q, equipado con un Gaussómetro Bruker BNM 200, un frecuenciómetro de microondas Hewlett-Packard 5352B, y un criostato de Nitrógeno y de Helio de flujo continuo. Este equipo está ubicado en los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la UPV/EHU. Los espectros se obtuvieron variando el campo magnético a frecuencia constante.

La Resonancia de Espín Electrónico (o Resonancia Magnética Electrónica) es una técnica espectroscópica ampliamente utilizada en la actualidad en los estudios sobre la estructura y las propiedades de gran número de materiales. Sus principios teóricos son comunes a los de la Resonancia Magnética Nuclear, con la diferencia de que son fundamentalmente los espines electrónicos, y no los nucleares, los que son detectados y estudiados. Puede decirse que la RME consiste básicamente en la absorción de ondas electromagnéticas (microondas) por parte de sistemas con espines desapareados, sometidos a la acción de un campo magnético externo. En principio, cualquier material que presente un momento neto de espín electrónico puede ser estudiado aplicando esta espectroscopia. Es por ello que esta técnica se presenta como una potente herramienta para poder investigar sobre la naturaleza microscópica de las interacciones entre los espines en diversos materiales, incluidos los ferro- y antiferromagnéticos y los vidrios de espín (*spin-glasses*). Además, debido a su gran sensibilidad hacia el estado magnético y las características morfológicas, esta técnica es una potente herramienta para poder investigar las propiedades físicas de nanopartículas magnéticas¹¹.

Es importante tener en cuenta, que a diferencia de lo que ocurre con las transiciones ópticas, es la componente magnética, y no la eléctrica, de la radiación incidente la que interacciona con el sistema. La condición de resonancia, y por lo tanto la absorción, se alcanza cuando la energía incidente es exactamente igual a la necesaria para cambiar la orientación del momento

¹¹ Gubin, S. P. *Magnetic Nanoparticles* (Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH, 2009).

magnético del electrón (A. 8); es decir, para provocar un cambio de una unidad en el valor de M_s (regla de selección $\Delta M_s = \pm 1$). Por otra parte, y a diferencia de los espectrómetros ópticos, los equipos de RME operan a frecuencia constante, y barren el espectro variando linealmente el campo magnético estático. La absorción se produce cuando la energía de la radiación es igual a la separación entre los dos niveles de espín electrónico, situación que se alcanza para un determinado valor del campo aplicado denominado *campo resonante*, H_r .

$$\Delta E = h\nu = g\mu_B H_r \quad (\text{A. 8})$$

donde g es la razón giromagnética correspondiente al electrón (que es la constante de proporcionalidad entre el momento angular del electrón y el momento magnético que éste genera; para un electrón libre en el que su momento angular únicamente posee la contribución de espín $g_e = 2,0023$), H_r es el campo resonante y μ_B es el magnetón de Bohr ($9,27 \cdot 10^{-21}$ erg/G).

La posición de la señal en Resonancia *Paramagnética* Electrónica es equivalente al valor de g (o al campo resonante), siendo este valor fundamental en la caracterización del sistema. No obstante, en Resonancia *Ferromagnética* Electrónica la posición de g no depende únicamente del acoplamiento espín-orbita y de la orientación de la muestra respecto al campo externo, sino que también depende del campo intrínseco del sistema, H_i , (o, lo que es lo mismo, del campo de anisotropía, H_a) y de la orientación de ambos campos, externo e interno.

El modelo empleado para describir la resonancia magnética en sistemas superparamagnéticos, desarrollado por Raikher y Stepanov¹², está basado en el tratamiento clásico del momento magnético bajo la influencia de los campos externo e interno, H y H_i , respectivamente, ya que el momento magnético no solo observa la fuerza que se deriva del campo aplicado, sino que también actúan otro tipo de fuerzas, como por ejemplo las debidas a la anisotropía¹. Así, la energía del sistema podría expresarse de la siguiente manera:

¹² Raikher, Y. L.; Stepanov, V. I. *Phys. Rev. B* 50, no. 9 (1994): 6250–6259.

$$E = \vec{\mu}(\vec{H} \pm \vec{H}_i) \quad (\text{A. 9})$$

donde μ es el producto de la imanación de saturación y el volumen de la partícula, $M_s V$. En este sentido, para un sistema de partículas superparamagnéticas con anisotropía uniaxial, el campo resonante para cada partícula, la cual poseen su eje de anisotropía fijo en una dirección determinada al aplicar un campo externo, se puede expresar mediante la Ecuación (A. 10).

$$H_r = \frac{h\nu}{g\mu_B} - \frac{H_a}{2} \frac{1}{L(x)} \left[1 - \frac{3L(x)}{x} \right] (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (\text{A. 10})$$

donde H_a es el campo de anisotropía interno que equivale a $2K/M_s$, $L(x)$ es la función de Langevin y $x = \mu H / k_B T$, y θ es el ángulo entre el campo aplicado y el eje de anisotropía. La Ecuación A.14 describe la influencia de las fluctuaciones térmicas sobre el campo de anisotropía efectivo, siendo éste casi despreciable a temperaturas elevadas, tendiendo el campo de resonancia $H_r \sim h\nu / g\mu_B$.

A una temperatura dada, el campo de resonancia más alto se consigue cuando el campo de anisotropía se opone al campo externo, es decir, en partículas con $\theta = 90^\circ$ (cuando la constante de anisotropía es mayor que cero, $K > 0$); por el contrario, el más bajo se alcanza en las partículas cuyo eje de anisotropía es paralelo al campo aplicado.

Para el caso que $K < 0$ la situación para ambas orientaciones se invierte. Conforme se aumenta la temperatura, las diferencias entre estos campos de resonancia extremos se acortan, tendiendo al campo de resonancia a $h\nu / g\mu_B$. Este hecho provoca que al promediar sobre todas las orientaciones posibles, es decir, para el caso de un sistema de partículas distribuidas aleatoriamente, situación característica de un sistema superparamagnético, el ancho de línea disminuya con el aumento de la temperatura hasta alcanzar un mínimo a partir del cual vuelve a aumentar. Este último aumento está relacionado con el tiempo de relajación transversal, que va disminuyendo al aumentar la temperatura.

En un sistema superparamagnético, considerando que las nanopartículas son monodispersas en tamaño, la señal de resonancia resulta de la superposición de la contribución de las diferentes nanopartículas que componen la muestra, con sus ejes fáciles orientados al azar respecto al campo aplicado. No obstante, los sistemas reales no presentan partículas perfectamente monodispersas, por lo que es necesario considerar una distribución de tamaños a la hora de interpretar los resultados.

Como se ha comentado, el máximo de absorción se produce cuando la diferencia energética provocada por el campo magnético coincide con la energía suministrada por la radiación electromagnética. La curva que define dicha absorción puede ser de tipo Lorentziana o Gaussiana y las ecuaciones que las definen se recogen en la Tabla A.1.

Tabla A.1. Propiedades de las curvas Lorentzianas y Gaussianas.

Perfil de curva	Lorentziana	Gaussiana
Línea de resonancia	$Y=Y_{\max} \frac{I^2}{I^2 + (H - H_r)^2}$	$Y=Y_{\max} \exp \frac{(-\ln 2)(H - H_r)^2}{I^2}$
Amplitud de línea	$Y_{\max} = \frac{1}{\pi I}$	$Y_{\max} = \frac{\ln 2^{1/2}}{\pi} \frac{1}{I}$
Anchura de línea a media altura	Γ	Γ
Primera derivada	$Y' = Y_{\max} \frac{2I^2(H - H_r)}{ I^2 + (H - H_r)^2 ^2}$	$Y' = -Y_{\max} \frac{2(\ln 2)(H - H_r)}{I^2} \exp \frac{(-\ln 2)(H - H_r)^2}{I^2}$
Amplitud de línea de pico a pico	$2Y'_{\max} = \frac{3\sqrt{3}}{4\pi I^2}$	$2Y'_{\max} = 2 \left(\frac{2}{\pi e} \right)^{1/2} \frac{\ln 2}{I^2}$
Anchura de línea de pico a pico	$\Delta H_{pp} = \frac{2\Gamma}{\sqrt{3}}$	$\Delta H_{pp} = \left(\frac{2}{\ln 2} \right)^{1/2}$
Amplitud de línea del pico del lóbulo positivo	$A = Y_{\max} \left(\frac{1}{2I^2} \right)$	$A = Y_{\max} \left(\frac{4e^{-3/2} \ln 2}{I^2} \right)$
Amplitud de línea de pico del lóbulo negativo	$B = -Y_{\max} \left(\frac{2}{I^2} \right)$	$B = -Y_{\max} \left(\frac{2 \ln 2}{I^2} \right)$

La anchura de línea pico a pico (ΔH_{pp}) es una variable importante porque a partir de ésta se pueden conocer las posibles interacciones de canje entre iones paramagnéticos próximos, o la existencia de estados de energía excitados cercanos al estado fundamental. De igual modo, también es de interés el conocer la integral de la curva de absorción o, lo que es lo mismo,

su área (A_{EPR}), ya que ésta es proporcional al número de espines que resuenan en la muestra.

La extensión de la señal en torno al campo resonante Hr en un experimento de RME es consecuencia del principio de incertidumbre (A. 11), el cual determina que la energía de una transición no puede ser bien resuelta si el tiempo de vida media de un estado es muy pequeño:

$$\Delta E \cdot \Delta t \approx \frac{h}{2\pi} \tag{A. 11}$$

Teniendo en cuenta que una indeterminación en la energía se traduce en una indeterminación de la frecuencia de la radiación necesaria para la resonancia, $\Delta E = h\Delta\nu$, se puede obtener una expresión cualitativa válida para la anchura de la línea en un espectro de RME que se expresa como:

$$\Delta\nu = \frac{\Delta E}{h} \approx \frac{1}{\Delta t} \tag{A. 12}$$

En estas condiciones, cuanto menor es el tiempo de vida de un estado, la resonancia se hace más ancha.

Otro factor que ensancha las líneas proviene de las interacciones entre el ión magnético y su entorno (interacciones dipolo-dipolo o interacciones de canje magnético) como consecuencia de la transferencia de energía entre los iones excitados.

A.9. Magnetometría

Las medidas de imanación en función del campo magnético hasta un máximo de 10 T se han realizado en un magnetómetro de muestra vibrante VSM comercial de Cryogenic Ltd equipado con un imán superconductor de hasta 14 T, con un intervalo de temperatura accesible entre 2 y 300K. En este equipo se han registrado los ciclos correspondientes a las muestras en polvo a diferentes temperaturas. Los ciclos de histéresis a RT de las muestras en polvo y de las muestras transferidas a agua (en dispersión acuosa) se han medido en otro VSM no comercial, equipado con un electroimán con un campo máximo de 1.8 T. Dada su sencillez de uso y la excelente resolución de la medida del

campo aplicado, este sistema se ha usado sobre todo para determinar con precisión la existencia, o no, de remanencia y campo coercitivo de las muestras.

Las medidas a campo constante, en función de la temperatura (ZFC/FC) entre 5 y 300K, de las muestras en polvo se han llevado a cabo en el VSM comercial Cryogenic Ltd. Sin embargo, para llevar a cabo dichas medidas en muestras diluidas (dispersiones embebidas en polímero o dispersiones sobre papel de filtro) se ha empleado un magnetómetro SQUID comercial (MPMS-7T) de Quantum Design, equipado con un imán superconductor de hasta 7 T, y un criostato que opera entre 2-400K. La superior estabilidad, repetitividad y resolución de este tipo de magnetómetros aseguran una sensibilidad del orden de 10^{-8} emu en las medidas a campo constante, frente a los $5 \cdot 10^{-6}$ emu de los magnetómetros de muestra vibrante utilizados. Como en los magnetómetros SQUID la sensibilidad decrece con el campo aplicado, los VSM son, en general, más eficientes y fiables para la obtención de las curvas de imanación frente al campo aplicado. Tanto el magnetómetro SQUID como los dos magnetómetros de muestra vibrante se encuentran en el Servicio General de Medidas Magnéticas de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

A.9.1. Magnetómetro Tipo SQUID (Superconducting Quantum Interference Device)

El elemento esencial en un magnetómetro SQUID tipo RF como el usado en las medidas de imanación, es un anillo superconductor interrumpido por una unión Josephson (*weak link*) aislante y que permite el paso de los pares de Cooper a través de ella por efecto túnel, como se representa en la Figura A. 9.

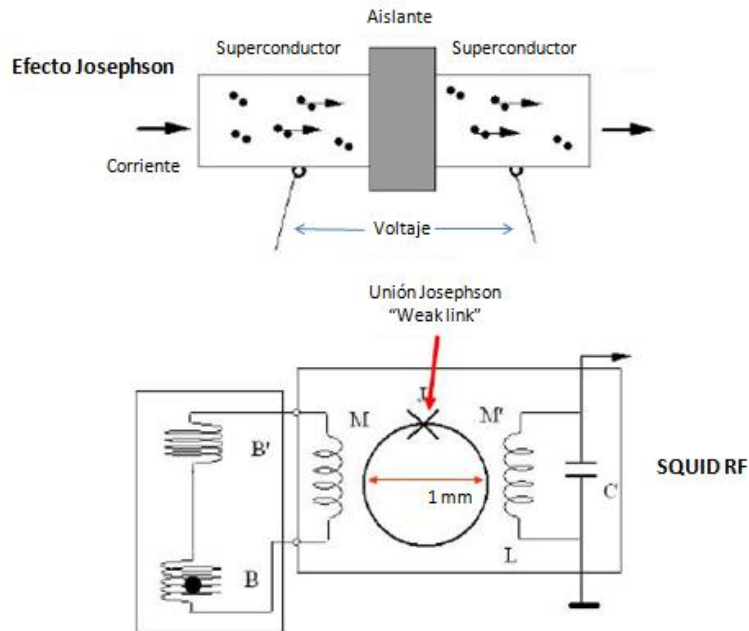


Figura A. 9. Esquema de funcionamiento de un dispositivo SQUID.

Este anillo de muy pequeño tamaño ($< 2\text{mm}$ de diámetro) está acoplado inductivamente a un circuito oscilante, cuya frecuencia de oscilación depende de la corriente que circula por el anillo SQUID de forma que este tipo de dispositivos es capaz de detectar variaciones de flujo de hasta $2 \cdot 10^{-21}$ Wb/s. En el proceso de medida, la muestra se desplaza a través de un conjunto de bobinas secundarias superconductoras con simetría axial, e inductivamente acopladas al sensor SQUID a través de otro circuito intermedio. El procedimiento de medida del momento magnético en el llamado modo DC requiere, normalmente, un tiempo de aproximadamente 30 s, debido a que el valor del momento magnético se obtiene del ajuste de un conjunto de datos a la curva teórica que se muestra en la Figura A. 10. Dicho modelo se corresponde con el movimiento de un dipolo magnético orientado en dirección axial moviéndose a través de las bobinas secundarias.

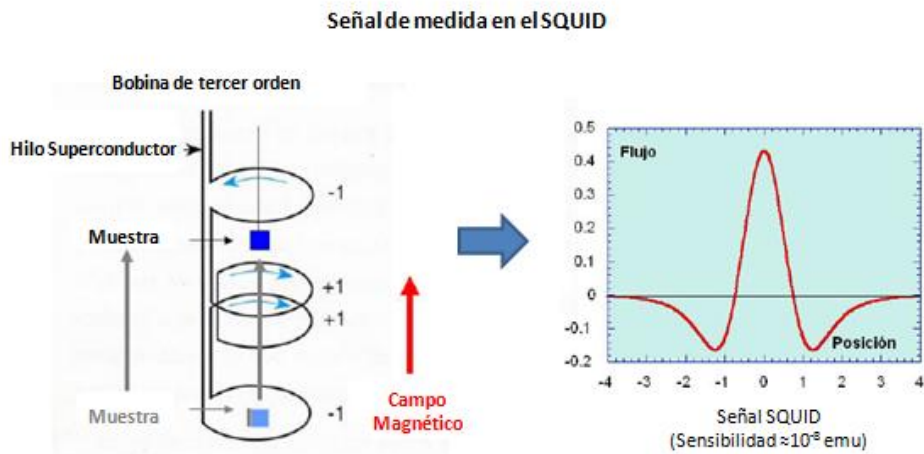


Figura A. 10. Esquema del procedimiento de medida, en un modo DC.

La configuración geométrica de éstas es la de una bobina de tercer orden como se muestra en la Figura A. 10, que resulta ser insensible a gradientes uniformes del campo magnético. La fabricación de unas bobinas secundarias perfectamente equilibradas es esencial si se quiere extraer la máxima sensibilidad en este tipo de medidas. La relación existente entre la medida y el momento magnético real de la muestra se determina mediante un calibrado previo de un patrón con un valor de momento magnético conocido.

A.9.2. Magnetómetro de Muestra Vibrante (VSM)

El magnetómetro VSM hace uso de la ley de inducción clásica de Faraday, según la cual un campo magnético variable con el tiempo produce un voltaje o diferencia de potencial eléctrico. En un VSM la muestra a estudiar se hace oscilar con una amplitud del orden de 1 mm a una frecuencia fija dependiente del instrumento (19,5 y 63 Hz en los magnetómetros utilizados), de forma que el campo magnético dipolar producido por la muestra imanada induce a su vez un voltaje en un conjunto de bobinas secundarias (*pick-up coils*). Como se muestra en la Figura A. 11, este conjunto de arrollamientos puede tener geometrías distintas; en nuestro caso, dos arrollamientos coaxiales con la vibración de la muestra y el dipolo magnético, en el caso del sistema de

14 T, y cuatro bobinas perpendiculares a la vibración, en el caso del VSM con electroimán.

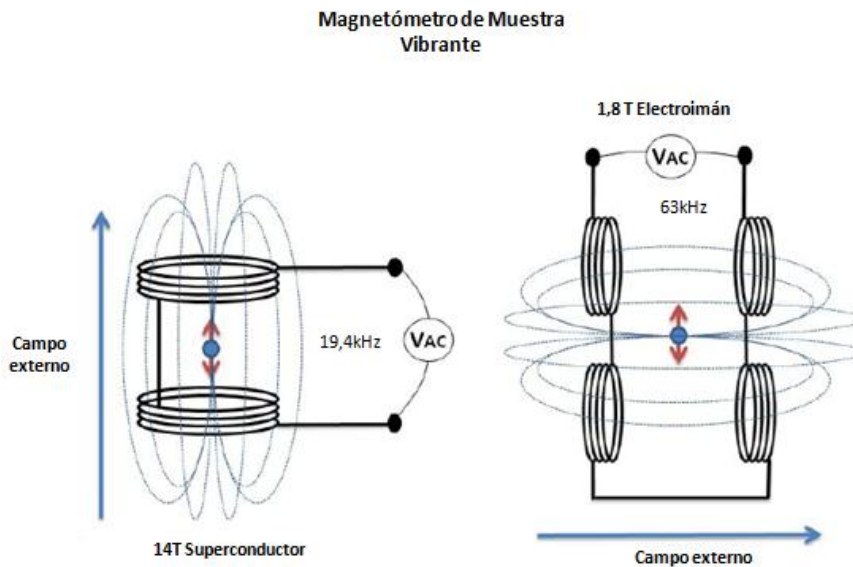


Figura A. 11. Esquema del conjunto de secundarios utilizados en los magnetómetros VSM.

Esta señal eléctrica es amplificada y rectificada mediante un amplificador tipo *lock-in* sintonizado a la frecuencia de vibración de la muestra, con el objeto de eliminar, en gran medida, el ruido de fondo que puede interferir en la medida y cuya frecuencia no coincide con la de vibración. Mediante una adecuada calibración de la señal de salida del *lock-in* mediante un patrón se obtiene una medida directa y rápida (típicamente 1 muestra/s) del momento magnético de la muestra.

A.9.3. Curvas ZFC/FC

Para comprender los fenómenos implicados en las curvas ZFC/FC (*zero field cooling-field cooling*) de un conjunto de partículas SPM es necesario analizar el proceso experimental de medida (Figura A. 12).

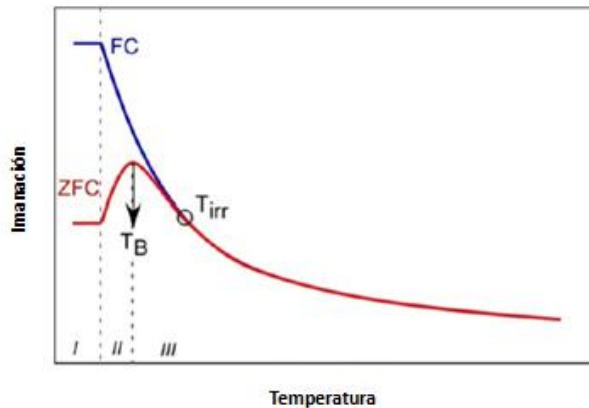


Figura A. 12. Esquema de las curvas ZFC (en rojo) y FC (en azul). Se han señalado la temperatura de bloqueo, T_B , la temperatura de irreversibilidad, T_{irr} , y se han marcado los diferentes tramos de las curvas: I, II y III.

En un conjunto de partículas SPM con anisotropía uniaxial, en ausencia de campo y a temperaturas superiores a la temperatura de bloqueo, T_B , los momentos magnéticos de cada partícula fluctúan de un sentido al otro del eje de fácil imanación, de manera que la imanación neta de cada partícula es nula; se dice que el momento magnético de la partícula se encuentra con igual probabilidad en cualquiera de los dos pozos de potencial, separados por una barrera energética, E_B .

Sin embargo, al disminuir la temperatura de la muestra por debajo de T_B , en ausencia de campo (ZFC), el momento magnético de cada partícula se anclará en cualquiera de los dos sentidos del eje de fácil imanación (los dos sentidos del eje de fácil imanación están igualmente favorecidos). Si la orientación de los ejes fáciles es completamente aleatoria, el momento neto del sistema habiéndose enfriado en ausencia de campo también es nulo. Pero al aplicar un campo pequeño (< 100 Oe) y, dado que el momento magnético de cada partícula gira ligeramente en el sentido del campo, habrá una pequeña imanación neta cerca de $T=0$ (Figura A. 12, tramo I), cuyo valor estará determinado por el modelo de Stoner-Wohlfarth¹³ (imanación de un conjunto de partículas monodominio cuyo eje de fácil imanación está orientado al

¹³ Stoner, E. C.; Wohlfarth, E. P., *Phil. Trans. Roy.Soc. A* 240, no. 4 (1948): 599–642.

azar). A medida que se aumenta la temperatura y se llega al tramo II, empiezan a desbloquearse las partículas de menor tamaño cuya temperatura de bloqueo T_B es menor, de manera que se orientan hacia el campo aplicado. De este modo, la imanación del sistema va aumentando según se van desbloqueando más partículas (de las más pequeñas a las más grandes), (Figura A. 12, tramo II).

El máximo de la curva ZFC señala la llamada temperatura media de bloqueo, T_B , del conjunto de partículas. Así, con el incremento de la temperatura empiezan a equipararse las poblaciones de los dos pozos de potencial debido al aumento de la energía térmica; es por ello que la imanación del sistema vuelve a bajar (Figura A. 12, tramo III). El punto donde confluyen la rama ZFC y la FC se denomina temperatura de irreversibilidad, T_{irr} , y corresponde al desbloqueo de la partícula más grande. Cuanto mayor sea la anchura del máximo y la diferencia entre T_B y T_{irr} , mayor será la distribución de tamaños del sistema.

Por el contrario, en el caso de la curva FC el sistema se enfría en presencia de campo, de modo que el momento magnético de cada partícula queda anclado solamente en el sentido del eje de fácil imanación favorecido. Además, el momento magnético girará levemente a favor del campo (lo que le corresponda por estar a 10 o 100 Oe) de manera que, en el primer tramo (Figura A. 12) de la curva FC, la imanación es constante e independiente de la temperatura hasta que se alcanza la energía térmica de activación de las partículas más pequeñas. A partir de ese momento la imanación decrece, empiezan a equipararse las poblaciones de los dos pozos de potencial, y acaba confluyendo con la rama ZFC a la temperatura donde la partícula más grande se ha desbloqueado.

En el modelo SPM no interaccionante, el desplazamiento de la T_B aparente con el campo magnético aplicado es un efecto pequeño que está relacionado con la perturbación que dicho campo introduce en el sistema que pretende ser analizado (Figura A. 13).

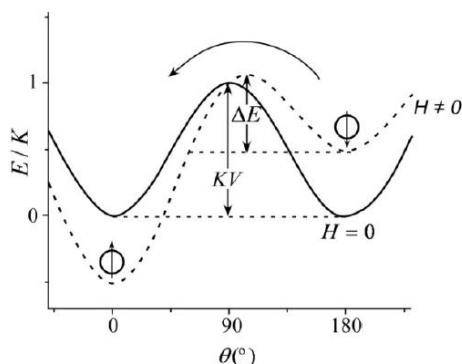


Figura A. 13. Representación de la dependencia de la barrera energética con el campo externo aplicado.

Este efecto se suele esquematizar como se ha hecho en la Figura A. 13, donde se presentan los niveles de energía para una partícula uniaxial con el campo aplicado en la dirección de fácil imanación. El campo aplicado modifica la E_B de los estados fundamentales (y, por lo tanto, la T_B aparente) según la Expresión (A. 13).

$$E_B = \Delta E = KV \left(1 - \frac{MH}{2K} \right)^2 \quad (\text{A. 13})$$

El que las T_B obtenidas a partir de una medida a 100 y a 10 Oe difieran mucho, es indicativo de la presencia de interacciones dipolares en sistemas donde las partículas no tienen contacto directo. Ha quedado demostrado que en muestras con interacciones débiles, los campos dipolares modifican las barreras de energía. Se han propuesto dos modelos, contrarios entre sí, para describir el efecto de las interacciones dipolares en nanopartículas con propiedades magnéticas colectivas. Dormann y col. afirman que la interacción dipolar produce un aumento en la T_B observada¹⁴. Por el contrario, Morup y Tronc dedujeron que en interacciones dipolares débiles la T_B disminuye¹⁵.

¹⁴ (a) Saifit, A.; Dormann, J. L.; Fiorani, D.; Renaudint, P.; Jové, J. *J. Phys. C* 21 (1988) 5295-5315. (b) Dormann, J. L.; Fiorani, D.; Tronc, E. *Advances in Chemical Physics* 96 (1997): 283.

¹⁵ (a) Tronc, E.; Morup, S. *Phys. Rev. Lett.* 72 (1994): 3278. (b) Steen, M.; Elisabeth, T. *Phys. Rev. Lett.* 72 (1994): 327.

Varios estudios experimentales se han llevado a cabo sobre el efecto de la interacción dipolar en la T_B de NPs metálicas (Fe^{16} , Ni^{17} , CoPt_3^{18}). En general, se cumple que debido a la interacción dipolar la T_B aumenta. Además, este hecho se ha observado en ferrofluidos diluïdos¹⁹, en nanopartículas ensambladas en capa fina²⁰ y mediante predicciones de Monte-Carlo²¹. En un sistema nanoparticulado cuya distribución de tamaños se describe por un perfil gaussiano, las partículas más pequeñas se quedan ancladas por el campo dipolar de las más grandes haciendo que el máximo de la rama ZFC se desplace a valores más altos. Este desplazamiento (aumento) es máximo a campo nulo, ya que a medida que aumenta el campo aplicado, la interacción dipolar va siendo vencida por la energía magnética. Es por ello que aumenta, significativamente, la diferencia entre las T_B aparentes a diferentes campos cuando hay interacción dipolar. A igualdad de distancia y disposición de las partículas la interacción dipolar se incrementa con el aumento del tamaño de partícula²². Por lo tanto, cuanto mayor sea el tamaño de partícula, mayor será la diferencia entre las T_B a diferentes campos.

El efecto de las interacciones dipolares se refleja en mayor medida en la curva FC por debajo de la temperatura media de bloqueo²³. El modelo SPM predice un incremento de la imanación con el enfriamiento hasta alcanzar la temperatura de bloqueo de las partículas más pequeñas. Pero si las partículas más grandes al bloquearse anclan por interacción dipolar a las más pequeñas,

¹⁶ Farrell, D.; Cheng, Y.; McCallum, R. W.; Schan, M.; Majetich, S. A. *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005): 13409–13419.

¹⁷ Masunaga, S. H.; Jardim, R. F.; Fichtner, P. F. P.; Rivas, J. *Phys. Rev. B* 80, no. 18 (2009): 1–7.

¹⁸ Wiekhorst, F.; Shevchenko, E.; Weller, H.; Kötzler, J. *Phys. Rev. B.* 67 (2002): 12.

¹⁹(a) Bae, C. J.; Angappane, S.; Park, J. G.; Lee, Y.; Lee, J.; An, K.; Hyeon, T. *Appl. Phys. Lett.* 91, no. 10 (2007): 4–6. (b) Urtizberea, A.; Natividad, E.; Arizaga, A.; Castro, M.; Mediano, A. *J. Phys. Chem. C.* 114, no. 11 (2010): 4916–4922.

²⁰ Toulemon, D. P.; Pichon, B.; Cattoën, X.; Wong Chi Man, M.; Begin-Colin, S. *Chem. Commun.* 47 (2011): 11954–11956.

²¹ (a) Figueiredo, W.; Schwarzacher, W. *Physical Review B* 77, no. 10 (2008): 1–9. (b) Serantes, D.; Pereiro, M.; Baldomir, D. *J. of Nanosci. and Nanotechnol.* 12, no. 9 (2012): 7416–7421.

²² Pichon, B. P.; Demortière, A.; Pauly, M.; Mougín, K.; Derory, A.; Bégin-Colin, S. *J. Phys. Chem. C.* 114, no. 19 (2010): 9041–9048.

²³ (a) Parker, D.; Dupuis, V.; Ladieu, F.; Bouchaud, J. P.; Dubois, E.; Perzynski, R.; Vincent, E. *Phys. Rev. B* 77 (2008): 1–9. (b) Zysler, R. D.; Fiorani, D.; Testa, A. M. *J. Magn. Magn. Mater.* 224 (2001): 5–11.

éstas se bloquearán “antes de tiempo” con cierta probabilidad de tener el momento magnético orientado en sentido antiparalelo al campo aplicado, originándose de esta manera efectos colectivos de congelamiento o freezing muy característicos de sistemas de nanopartículas muy compactos²⁴, que dan lugar incluso a máximos en la curva FC, originados por la aparición de fenómenos tipo vidrio de espín o *spin glass*. Esta es la razón de que en muchas ocasiones, sobre todo en el caso de muestras preparadas en polvo, la curva FC experimental se aleje enormemente del comportamiento esperado en un sistema SPM ideal. En estos casos, el modelo SPM para partículas no interaccionantes solo es capaz de reproducir la forma de la rama ZFC.

A.9.4. Imanación en Sistemas de Partículas Monodominio

El cálculo de la imanación en el modelo de partículas monodominio, parte de dos premisas básicas:

1. La población de nanopartículas, compuesta de monodominios magnéticos con anisotropía uniaxial, tiene sus ejes de fácil imanación orientados al azar.
2. Se asume que la interacción dipolar magnética entre las partículas es despreciable de forma que se tiene un conjunto de partículas independientes.

Esta segunda condición es la más difícil de verificar para sistemas de nanopartículas reales; esto implica que si se quieren obtener resultados que sirvan para caracterizar las partículas tomadas individualmente (momento magnético, tamaño, constante de anisotropía), el mejor procedimiento pasa por utilizar dispersiones suficientemente diluidas de nanopartículas en matrices no metálicas.

²⁴ Fiorani, D.; Testa, A. M.; Lucari, F.; D'Orazio, F.; Romero, H. *Physica B* 320, no. 1-4 (2002): 122-126.

A) Cálculo de la constante de anisotropía efectiva, K_{eff} , a partir de las curvas ZFC / FC: determinación de la temperatura media de bloqueo.

En un conjunto de dominios magnéticos individuales uniaxiales de tamaño D orientados al azar, dejando de lado la interacción dipolar, la constante de anisotropía efectiva es proporcional a la temperatura de bloqueo (T_B):

$$K_{eff} = \frac{k_B \ln(\tau_m/\tau_0)}{V} T_B \quad (\text{A. 14})$$

T_B se convierte en una medida experimental directa de la barrera de energía entre los dos estados fundamentales "arriba" y "abajo" del momento magnético de la partícula (KV). En la Ecuación (A. 14), τ_m es el tiempo característico del experimento (ventana de tiempo) y τ_0 es la inversa de la velocidad de fluctuación natural del momento magnético de las partículas.

En una medida de magnetización DC $\ln(\tau_m/\tau_0) \approx 25$, por lo que se deduce que, suponiendo un conjunto de partículas de tamaño idéntico, la constante de anisotropía eficaz se puede deducir directamente de T_B como:

$$K_{eff} = \left(\frac{25k_B}{V} \right) T_B \quad (\text{A. 15})$$

En un sistema ideal T_B coincide exactamente con el máximo de la curva ZFC. Teniendo en cuenta la dispersión de tamaños, la Ecuación (A. 15) se convierte en la siguiente:

$$K_{eff} = \left(\frac{25k_B}{V} \right) \langle T_B \rangle \quad (\text{A. 16})$$

donde $\langle T_B \rangle$ es el promedio de las temperaturas de bloqueo de la población, cada una de ellas dependiendo del tamaño de una partícula dada. Cabe destacar que, en un conjunto de partículas con cierta dispersidad, $\langle T_B \rangle$ no se encuentra en el máximo de la curva ZFC.

Con el fin de calcular la temperatura media de bloqueo, es necesaria la determinación de la $f(T_B)$ (proporcional a la distribución de la barrera de

energía). La distribución de las barreras de energía se puede obtener por una sustracción directa de las curvas FC y ZFC. El resultado es proporcional al número de partículas bloqueadas lo cual disminuye con la temperatura ya que la energía térmica está superando gradualmente la energía de anisotropía. La velocidad de cambio de esta población es directamente proporcional a la probabilidad de encontrar un proceso de activación térmica a una temperatura dada y, por lo tanto, proporcional a la distribución de las temperaturas de bloqueo. De este modo, se deduce que:

$$f(T_B) \sim \frac{d}{dT}(M_{FC} - M_{ZFC}) \quad (\text{A. 17})$$

De esta manera y después de normalizar la derivada de la diferencia entre ZFC y FC con la condición $\int f(T_B)dT_B = 1$, la temperatura media de bloqueo viene dada por:

$$\langle T_B \rangle = \int_0^{\infty} T f(T_B)dT_B \quad (\text{A. 18})$$

A.10. Hipertermia Magnética

Las medidas del *índice específico de absorción* (SAR) se han llevado a cabo en un equipo diseñado por investigadores del departamento de Electricidad y Electrónica de la Facultad de Ciencia y Tecnología de UPV/EHU. Dicho equipo consiste en una bobina conectada a un circuito LC resonante alimentado por un amplificador de potencia. El sistema se ha calibrado para lograr un campo magnético de frecuencia e intensidad conocidas. En todos los casos la muestra se coloca en el centro de la bobina donde el campo magnético es más uniforme e intenso. Para reducir la transferencia de calor con el medio, un vaso *Dewar* especialmente diseñado recubre la muestra (Figura A. 14). Para los experimentos *in vivo* se ha recurrido a un segundo prototipo diseñado y construido para animales pequeños que se basa en un circuito resonante LCC alimentado por un amplificador de potencia. Los campos magnéticos de corriente alterna se

generan por un inductor de núcleo de aire. Con el fin de asegurar la estabilidad eléctrica y evitar el calentamiento resistivo, el inductor se refrigeró con agua a través de las tuberías conectadas a un refrigerador externo.



Figura A. 14. Equipo ubicado en el departamento de Electricidad y Electrónica de la Facultad de Ciencia y Tecnología de UPV/EHU. (A) Amplificador de potencia y (B) Bobina y Dewar.

Las nanopartículas magnéticas candidatas para terapias de hipertermia magnética se clasifican en relación al mecanismo de inducción térmica²⁵, y existen dos tipos fundamentalmente; partículas multidominio (ferromagnéticas), y partículas monodominio ferro o superparamagnéticas. Dependiendo del tipo de partículas, la generación de calor proviene de diferentes mecanismos físicos: i) Movimiento de paredes de bloch, (en sistemas multidominio), ii) Relajación de Néel (en sistemas monodominio) y iii) Relajación Browniana (pérdidas por fricción en suspensiones viscosas)²⁶.

El concepto de pérdida por histéresis, aunque se relaciona comúnmente con el movimiento de paredes en materiales multidominio, es más general e incluye los tres primeros mecanismos físicos descritos. Cuando se somete un sistema SPM, FM monodominio o multidominio a un campo magnético alterno, AC, de una frecuencia dada, la imanación de cada partícula tendrá, en general, un retraso con respecto al campo excitador (histéresis) y, por consiguiente, habrá absorción neta de energía que se transforma en calor.

²⁵ Pankhurst, Q.A.; Connolly, J.; Ones, S.K.; Dobson, J. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003): 167–181.

²⁶ Laurent, S.; Dutz, S.; Häfeli, U.; Mahmoudi, M. *Adv. Colloid Int. Sci.* 166, no. 1 (2011): 8–23.

Dicha absorción o potencia absorbida por unidad de volumen está dada por la ecuación.

$$P_{\text{SPM,FM}} = \mu_0 f \oint \text{HdM} \quad (\text{A. 19})$$

donde μ_0 es la permeabilidad magnética del vacío y $f(\text{Hz})$, la frecuencia del campo alterno. En general, la respuesta de un conjunto de partículas a un campo excitador externo variable con el tiempo puede ser descrita en términos de la susceptibilidad compleja $\chi = \chi' + i\chi''$ donde tanto χ' como χ'' son magnitudes dependientes de la frecuencia de excitación. La parte imaginaria, χ'' , que define la componente que está desfasada con respecto a la excitación AC, representa el retraso de la imanación con respecto a ésta, y consecuentemente la absorción y la transferencia de calor. De este modo, la potencia absorbida por unidad de volumen a una frecuencia f y a un campo H dados, se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$P_{\text{SPM,FM}} = \mu_0 \pi f \chi'' H^2 \quad (\text{A. 20})$$

En un sistema multidominio los momentos de cada átomo no giran coherentemente en un supermomento, sino que están divididos en dominios magnéticos y, en este caso, el proceso de inversión de la imanación sucede mediante el movimiento de las paredes de Bloch. Dado que la hipertermia se lleva a cabo a altas frecuencias (105-106 Hz), los sistemas multidominio no parecen muy apropiados para obtener tasas altas de absorción, ya que el desplazamiento de paredes requiere mucho más tiempo que el que proporciona el periodo de cada ciclo en la medida AC. Al disminuir el tamaño de partícula ocurre la transición a monodominio, en el que el proceso más sencillo de inversión de imanación es el modo uniforme propuesto por Stoner y Wohlfarth¹³, aunque también, además de éste, resultan modos más complicados derivados de la teoría micromagnética^{27,28}.

En un sistema compuesto por partículas monodominio en un medio líquido, la respuesta del sistema a la acción de un campo magnético variable

²⁷ Fidler, J.; Schrefl, T. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 33 (2000): 135.

²⁸ Aharoni, A. *J. App. Phys.* 30 (1959): 70.

con el tiempo es el resultado de dos procesos físicos distintos: (i) la rotación del momento magnético dentro de la partícula (*relajación de Néel*) y (ii) la rotación física de la propia partícula hacia el campo externo (*relajación Browniana*). Estos mecanismos de orientación, en los que se asume que se cumple una ley de tipo Arrhenius, se describen en los esquemas que se presentan en la Figura A. 15.

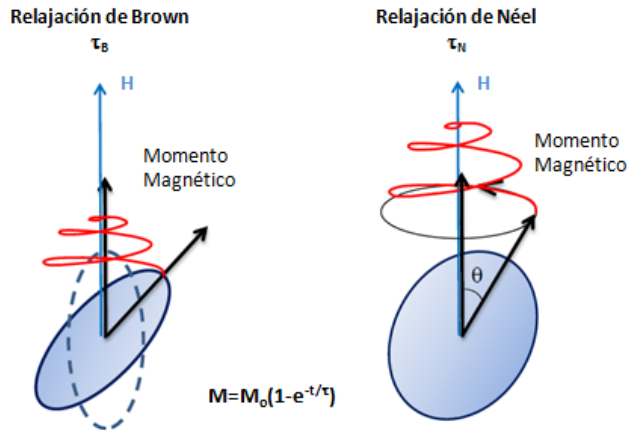


Figura A. 15. Esquema de los procesos de relajación del momento de una partícula monodominio en medio líquido en presencia de un campo magnético.

En el mecanismo de relajación de Néel la energía se transfiere a la red cristalina en forma de fonones (vibraciones de la red) al cabo de un tiempo característico τ_N que, en general, es función de la anisotropía magnética de la partícula, del campo aplicado y de la temperatura. Finalmente, esta energía acaba en el fluido circundante mediante transferencia de calor por contacto. En el caso de la relajación Browniana, el mecanismo físico transfiere directamente por fricción la energía al fluido en forma de calor. Ambos mecanismos están presentes y compiten; sin embargo, cuando la partícula no tiene posibilidad de rotar físicamente, el sistema sólo puede relajarse por el mecanismo de Néel. Una manera sencilla de definir estos tiempos característicos, es describiendo la inversión del momento magnético, en ausencia de campo aplicado, en función del tiempo.

En los sistemas formados por partículas monodominio de dimensión nanométrica la relajación del momento de la partícula está activada

térmicamente, de forma que la barrera energética dada por KV , donde K es la constante de anisotropía efectiva y V el volumen de la partícula, puede ser compensada por la energía térmica a una temperatura dada. Este hecho da lugar a la inversión espontánea de la imanación en ausencia de campo aplicado, fundamento del comportamiento superparamagnético (SPM). En este proceso de inversión espontánea de la imanación, el tiempo de relajación τ_N , es una medida del tiempo que transcurre entre dos inversiones espontáneas consecutivas. Este tiempo de relajación de Néel, τ_N , en ausencia de campo aplicado viene determinado por la razón entre la energía de anisotropía, KV , de las partículas y la energía térmica, $k_B T$:

$$\tau_N N = \tau_0 e^{KV/k_B T} \quad \tau_0 \approx 10^{-9} - 10^{-12} \quad (\text{A. 21})$$

donde τ_0 son las tentativas de salto. Una descripción más detallada tiene en cuenta la dependencia de las tentativas de salto con la temperatura y la propiedad magnética de la partícula²⁹ (Ecuación (A. 22)).

$$\tau_N = \frac{\tau_0}{2} \left(\frac{\pi k_B T}{KV} \right)^{1/2} e^{KV/k_B T} \quad (\text{A. 22})$$

Si este proceso sencillo de inversión de la imanación fuera debido al mecanismo Browniano, también activado térmicamente, el tiempo de relajación, τ_B , es una medida del tiempo que tarda la partícula en darse la vuelta espontáneamente. Este tiempo de relajación Browniano se describe mediante el modelo de Debye, que fue desarrollado para definir dispersiones eléctricas en fluidos polares, y depende del radio hidrodinámico de la partícula, r_h , de la viscosidad del fluido, η y de la energía térmica, $k_B T$ (Ecuación (A. 23)).

$$\tau_B = \frac{4\pi\eta r_h^3}{k_B T} \quad (\text{A. 23})$$

Cuando los dos mecanismos de relajación descritos están presentes, el más rápido, correspondiente a un tiempo de relajación más pequeño, será el

²⁹ Brown, W. F. *Phys. Rev. B* 130 (1963): 1677.

dominante, por lo que se puede definir un tiempo de relajación efectivo, τ_{eff} mediante la ecuación:

$$\frac{1}{\tau_{eff}} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad (\text{A. 24})$$

Para que ambos procesos de relajación sean relevantes en el fenómeno de absorción, tanto τ_N como τ_B deben ser “suficientemente” grandes, lo que en presencia de un campo magnético variable con el tiempo, AC, significa que sean al menos comparables al inverso de la frecuencia de ese campo, es decir, al periodo (t) de cada ciclo.

En este punto, cabe señalar la relevancia de lo que se denomina ventana de tiempo del experimento. Tal y como se señaló en la introducción general, la definición de régimen SPM o FM en partículas monodominio depende del tiempo de medida. En este caso, donde se aplica un campo alterno (AC) cuyo periodo es t , el sistema se encontraría en régimen SPM estricto cuando $\tau_{eff} \ll t$, y en régimen FM con el momento totalmente bloqueado cuando $\tau_{eff} \gg t$. En cambio cuando el tiempo de relajación y la ventana de tiempo son comparables ($\tau_{eff} \sim t$), el sistema se encuentra en una situación intermedia (ley de Arrhenius, Figura A. 15), donde el retraso del momento con respecto al campo externo es causante de la generación de calor.

Para una partícula monodominio la componente imaginaria de la susceptibilidad es función del tiempo efectivo de relajación, τ_{eff} , a través de la siguiente expresión:

$$\chi''(\omega) = \chi_0 \frac{\omega\tau_{eff}}{1+(\omega\tau_{eff})^2} \quad \chi_0 = \frac{\mu_0 M_S^2 V}{3k_B T} \quad (\text{A. 25})$$

donde ω es la frecuencia angular ($2\pi f$) y χ_0 es la susceptibilidad estática. Nótese que cuando $\tau_{eff} \rightarrow 0$ ó ∞ , la componente imaginaria y, consecuentemente, la transferencia de calor tienden a cero. Nótese además que la susceptibilidad imaginaria χ'' es proporcional a la imanación de saturación de la partícula M_S y al momento magnético total de la misma $M_S V$. La optimización de ambas propiedades es esencial si se quiere obtener nanopartículas con aplicación en las terapias de hipertermia magnética.

Sustituyendo la definición de χ'' en la expresión general (A. 20), e incluyendo la densidad del material (ρ) se puede calcular la potencia absorbida por unidad de masa para un campo y a una frecuencia dada, suponiendo partículas de volumen V .

$$P\left(\frac{W}{g}\right) = \frac{P(W/cm^3)}{\rho} = \frac{\mu_0 \omega H^2 M_S^2 V}{\rho 3k_B T} \frac{\omega \tau_{eff}}{1 + (\omega \tau_{eff})^2} \quad (\text{A. 26})$$

donde $P(W/cm^3)$ es la potencia volumétrica del sistema FM o SPM y ρ (g/cm^3) es la densidad del material magnético. El índice específico de absorción, SAR, experimental se puede ajustar a una expresión que tiene en cuenta la existencia de una distribución de tamaños, de forma que la potencia absorbida total se calcula sumando las contribuciones correspondientes a cada diámetro de la distribución (Expresión (A. 27)).

$$SAR(f, K) = \int_0^{D_{max}} P(D, f, K) f(D) d(D) \quad (\text{A. 27})$$

donde $f(D)$ es la distribución de diámetros obtenida del TEM y $P(D, f, K)$, la potencia absorbida correspondiente a un diámetro y a una frecuencia dada, depende de un único parámetro libre que es la constante de anisotropía efectiva K de la distribución de partículas a temperatura ambiente.

La expresión de la potencia absorbida (a un campo y a una frecuencia dadas) como función del tiempo de relajación efectivo corresponde a una función racional de tipo $y(x) = ax/(1+a^2x^2)$, donde el máximo de la función se obtiene cuando τ_{eff} corresponde a la inversa de la frecuencia angular ω del campo AC (Ecuación (A. 28)).

$$P(\tau_{eff}) = A \frac{\omega \tau_{eff}}{1 + (\omega \tau_{eff})^2} \quad (\text{A. 28})$$

donde A es una constante que depende de la frecuencia (ω), de la intensidad del campo (H) AC, de la susceptibilidad estática χ_0 de la densidad del material (ρ), y de la temperatura (T). La constante A representa la amplitud de la función y aumenta linealmente con la frecuencia y con el cuadrado del campo AC. Debido a limitaciones instrumentales, los campos y las

frecuencias más altas generadas suelen ser de 23 kA/m y 900 kHz, respectivamente. No obstante, es importante que el producto de Hxf empleado en el experimento no exceda de ciertos límites ($4.85 \times 10^8 \text{ A/m s}^{-1}$) para evitar corrientes inducidas en los tejidos que pueden dañar el cuerpo humano²⁶. Es por ello de crucial importancia el diseño de un material apropiado para obtener valores altos de potencia absorbida, que serán proporcionales siempre a la susceptibilidad DC del sistema, χ_0 . En la Figura A. 16 se han representado 4 curvas que representan la potencia absorbida en función del tiempo de relajación para partículas de diferente tamaño (8 ,10, 12 y 14 nm de diámetro) de Fe_3O_4 (M_S de 480 kA/m) a $f=900$ kHz, a $H=10$ kA/m y a temperatura ambiente.

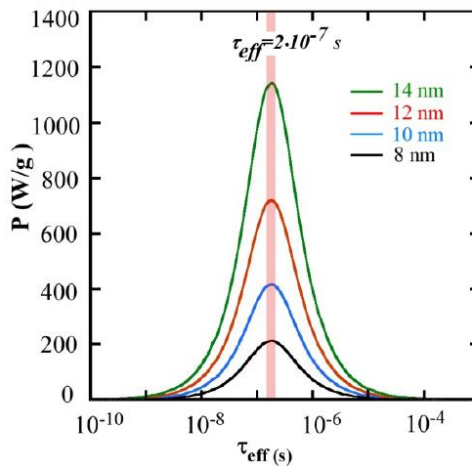


Figura A. 16. Potencia absorbida en función del tiempo de relajación para partículas de diferente tamaño (8 ,10, 12 y 14 nm de diámetro) de Fe_3O_4 (M_S de 480 kA/m) a $H=10$ kA/m, $f = 900\text{kHz}$ y a temperatura ambiente.

Como era de esperar, un aumento de tamaño de partícula conduce a curvas con amplitudes mayores. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que el parámetro volumen está implícito en la determinación de τ_{eff} y que aunque la función se represente en un intervalo amplio de tiempos de relajación, experimentalmente sólo es posible moverse por un fragmento concreto de estas curvas. La τ_N puede cambiar levemente si el grado de aglomeración en la muestra o su grado de cristalinidad, por ejemplo, cambian, ya que ello conduciría a leves cambios en la constante de anisotropía K de la partícula.

Asimismo, τ_B puede modelarse ligeramente mediante el radio hidrodinámico y la viscosidad del medio líquido de modo que las características de la propia partícula definen la curva y también la zona donde se ubica y, por lo tanto, la potencia absorbida que le corresponde en unas condiciones determinadas de medida (H y f). Lo ideal sería diseñar un sistema con una curva de gran amplitud y que su τ_{eff} coincidiera con el máximo de la función (condición de resonancia). Sin embargo, la condición de resonancia es físicamente imposible a partir de un tamaño (cuando V es grande, la constante A aumenta y τ_{eff} también lo hace, encontrándose el sistema a la derecha del máximo). No obstante, como puede apreciarse en la Figura A. 16, un sistema con partículas mayores no implica necesariamente mayor potencia absorbida que otro con partículas de menor tamaño, si éste último se aproxima más a su condición de resonancia (máximo de su curva de absorción).

A.11. Bibliografía

- Abián, J.; Carrascal, M.; Gay, M. *Proteómica* 2 (2008): 16–34.
- Aharoni, A. *J. App. Phys.* 30 (1959): 70.
- Bae, C. J.; Angappane, S.; Park, J. G.; Lee, Y.; Lee, J.; An, K.; Hyeon, T. *Appl. Phys. Lett.* 91, no. 10 (2007): 4–6.
- Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 7 (1981) 325-327.
- Brown, M. *Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications* (London, U.K.: Chapman and Hall, 1988).
- Brown, W. F. *Phys. Rev. B* 130 (1963): 1677.
- Dormann, J. L.; Fiorani, D.; Tronc, E. *Advances in Chemical Physics* 96 (1997): 283.
- Farrell, D.; Cheng, Y.; Mccallum, R W.; Schan, M.; Majetich, S. A. *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005): 13409–13419.
- Fidler, J.; Schrefl, T. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 33 (2000): 135.
- Figueiredo, W.; Schwarzacher, W. *Physical Review B* 77, no. 10 (2008): 1–9.
- Fiorani, D.; Testa, A. M.; Lucari, F.; D'Orazio, F.; Romero, H. *Physica B* 320, no. 1–4 (2002): 122–126.
- Goldstein, J. I.; Yakowitz, H.; Lifshin, E.; Colby, J. W.; Coleman, J. R. *Practical Scanning Electron Microscopy* (New York, New Jersey: Plenum Press, 1975).
- Gubin, S. P. *Magnetic Nanoparticles* (Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH., 2009).
- Jenkins, R.; Snyder, R. L., *Introduction to X-Ray Powder Diffractometry* (New York, New Jersey: John Wiley & Sons, 1996).
- Laurent, S.; Dutz, S.; Häfeli, U.; Mahmoudi, M. *Adv. Colloid Int. Sci.* 166, no. 1 (2011): 8–23.
- Masunaga, S. H.; Jardim, R. F.; Fichtner, P. F. P.; Rivas, J. *Phys. Rev. B* 80, no. 18 (2009): 1–7.
- Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds* (New York, New Jersey: John Wiley&Sons, 1986).

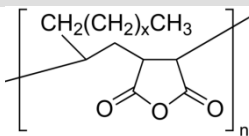
- Pankhurst, Q.A.; Connolly, J.; Ones, S.K.; Dobson, J. J. *Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003): 167–181.
- Parker, D.; Dupuis, V.; Ladieu, F.; Bouchaud, J. P.; Dubois, E.; Perzynski, R.; Vincent, E. *Phys. Rev. B* 77 (2008): 1–9.
- Pichon, B. P.; Demortière, A.; Pauly, M.; Mougin, K.; Derory, A.; Bégin-Colin, S. *J. Phys. Chem. C* 114, no. 19 (2010): 9041–9048.
- Raikher, Y. L.; Stepanov, V. I. *Phys. Rev. B* 50, no. 9 (1994): 6250–6259.
- Roepstorff, P.; Richter, W. J. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 789 (1992): 118–119.
- Saifit, A.; Dormannt, J. L.; Fioranit, D.; Renaudint, P.; Jové, J. J. *J. Phys. C* 21 (1988) 5295–5315.
- Serantes, D.; Pereiro, M.; Baldomir, D., *J. of Nanosci. and Nanotechnol.* 12, no. 9 (2012): 7416–7421.
- Steen, M.; Elisabeth, T. *Phys. Rev. Lett.* 72 (1994): 327.
- Stoner, E. C.; Wohlfarth, E. P., *Phil. Trans. Roy.Soc. A*-240, no. 4 (1948): 599–642.
- Toulemon, D. P.; Pichon, B.; Cattoën, X.; Wong Chi Man, M.; Begin-Colin, S. *Chem. Commun.* 47 (2011): 11954–11956.
- Tronc, E.; Morup, S. *Phys. Rev. Lett.* 72 (1994): 3278.
- Urtizberea, A.; Natividad, E.; Arizaga, A.; Castro, M.; Mediano, A. *J. Phys. Chem. C* 114, no. 11 (2010): 4916–4922.
- Wang, Q.; Jakubowski, J. A.; Sweedler, J. V.; Bohn, P. W. *Anal.Chem.* 76, no. 1 (2004): 1–8.
- West, A. R. *Solid State Chemistry and Its Applications* (Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, 1984).
- Wiekhorst, F.; Shevchenko, E.; Weller, H.; Kötzler, J. *Phys. Rev. B* 67 (2002): 12.
- Williams, D. B.; Carter, B. C. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science* (New York and London: Plenum Press, 1996).
- Zysler, R. D.; Fiorani, D.; Testa, A. M. *J. Magn. Magn. Mater.* 224 (2001): 5–11.

ANEXO B.

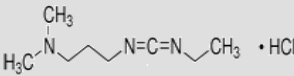
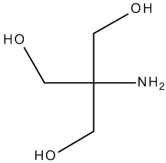
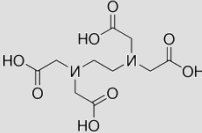
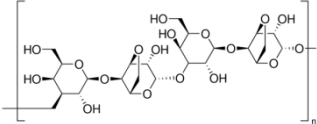
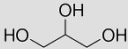
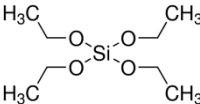
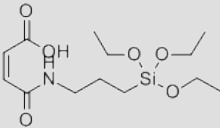
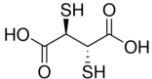
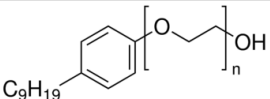
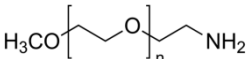
Reactivos y Disolventes

A continuación se describen los reactivos y disolventes empleados en la síntesis y en el revestimiento polimérico y funcionalización de las diferentes nanopartículas (Tabla B).

Tabla B.1. *Reactivos y disolventes, fórmula y abreviatura.*

Reactivos y disolventes	Fórmula	Abreviatura
Hidróxido de sodio	NaOH	
Pentacarbonilo de hierro (0)	Fe(CO) ₅	
Acetilacetonato de hierro (III)	Fe (C ₅ H ₇ O ₂) ₃	
1,2-hexadecanodiol	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ CHOHCH ₂ OH	
Oleilamina	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₂ NH ₂	
Ácido oleico	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	
Dibencil éter	(C ₆ H ₅ CH ₂) ₂ O	
Octadeceno	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ CH=CH ₂	
Tolueno	C ₆ H ₅ CH ₃	
Tetrahydrofurano	C ₄ H ₈ O	THF
Cloroformo	CHCl ₃	
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	
n-hexano	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃	
Acetona	CH ₃ COCH ₃	
Acido acético	CH ₃ COOH	HAc
Acido nítrico	HNO ₃	
Acido clorhídrico	HCl	
Poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno)		PMAO
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	
Tetraborato sódico decahidratado	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	

Reactivos

Reactivos y disolventes	Fórmula	Abreviatura
Hidrocloruro de (N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida		EDC
Tris-hidroximetilaminometano		TRIS
Ethylenediaminetetraacetic acid		EDTA
Agarosa		
Glicerol		
Tetraetilortosilicato		TEOS
Ácido trietoxisililpropilmaleámico		TESPMA
Ácido mercaptosuccínico		DMSA
Dimetilsulfóxido	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$	DMSO
IGEPAL-CO520		
Buffer salino de fosfato	$\text{KH}_2\text{PO}_4, \text{Na}_2\text{HPO}_4, \text{KCl}, \text{NaCl}$	PBS
Ciclohexano	C_6H_{12}	
Hidróxido amónico	NH_4OH	
Polietilenglicol metil éter amina		Amino-PEG
DMEM medio celular		DMEM

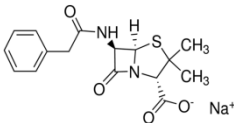
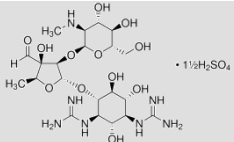
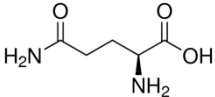
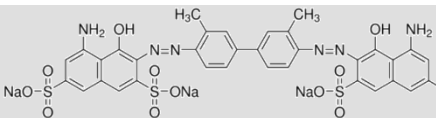
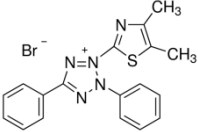
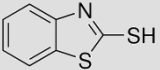
Reactivos y disolventes	Fórmula	Abreviatura
Tripsina		
Penicilina		
Estreptomicina		
L-glutamina		
Suero fetal bovino		
Células Vero		
Trypan Blue		
Bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio)		MTT
2-Mercaptobenzotiazol		MBT
Tiocianato potásico	KSCN	

Tabla B.2. Reactivos y disolventes, fórmula, suministrador (S), peso molecular (P.M.), pureza mínima (P), densidad (D).

Reactivos y disolventes	S.	P.M. (g/mol)	P. (%)	D. (g/cm ³)
Hidróxido de sodio	Aldrich	40,0	99	2,13
Pentacarbonilo de hierro (0)	Aldrich	195,90		1,49
Acetilacetato de hierro (III)	Aldrich	252,17	97	5,24
1,2-hexadecanodiol	Aldrich	258,45	90	ND

Reactivos

Reactivos y disolventes	S.	P.M. (g/mol)	P. (%)	D. (g/cm ³)
Oleilamina	ACROS	267,50	80-90	0,83
Ácido oleico	Aldrich	282,47	98	0,89
Dibencil éter	Aldrich	198,26	99	1,043
Octadeceno	Aldrich	252,48	90	0,79
Tolueno	Aldrich	92,14	99,5	0,87
Tetrahidrofurano	Aldrich	72,11	99	0,89
Cloroformo	Aldrich	119,38	99	1,47
Etanol	Panreac	46,07	96	0,81
n-hexano	Aldrich	86,18	99	0,66
Acetona	Panreac	58,08	99,5	0,79
Acido acético	Aldrich	60,05	99	1,05
Acido nítrico	Panreac	63,01	69	1,41
Acido clorhídrico	Panreac	36,46	37	1,19
PMAO	Aldrich	30000-50000		0,97
Ácido bórico	Aldrich	61,83	99,5	ND
Tetraborato sódico decahidratado	Aldrich	381,37	99,5	1,73
EDC	Aldrich	191,70	99	ND
TRIS	Panreac	121,1		1,35
EDTA	Aldrich	292,24	99,4	
Agarosa	Aldrich			
Glicerol	Aldrich	92,09	99	1,25
TEOS	Aldrich	208,33	98	ND
TESPMA	Fluorochem	319,43		1,11
DMSA	Aldrich	182,22	98	ND
DMSO	Aldrich	78,13	99	ND
IGEPAL-520	Aldrich	441		
PBS	Panreac	137,99		0,99
Ciclohexano	Aldrich	84,16	99,5	0,78
Hidróxido amónico	Aldrich	35,05	28-30	0,9
Polietilenglicol metil éter amina	Aldrich	500		ND
DMEM medio celular	Lonza			
Tripsina	Aldrich			

Reactivos y disolventes	S.	P.M. (g/mol)	P. (%)	D. (g/cm ³)
Penicilina	Invitrogen	356,37	99,9	
Estreptomina	Invitrogen	728,69		
L-glutamina	Invitrogen	146,14	99	
Suero fetal bovino	Invitrogen			
Células Vero	ATCC			
Trypan Blue	Aldrich	960,81		
MTT	Aldrich	414,32		
MBT	Aldrich	167,25	97	
KSCN	Aldrich	97,18	99	

Tabla B.3. Reactivos y disolventes, número del Chemical Abstracts Service (N° CAS), códigos de riesgo (R) y códigos de seguridad (S).

Reactivos y disolventes	N° CAS	R	S
Hidróxido de sodio	1310-73-2	35	26-37/39-45
Pentacarbonilo de hierro (0)	13463-40-6	11/24/26/28	16/26/28/36/37/39/45
Acetilacetato de hierro (III)	14024-18-1	22-36	26
1,2-hexadecanodiol	6920-24-7		22-24/25
Oleilamina	112-90-3	34-50/53	26-36/37/39-45
Ácido oleico	112-80-1	38	
Dibencil éter	103-50-4	36/37/38-51/53	23-61
Octadeceno	112-88-9	65-66	62
Tolueno	108-88-3	11/20/38/48/63/65/67	
Tetrahidrofurano	109-99-9	11/19/36/37	16/29/33
Cloroformo	67-66-3	22-38-40-48/20/22	36/37
Etanol	64-17-5	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
n-hexano	110-54-3	11-38-48/20-51/53-62-65-67	9-16-29-33-36/37-61-62
Acetona	67-64-1	11-36-66-67	9-16-26
Acido acético	64-19-7	10-35	23-26-35
Acido nítrico	7697-37-2	35	23c-26-36-45

Reactivos

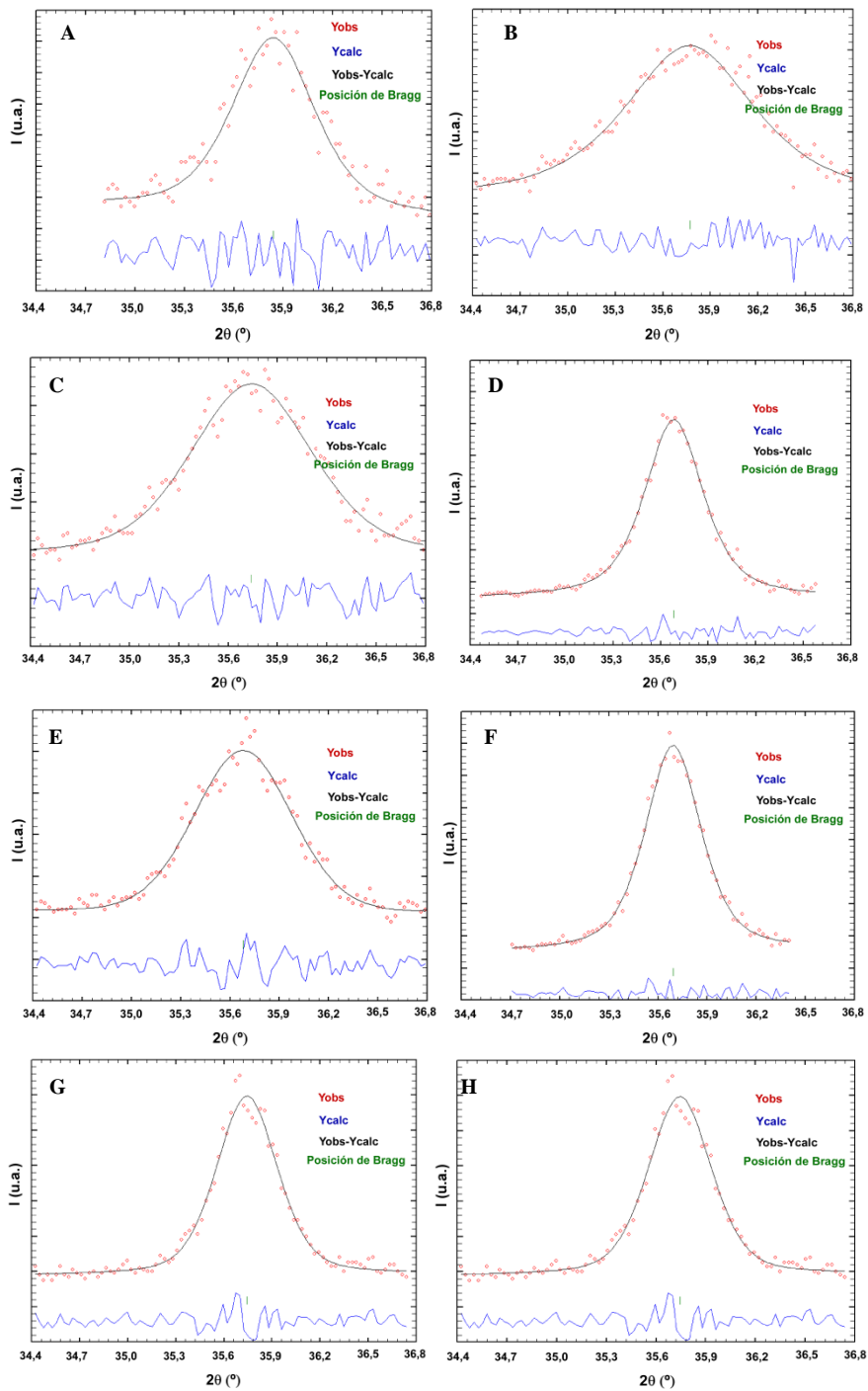
Reactivos y disolventes	N° CAS	R	S
Acido clorhídrico	7647-01-0	34-37	26-36/37/39-45
PMAO	25266-02-8	36/37/38	26-36
Ácido bórico	10043-35-3	60-61	53-45
Tetraborato sódico decahidratado	1303-96-4	60-61	53-45
EDC	25952-53-8	37/38	22-36/27/39
TRIS	77-86-1	36/38	26
EDTA	60-00-04		
Agarosa	39346-81-1		
Glicerol	56-81-5		
TEOS	78-10-4	10-20-36/37/38	26-36/37/39
TESPMA	33525-68-7	36/37/38	26-36/37/39
DMSA	304-55-2		
DMSO	67-68-5		
IGEPAL-520	68412-54-4	26/38	26
PBS	10049-21-5	36/37/38-36	26-36/37/39-36-39
Ciclohexano	110-82-7	11-20-38-50/53-65-67	9-16-25-33-60-61-62
Hidróxido amónico	1336-21-6	22-34-50	26-36/37/39-5-61
Polietilenglicol metil éter amina	80506-64-5		
DMEM medio celular			
Tripsina	9002-07-7	36/37/38-42	22-24-26-36/37
Penicilina	69-57-8		
Estreptomicina	3810-74-0		
L-glutamina	56-85-9		
Suero fetal bovino			
Trypan Blue	72-57-1	45	53-45
MTT	298-93-1	36/37/38-68	26-36/37
MBT	149-30-4		
KSCN	333-20-0		

ANEXO C.

Información Suplementaria

En el presente anexo se incluyen algunos datos y cálculos experimentales que complementan los resultados mostrados a lo largo de la memoria. Se seguirá el orden de presentación de la memoria, indicando el apartado al cual pertenecen dichos resultados.

C.1. Difracción de Rayos X



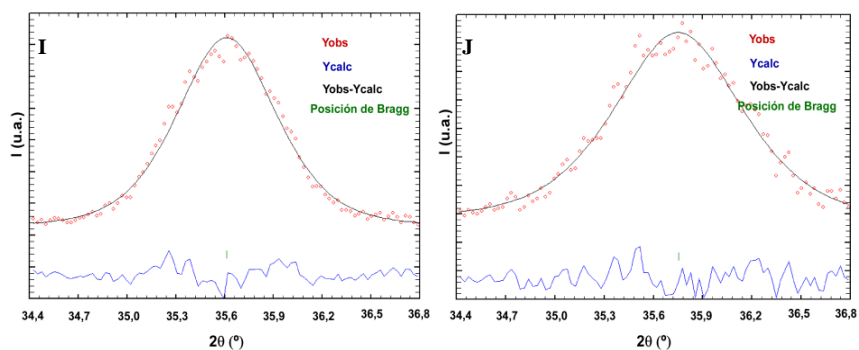
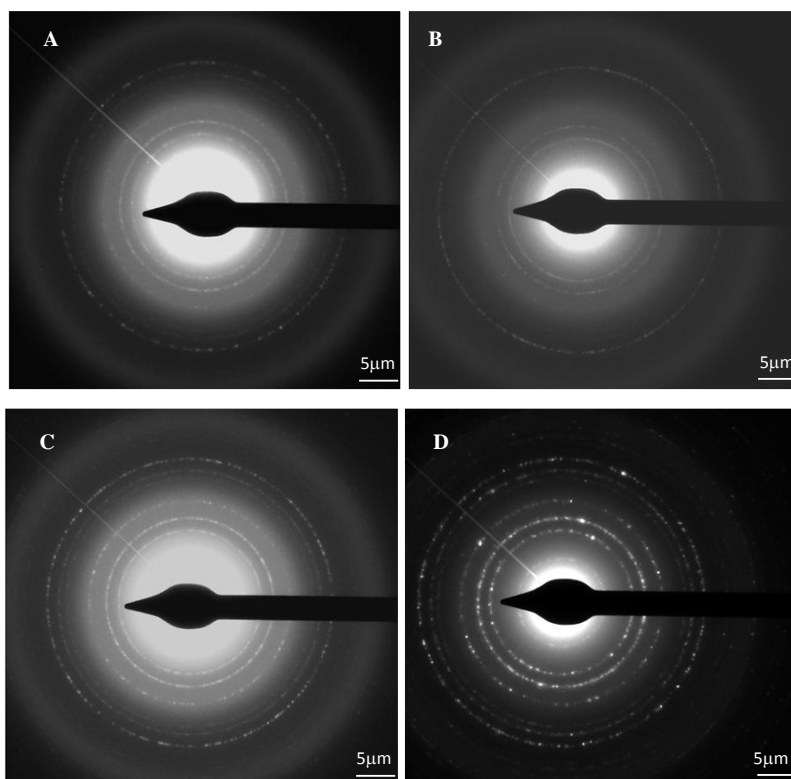


Figura C.1. Deconvolución del máximo (311) de la Fe_3O_4 para las muestras a partir de $Fe(CO)_5$ Pol 25 (A), Pol 28 (B), Pol 29 (C), Pol 30 (D), Pol 34 (E), y para las muestras a partir de $Fe(acac)_3$ Pol 32 (F), Pol 33 (G), Pol 36 (H), Pol 42 (I) y Pol 47 (J).

C.2. Microscopía Electrónica de Transmisión



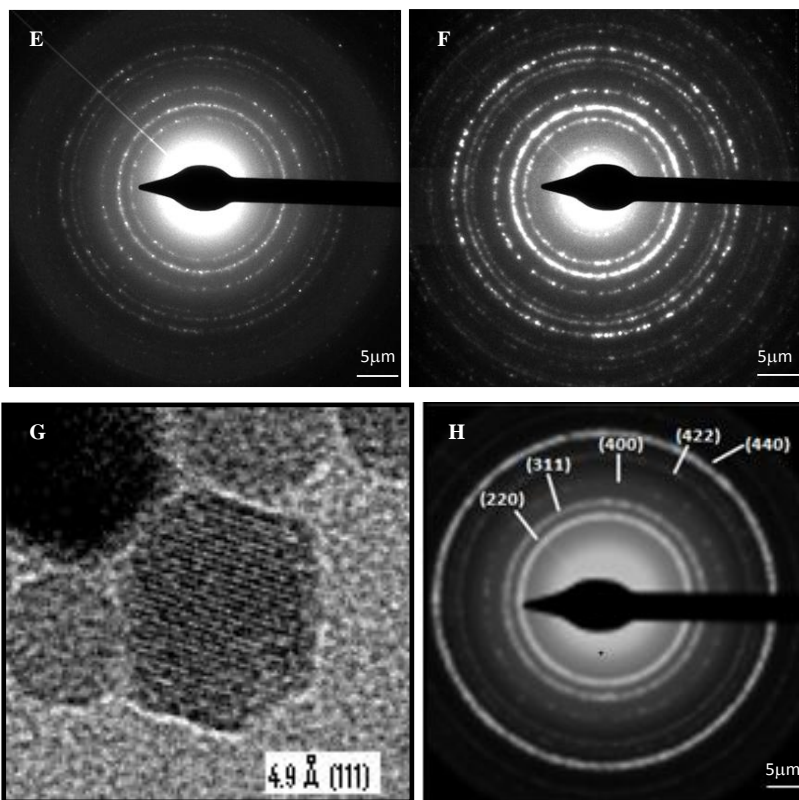


Figura C.2. Patrones de Difracción de Electrones de las muestras Pol 28 (A), Pol 29 (B), Pol 30 (C), Pol 33 (D), Pol 45(E) y Pol 47 (F). Imagen de la distancia interplanar (111) de la muestra Pol 28 (G). Patrón de Difracción de Electrones indexado de un área seleccionada de la muestra Pol 25 (H).

C.3. Magnetometría

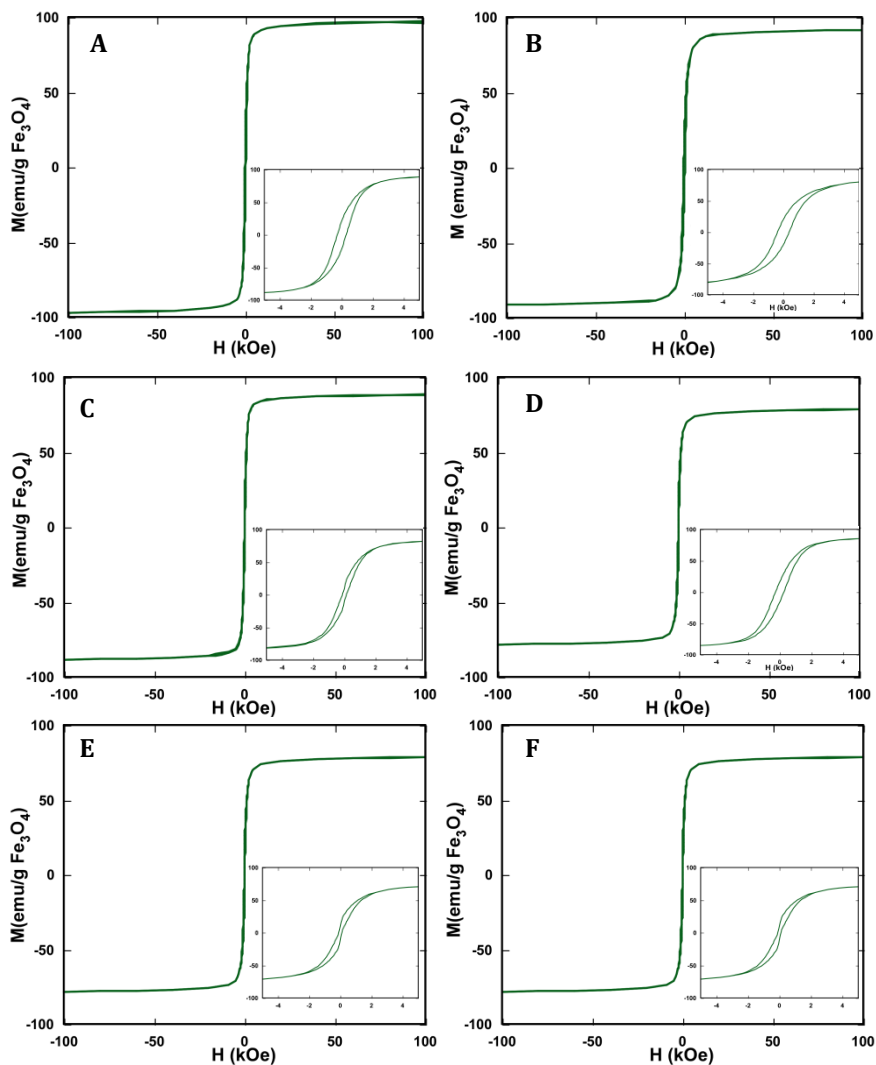


Figura C.3. Ciclos de histéresis a 5K medidas hasta campos de 100kOe para las muestras Pol28 (A), Pol 29 (B), Pol30 (C), Pol 32 (D), Pol33 (E) y Pol 47 (F).

C.4. Hipertermia Magnética

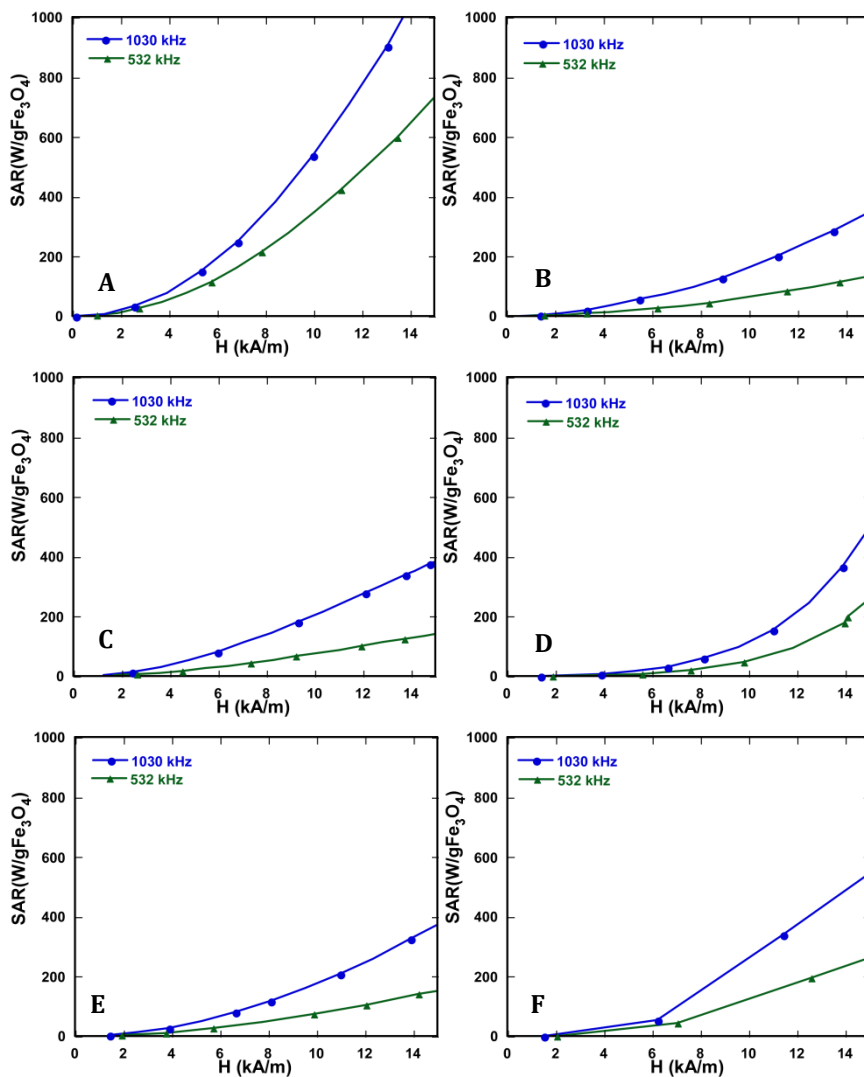


Figura C.4. Valores de SAR de las muestras Pol 25 (A), Pol 29 (B), Pol 30 (C), a partir de $Fe(CO)_5$ y Pol 32 (D), Pol 33 (E), Pol 45 (F) a partir de $Fe(acac)_3$ en función del campo AC a 532 y 1030 kHz.

C.5. Ensayos *in vivo*

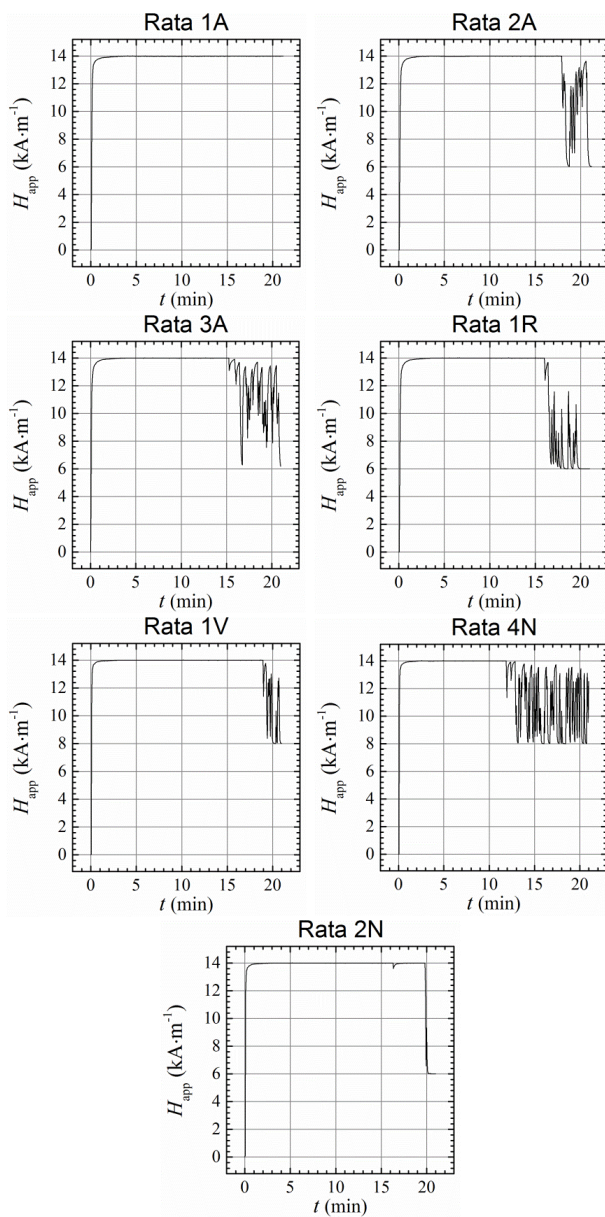
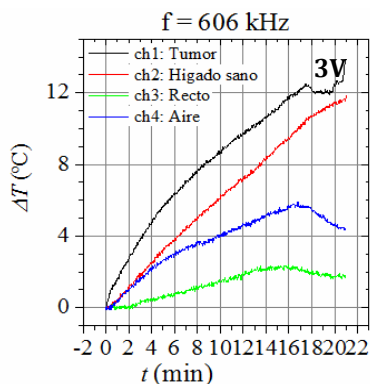
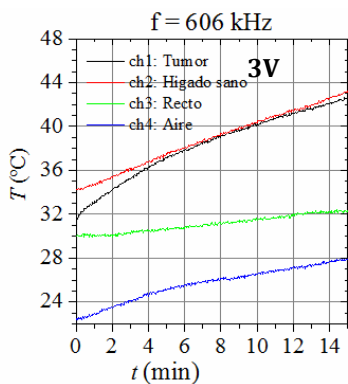
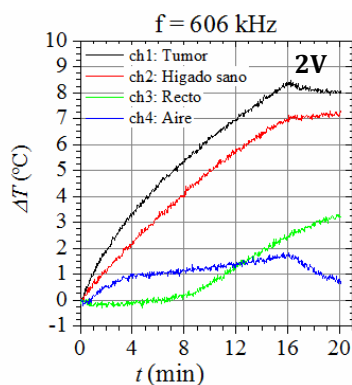
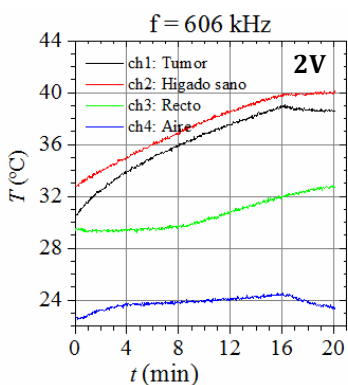
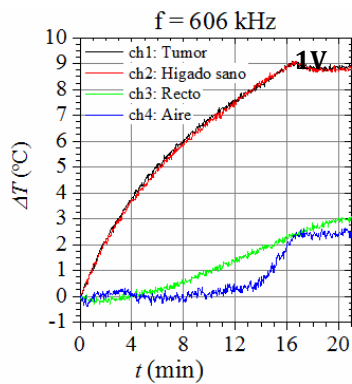
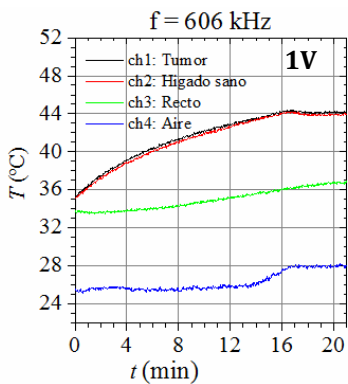
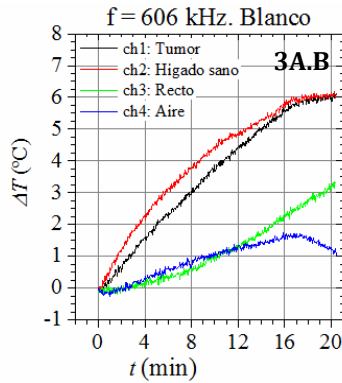
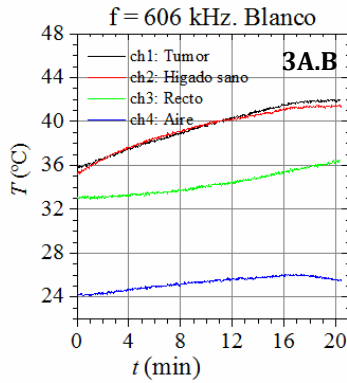
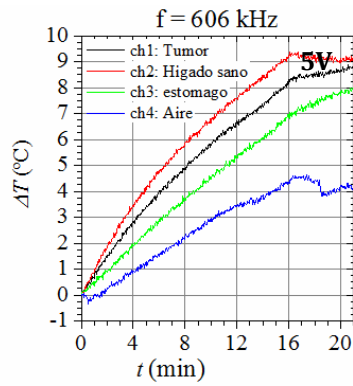
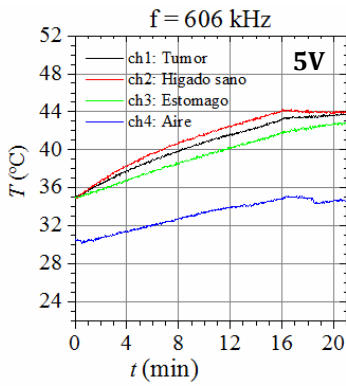
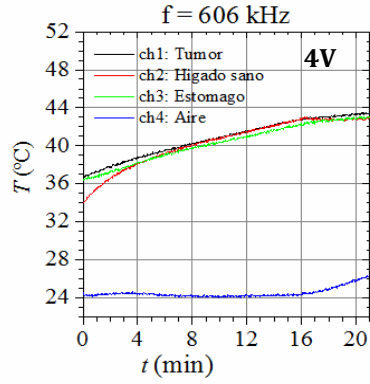
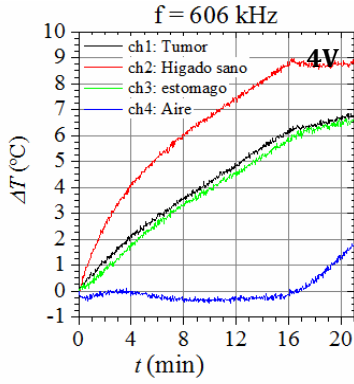


Figura C.5. Intensidad de campo frente a tiempo para los experimentos de HT realizados sobre los animales 1A, 2A, 3A, 1R, 1V, 4N y 2N.





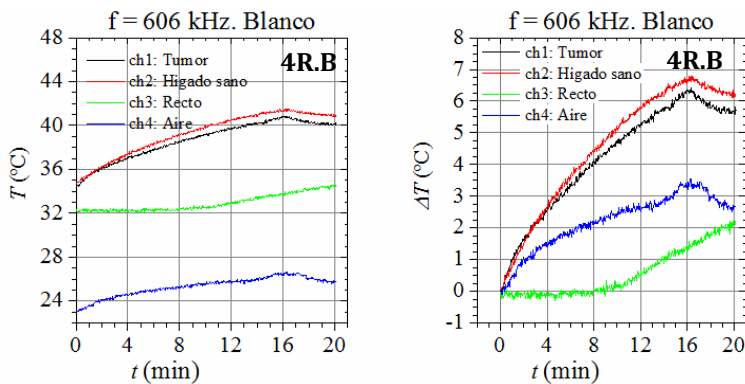
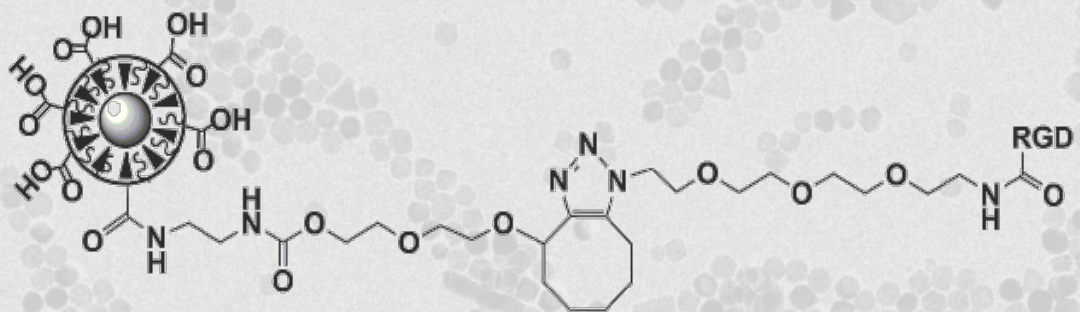


Figura C.6. Monitorización de T^a en diferentes tejidos en valores absolutos (izq.) e incremento térmico (drcha.). Valores determinados en ratas infundidas con MNP-RGD en las ratas (1V, 2V, 3V, 4V, 5V, 3A.B y 4R.B). El experimento se realiza aplicando 606 kHz de frecuencia y 14 kA/m los primeros 16 minutos. Posteriormente se baja la intensidad a 10-11kA/m hasta completar 21 minutos.



La aplicabilidad biomédica de los nanomateriales se basa, además de en sus propiedades específicas, en la compatibilidad de su tamaño con las dimensiones de los sistemas biológicos. Estas características los habilitan para estrategias terapéuticas y de diagnóstico que pueden evitar muchos de los riesgos asociados a la cirugía, a la falta de selectividad de las terapias utilizadas y a la prolongación de los tratamientos. No obstante, la aplicabilidad de estos materiales depende de alcanzar un alto grado de control en términos de tamaño, morfología, estructura, cristalinidad y química de superficie, lo que implica diseñar y optimizar rutas sintéticas específicas para cada sistema.

En el caso de las nanopartículas magnéticas el principal interés reside en su posible utilización en resonancia magnética de imagen, transporte de fármacos o tratamientos con hipertermia magnética. Dado que para estas aplicaciones los materiales deben ser biocompatibles, son los óxidos de hierro los que han despertado un mayor interés, y especialmente la magnetita, debido a sus altos valores de magnetización de saturación, su anisotropía magnética, y la posibilidad de adaptar sus tamaños de partícula, ya que estos parámetros influyen fuertemente en la tasa de absorción específica de energía (SAR).

Es en este contexto en el que se enmarca el trabajo aquí presentado, en la optimización de una estrategia de síntesis que permita obtener nanopartículas de magnetita de tamaño controlado, con elevados valores de SAR, biocompatibles, estables en medio fisiológico y funcionalizadas con péptidos miméticos RGD afines a las integrinas que se sobre-expresan en el endotelio del tumor en procesos de angiogénesis.