ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Manuel Antonio
González Gómez

Tesis doctoral

Nanoestructuras magnéticas multifuncionales para aplicaciones biomédicas

Santiago de Compostela, 2022

Programa de doctorado en Nanomedicina

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

TESE DE DOUTORAMENTO

NANOESTRUCTURAS MAGNÉTICAS MULTIFUNCIONALES PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

Manuel Antonio González Gómez

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN NANOMEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2022

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

D. **Manuel Antonio González Gómez**

Título de la tesis: **Nanoestructuras magnéticas multifuncionales para aplicaciones biomédicas**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.

2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.

3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En Santiago de Compostela, 17 de febrero de 2022

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Nanoestructuras magnéticas multifuncionales para aplicaciones biomédicas

D. José Rivas Rey (director y tutor de la Tesis)
Dª. Yolanda Piñeiro Redondo (directora de la Tesis)

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D. Manuel Antonio González Gómez, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación del doctorando fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 17 de febrero de 2022

El doctorando declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la Tesis Doctoral.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Agradecimientos

En primer lugar, tengo que comenzar mencionando a mis padres, a Rosario y Antonio, tengo tanto que agradecerles, por enseñarme lo que es el amor incondicional, la amistad, el apoyo, la constancia, la perseverancia…gracias a vosotros me he convertido en lo que soy. Obrigado Fran pelo teu apoio incondicional e leal, por me levantar nos momentos de fraqueza, realmente sem ti esta vitória sería difícil de alcançar. Al resto de mi familia: abuelos, en especial a mi abuela Antonia, a mi hermano Juan (por esas complicidades entre nosotros), tíos, Dama, Yogui, Tina, à minha família portuguesa…sin el apoyo de todos vosotros, este logro nunca se hubiese conseguido.

A mis directores de Tesis, Yoly y Pepe, gracias por esta oportunidad para desarrollar esta Tesis, por el apoyo recibido y por ayudarme a crecer y madurar científicamente, por las tantas charlas para encarrilar ideas, por confiar en mí, por permitirme las varias estancias de formación que he realizado durante estos años, por las publicaciones. Definitivamente, GRACIAS.

A Carlos Vázquez, por ser mi "mentor" en el desarrollo de nanopartículas magnéticas y metálicas, por enseñarme a utilizar los equipamientos y a analizar resultados.

I would like to express my gratitude to Prof. Carlos Rodríguez, Prof. Matteo Santin, Prof. Uwe Himmelreich, Prof. Jorge Mira, Prof. Alberto Coelho, Dr.Valeria Perugini, Dr.Willy Gsell, Dr. Freederik Cleeren, Dr. Gonçalo Doria, Dr. Tomás Sobrino, Dr. Francisco Campo, Dr. Andrés da Silva, Dr. Adrián Posado, Dr. Ana Zamora, Dr. Sarah Belderbos and collegues during my pre-doctoral stays. I am very happy to blend with people from different cultures, who have been sharing their knowledges, experience, and good vibes with me.

A Ana Cabre, Tatiana y Eldara, gracias por vuestra confianza, comprensión, enseñanzas y apoyo como integrante de NANOGAP, que me abrió la puerta a nuevas oportunidades profesionales.

A las unidades de Rayos X, IR RAMAN y Microscopía Electrónica y Confocal de Red de Infraestructuras de Apoyo a la Investigación y al Desarrollo Tecnológico (RIAIDT-USC), a la Unidad de Microscopía Confocal del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), a la Unidad de Elementos Traza Espectroscopia y Especiación (GETEE) y al Servicio de Nanotecnoloxía e Análise de Superficies (C.A.T.I., Vigo), destacando por su gran labor a Bruno e Inés; María José (gracias en especial a ti por toda la ayuda prestada e incluso por asistir a mi charla del NerdNite), Alba (por esas cargas de trabajo que te he dado y por la eficiente respuesta en analizar las NPs), Raquel, Merche y Miro; Ezequiel; Marta (por esas imágenes tan buenas de fluorescencia realizadas a tiempo real conmigo); Paloma (por la ayuda en obtener los resultados pronto) y a Carmen (por tu más que suficientes explicaciones, y largas conversaciones telefónica, de la técnica XPS y de los resultados obtenidos).

A mis amigos de siempre, Marcos, Carmela, Tere, mulher Ana, Luchana, por aguantarme todo este tiempo, mis charlas químicas desde el inicio de mi carrera científica, mis locuras y lo que os queda…a mis maruxos: Iria C (por esos TGAs realizados que me han salvado de durante

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

todo este tiempo), Iria P, Tania y Darío. A Yang, Hugo, Fernanda, Lara, Renata, André, Rober, Andrés, María, Ángela, Ale e Inma.

A mis amigos, compañeros y a toda la plantilla de NANOMAG, por esos bonitos momentos durante la Tesis, por las risas y por la ayuda ofrecida (a Susana y Pelayo a la hora de interpretar los resultados, tanto estructurales como magnéticos, a Ángela (Angélica) por la ayuda a la hora de solventar "problemas" informáticos, la ayuda en la síntesis y la alegría que transmite trabajar con ella, a Lisa y a Carmen por la ayuda a la hora de hacerme algunas medidas en el DLS o llevarme muestras al CACTUS), a todos vosotros, ¡¡Muchas gracias!!

A los proyectos europeos PANA (Call H2020-NMP-2015- two-stage, Grant N. 686009), MADIA (732678-MADIA-H2020-ICT-2016) y BOW (FETPROACT-EIC-05-2019, Grant 952183), al Programa de la Consellería de Educación para el Desarrollo de la Agrupación Estratégica de Materiales (AeMAT) de la Universidad de Santiago de Compostela (Grant N. ED431E2018/08), a la Red Galega de Nanomedicina, al programa de consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas GRC2017 (Grant N. ED431C 2017/22), Xunta de Galicia y al Ministerio de Ciencia e Innovación (ref PID2020-112626RB-C21, Modalities «Research Challenges» and «Knowledge Generation»).

Everything has its wonders, even darkness and silence, and I learn, whatever state I may be in, therein to be content.

Helen Keller

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Resumen

Recientemente, el estudio y aplicación de los nanomateriales magnéticos ha despertado un enorme interés en la comunidad científica, especialmente en el ámbito biomédico. La posibilidad de manipular procesos biológicos en el rango de la nanoescala, está abriendo el camino a hitos en la medicina personalizada, dando lugar a la aparición de nuevos enfoques teragnósticos, difíciles de lograr con las terapias convencionales. De esta manera, se solventan limitaciones clínicas mediante estrategias alternativas que puedan contribuir al diagnóstico temprano de enfermedades, que actualmente solo son detectables en estadíos avanzados (enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo), y al tratamiento local (en las áreas de cáncer y medicina regenerativa, entre otras).

Dentro de los nanomateriales magnéticos para usos teragnósticos, las nanopartículas superparamagnéticas constituyen en la actualidad una de las herramientas más prometedoras, y de gran utilidad, dentro de este campo, por las características físicas que poseen, destacando su versatilidad y biocompatibilidad.

En la presente Tesis Doctoral se han desarrollado nanomateriales para diversas aplicaciones biomédicas in vitro o in vivo, ahondando en dos objetivos principales:

1) El desarrollo mediante distintos tipos de síntesis, optimización y estudio de nanoestructuras magnéticas, con diferentes tipos de revestimientos biocompatibles, tales como moléculas, polímeros u óxidos inorgánicos, que permitieron integrar, de manera estable, compuestos con actividad teragnóstica, como moléculas o biopolímeros fluorescentes, agentes biológicos, agentes de contraste positivos o negativos para imagen por MRI o radiotrazadores para imagen PET. De este modo, se han conseguido nanoestructuras magnéticas multifuncionales que integran en una única estructura materiales con propiedades específicas con potenciales aplicaciones en biomedicina.

Y 2) la efectividad de las nanoestructuras magnéticas diseñadas, testadas en diversas aplicaciones biomédicas, tales como: la capacidad de cruce “in vitro” de una barrera hematoencefálica simulada mediante células endoteliales de cerebro humano; la respuesta como agentes de contraste, en imagen por MRI, PET o multimodal en ensayos in vitro o in vivo; la capacidad de preconcentrar péptidos Aβ 1-42 mediante el uso de una cámara de agregación magnética; la capacidad de manipular la expresión génica en células HeLa, por medio de una magnetofección de ADN plasmídico y la capacidad de internalización en células con el fin de separarlas magnéticamente.

Summary

Recently, the study and application of magnetic nanomaterials has arisen enormous interest in the scientific community, especially in the biomedical field. The possibility of manipulating biological processes in the nanoscale range is opening the way to milestones in personalized medicine, giving rise to the appearance of new theragnostic approaches, difficult to achieve with conventional therapies. In this way, clinical limitations are solved through alternative strategies that can contribute to the early diagnosis of diseases, which are currently only

detectable in advanced stages (neurodegenerative diseases, for example), and to local treatment (in the areas of cancer and regenerative medicine, among others).

Within the magnetic nanomaterials for theragnostic uses, superparamagnetic nanoparticles currently constitute one of the most promising and highly useful tools in this field, due to their physical characteristics, highlighting their versatility and biocompatibility.

In this Doctoral Thesis, nanomaterials have been developed for various in vitro and in vivo biomedical applications, delving into two main objectives:

1) Development through different types of synthesis, optimization and study of magnetic nanostructures, with different types of biocompatible coatings, such as molecules, polymers or inorganic oxides, which allowed the stable integration of compounds with theragnostic activity, such as molecules or fluorescent biopolymers, biological agents, positive or negative contrast agents for MRI imaging or radiotracers for PET imaging. In this way, multifunctional magnetic nanostructures that integrate materials with specific properties into a single structure have been obtained with potential applications in biomedicine.

And 2) the effectiveness of the designed magnetic nanostructures, tested in various biomedical applications, such as: the ability to cross "in vitro" a blood-brain barrier simulated by human brain endothelial cells; response to MRI, PET or multimodal contrast agents for in vitro or in vivo assays; the ability to preconcentrate Aβ 1-42 peptides through the use of a magnetic aggregation chamber; the ability to manipulate gene expression in HeLa cells, by means of a magnetofection of plasmid DNA and the ability to internalize cells in order to separate them magnetically.

Resumo

Recentemente, o estudo e aplicación dos nanomateriais magnéticos espertou un enorme interese na comunidade científica, especialmente no ámbito biomédico. A posibilidade de manipular procesos biolóxicos no rango da nanoescala está a abrir camiño a fitos na medicina personalizada, dando lugar a novos enfoques teragnósticos, difíciles de acadar coas terapias convencionais. Deste xeito, as limitacións clínicas resólvense a través de estratexias alternativas que poden contribuír ao diagnóstico precoz de enfermidades, que actualmente só son detectables en fases avanzadas (enfermidades neurodexenerativas, por exemplo), e ao tratamento local (nas áreas do cancro e da medicina rexenerativa, entre outras).

Dentro dos nanomateriais magnéticos para usos teragnósticos, as nanopartículas superparamagnéticas constitúen na actualidade unha das ferramentas máis prometedoras e de grande utilidade neste campo, polas súas características físicas, destacando a súa versatilidade e biocompatibilidade.

Nesta Tese Doutoral desenvolvéronse nanomateriais para diversas aplicacións biomédicas in vitro ou in vivo, afondando en dous temas principais:

1) O desenvolvemento mediante diferentes tipos de síntese, optimización e estudo de nanoestruturas magnéticas, con diferentes tipos de revestimentos biocompatibles, como

moléculas, polímeros ou óxidos inorgánicos, que permitiu a integración estable de compostos con actividade teragnóstica, como moléculas ou biopolímeros fluorescentes. axentes biolóxicos, axentes de contraste positivos ou negativos para resonancia magnética ou radiotrazadores para imaxes PET. Deste xeito, conseguíronse nanoestruturas magnéticas multifuncionais que integran materiais con propiedades específicas nunha única estrutura con potenciais aplicacións en biomedicina.

E 2) a eficacia das nanoestruturas magnéticas deseñadas, probadas en diversas aplicacións biomédicas, como: a capacidade de atravesar "in vitro" unha barreira hematoencefálica simulada por células endoteliais do cerebro humano; resposta a axentes de contraste, resonancia magnética, PET ou imaxes multimodais en ensaios in vitro ou in vivo; a capacidade de preconcentrar os péptidos Aβ 1-42 mediante o uso dunha cámara de agregación magnética; a capacidade de manipular a expresión xénica nas células HeLa, mediante unha magnetofección do ADN plasmídico e a capacidade de interiorizar as células para separalas magnéticamente.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Listado de publicaciones

El siguiente listado de publicaciones deriva de esta Tesis Doctoral:

1) **M.A. González-Gómez**, S. Belderbos, S. Yañez-Vilar, Y. Piñeiro, F. Cleeren, G. Bormans, M. Deroose, W. Gsell, U. Himmelreich & J. Rivas. Development of superparamagnetic nanoparticles coated with polyacrylic acid and aluminum hydroxide as an efficient contrast agent for multimodal imaging. Nanomaterials 2019, 9(11), 1626: p. 1-20. https://doi.org/10.3390/nano9111626.

2) S. Belderbos, **M.A. González-Gómez**, F. Cleeren, J. Wolters, Y. Piñeiro, C.M. Deroose, A. Coosemans, W. Gsell, G. Bormans, J. Rivas & U. Himmelreich, Simultaneous in vivo PET/MRI using fluorine-18 labeled Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ nanoparticles: Comparison of nanoparticle and nanoparticle-labeled stem cell distribution. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag. Res. 2020, 10(1), 73: p. 1-13. https://doi.org/10.1186/s13550-020-00655-9.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Motivación y objetivos

La principal motivación que en general se tiene para desarrollar nuevos materiales teragnósticos es conseguir diagnósticos más precisos de enfermedades y hacerlo en estadios muy tempranos. Además, se buscan nuevas formas de aplicar terapias convencionales tanto de principios farmacológicos como de nuevos tratamientos como anticuerpos, células para trasplantes autólogos, entre otros, que requieran de dosis más pequeñas y con menores efectos secundarios. Por otra parte, se pretende desarrollar soluciones cada vez menos invasivas, y que ciertos agentes terapéuticos se puedan observar a la vez mediante imagen médica para su localización precisa. Es por esto por lo que los nanomateriales han adquirido un gran interés en diversas aplicaciones biomédicas, tanto por sus propiedades como por su pequeño tamaño.

El desarrollo de materiales dopados con nanopartículas complejas ocupa puestos cada vez más relevantes en la producción industrial de bienes de consumo (alimentos, cosméticos, composites, etc.). Sin embargo, es en el ámbito de los desarrollos nanobiomédicos donde se espera un mayor impacto, ya que los procesos biológicos fundamentales ocurren en escala nanométrica y el tamaño de nanopartícula permite que puedan interferir con ellos. Se abren por tanto nuevas posibilidades para desarrollar agentes teragnósticos mucho más específicos, de acción muy local y con menores efectos secundarios, tanto para su aplicación clínica como para estudio de procesos a nivel celular en el ámbito de la biomedicina más fundamental. El desarrollo de nanoestructuras complejas con componentes que posibiliten la imagen biomédica (agentes de contraste en MRI, PET o moléculas fluorescentes), acciones terapéuticas (liberación de fármacos o anticuerpos, hipertermia magnética) precisa de un abordaje multidisciplinar. Tanto en las fases de diseño, preparación y optimización se requiere una aproximación química, física, farmacéutica, biológica y médica para integrar las diferentes propiedades que ha de presentar el material a nivel clínico.

Dentro de los nanomateriales de uso teragnósticos, las nanopartículas superparamagnéticas, destacan por encima del resto, acumulando un gran número de estudios por las ventajas que ofrecen su pequeño tamaño, respuesta magnética lineal a campos bajos sin remanencia ni campo coercitivo, esenciales para prevenir problemas de agregación. Esto las convierte en nanomateriales versátiles para una gran variedad de aplicaciones biomédicas. Así nos encontramos con nanomateriales magnéticos que pueden ser empleados como agentes de contraste para imágenes de resonancia magnética (MRI), o combinados con otros compuestos pueden actuar como agentes multimodales para MRI, tomografía computarizada (CT) o tomografía por emisión de positrones (PET), entre otros. En el ámbito terapéutico, se pueden usar las nanopartículas magnéticas para destruir tumores mediante hipertermia magnética al aprovecharse la capacidad que poseen estas nanoestructuras para producir calor en respuesta a campos magnéticos alternos.

Un ejemplo destacado del uso de las nanopartículas de óxido de hierro utilizadas actualmente en clínica son los agentes de contraste para MRI comerciales Resovist® y Feridex® (utilizadas para obtener imágenes de MRI de hígado[1]) o Sinerem® (utilizadas para obtener imágenes del torrente sanguíneo, pudiendo ser visualizado los nódulos linfáticos e incluso utilizarse para el tratamiento de la anemia por deficiencia de hierro[2]). Por otra parte, el uso de estas nanopartículas también está aprobado en el ámbito terapéutico, un ejemplo de ello es la terapia

NanoTherm®, en donde se introducen nanopartículas magnéticas directamente en un tumor para su destrucción a través de la hipertermia magnética[3].

El principal objetivo de esta Tesis fue diseñar, desarrollar y optimizar nanoestructuras superparamagnéticas con composición compleja y respuesta multifuncional, mediante técnicas de química húmeda fácilmente trasladables a la explotación comercial, para su uso en aplicaciones biomédicas. Se buscó, además, la integración de los componentes en una configuración núcleo@cubierta para incluir las diferentes funcionalidades de los sucesivos materiales (moléculas, polímeros, proteínas, plásmidos u óxidos metálicos) dentro de un agente teragnóstico pequeño y de estructura robusta. Así como su uso en diversas aplicaciones biomédicas, tales como la detección de biomarcadores como son los péptidos beta amiloide o los oligómeros Tau fosforilados, de interés para el estudio de la enfermedad de Alzheimer; la estimulación magnética para el aislamiento de una línea celular concreta o modulando el funcionamiento celular al introducir materiales genéticos mediante una magnetofección. También son de gran interés las aplicaciones de estas nanoestructuras para la detección de biomarcadores mediante la preconcentración de las nanopartículas magnéticas bioconjugadas con aptámeros con alta afinidad para unirse a estos biomarcadores mediante el uso de un equipo de microfluídica. Estas nanoestructuras permiten el realce de imágenes médicas a través de su actividad como agentes de contraste en MRI, PET o multimodales MRI/PET para ensayos in vitro o in vivo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla de contenido

Agradecimientos i
Resumen iii
Summary iii
Resumo iv
Listado de publicaciones vi
Motivación y objetivos vii
Lista de abreviaturas 1
1. Introducción 7
1.1 Efectos físicos relevantes en la nanoescala 8
1.1.1 Cambio de las propiedades magnéticas en la nanoescala 10
1.1.2 Superparamagnetismo 13
1.1.3 Reducción de la magnetización neta 15
1.2 Magnetita, propiedades y NPs 17
1.3 Biomedicina 18
1.3.1 Técnicas biomédicas 19
1.3.1.1 Diagnóstico 20
a. Diagnóstico por imagen médica 20
b. Diagnóstico por detección de biomarcadores 22
1.3.1.2 Terapia 24
a. Hipertermia magnética 24
b. Terapia génica: magnetofección 26
1.3.1.3 Procedimientos biológicos 26
a. Aislamiento celular 26
1.4 Diseño de nanomateriales 27
1.4.1 Procedimientos de síntesis 27
1.4.2 Técnicas de caracterización 30
Bibliografía 37
2. Desarrollo y caracterización de nanoestructuras magnéticas multifuncionales 47
2.1 Síntesis de núcleos magnéticos 48
2.1.1 Fe_3O_4 49
a Esferas 49
b Cubos 56

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

c Esferas huecas 62

2.1.2 Fe_5C_2 67

2.1.3 Mn_3O_4 71

2.2 Síntesis de nanoestructuras complejas 74

a Métodos de recubrimiento de sílice 75

b Método de recubrimiento de hidróxido de aluminio 75

2.3 Funcionalización con fluoróforos 81

2.3.1 Estudio de la actividad fluorescente 81

2.4 Bioconjugación 83

2.4.1 Bioconjugación de las MNPs de Fe_3O_4@SiO_2 con aptámero [Rgen3K$(KLVFF)_{16}$] usando glutamato como espaciador 84

2.4.2 Bioconjugación directa de las nanoestructuras magnéticas con anticuerpos monoclonales anti-Aβ 1-42 o anti-pTau 85

a Activación de los grupos hidroxilos o carboxílicos presentes en las MNPs (Fe_3O_4@PAA, Fe_3O_4@$Al(OH)_3$, Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2): 85

b Bioconjugación de las nanoestructuras mesoporosas de sílice fluorescentes por activación de los grupos carboxílicos del anticuerpo: 85

2.5 Conclusiones 89

Bibliografía 90

3. Aplicaciones 97

3.1 Estudios preliminares de la interacción de nanoestructuras multifuncionales en medios de interés biológico 97

3.1.1 Estabilidad coloidal de nanoestructuras magnéticas en disolventes con composición biocompatibles 97

a Determinación de la estabilidad coloidal de las nanoestructuras magnéticas de tipo core@shell en solución buffer betaina-glucosa 98

b Determinación de la estabilidad coloidal de las nanoestructuras magnéticas fluorescentes de tipo core@shell en mezclas biocompatibles complejas 99

3.1.2 Estudios de la toxicidad in vitro 101

3.1.3 Habilidad para cruzar barreras fisiológicas (in vitro BBB crossing) 107

3.1.4 Eficiencia del contraste en MRI de MNPs embebidas en phantoms 112

3.1.5 Radiomarcaje de MNPs sin quelante. Estudio de la estabilidad y eficiencia del radiomarcaje 115

a Radiomarcaje con ^{18}F 116

b Radiomarcaje con ^{89}Zr 120

3.2 MNPs para la detección de biomarcadores 124

a Biodetección magnética (cámara de agregación) 124

b MNPs para incrementar la sensibilidad de un Kit ELISA 127
3.3 Nanoestructuras para terapias celulares 130
a Terapia génica 131
b Aislamiento magnético de células para su uso terapéutico 134
3.4 Nanoestructuras para usos teragnósticos. Diagnóstico por imagen MRI/PET 136
3.5 Conclusiones 146
Bibliografía 148
4. Conclusiones generales 156
4. General conclusions 157
Anexo I: Reactivos y preparación de muestras para técnicas de caracterización 161
I Reactivos 161
II Procedimiento de caracterización de muestras 163
Anexo II: Caracterización fisicoquímica adicional 167
I Síntesis de núcleos magnéticos 167
a Nanoesferas de Fe_3O_4 167
b Nanocubos de Fe_3O_4 168
c Nanoesferas huecas de Fe_3O_4 170
d Nanoesferas de Fe_5C_2 173
e Nanoesferas de Mn_3O_4 174
II Funcionalización con fluoróforos 175
a Síntesis 175
b Caracterización fisicoquímica 178
Bibliografía 183
Anexo III: Permisos de uso de las figuras y publicaciones 187

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Lista de abreviaturas

A: Número de células al final de la incubación o constante de intercambio
AO: Número inicial de células
a_0: Parámetro de red
AA: Antimicina A
7-AAD: 7-amino-actinomicina D
Aβ: Péptido beta-amiloide (Aβ)
AC: Corriente alterna
AD: Enfermedad de Alzheimer
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AIBN: Azobisisobutironitrilo
ALA: Ácido aminoláurico
ANOVA: Análisis de varianza
anti-Aβ 1-42: Anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas beta-amiloide 1-42
anti-acTau: Anticuerpos monoclonales dirigidos contra los oligómeros Tau acetilado
anti-pTau: Anticuerpos monoclonales dirigidos contra los oligómeros Tau fosforilado
APTS: (3-Aminopropil)trietoxisilano
as: Asimétrico
ATR: Reflectancia total atenuada
B_0: Campo magnético
BBB: Barrera hematoencefálica
BCA: Ácido bicinchonínico
B_{inhom}: Inhomogeneidades del campo magnético
BOLD: Dependencia del nivel de desoxigenación de la sangre
BSA: Albúmina de suero bovino
c: Capacidad calorífica
CCCP: Carbonilcianuro-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona
CHX: Ciclohexano
COVID-19: Enfermedad por coronavirus
CPM: Cuentas por minuto
CT: Tomografía computarizada
CTEM: Microscopía electrónica de transmisión de campo claro
CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio
CS: Quitosano
d_{hkl}: Interdistancia entre planos cristalográficos (hkl)
D: Diámetro o dimensión lineal
D_c: Tamaño crítico
D_h: Diámetro hidrodinámico
D_t: Tamaño umbral
D_{TEM}: Diámetro obtenido por imagen TEM
D(7-AAD): 7-amino-actinomicina
DAPI: Marcador nuclear celular
DC: Corriente continua
DCE-MRI: MRI mejorado por contraste dinámico

DDA: Dodecilamina
DFO: Deferoxamina
DFTEM: Microscopía electrónica de transmisión de campo oscuro
DLS: Dispersión de luz dinámica
DMEM: Medio de cultivo celular
DVB: Divinilbenceno
e^-: Electrón/ electrones
$\boldsymbol{E_{an}}$: Energía de anisotropía uniaxial
$\boldsymbol{E_{Dm}}$: Energía desmagnetizante
EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDX: Espectroscopia de dispersión de energía de rayos X
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EELS: Espectroscopía por pérdida de energía de electrones
EG: Etilenglicol
EGM-2: Medio de cultivo celular de crecimiento endotelial
ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
ESCA: Espectroscopia electrónica para análisis químico
$\boldsymbol{E_T}$**:** Energía térmica
F: Frecuencia
FAAS: Espectroscopía de absorción atómica con llama
FBS: Suero fetal bovino
FC: Curva de enfriamiento con campo magnético aplicado
α-Fe_2O_3: Hematita
γ-Fe_2O_3: Maghemita
Fe_3O_4: Magnetita
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
FRET: Transferencia de energía de resonancia de Förster
FTIR: Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
$\boldsymbol{h}$: Constante de Planck
H: Campo magnético
H_{ext}: Campo magnético externo
HAADF: Campo oscuro anular a ángulo grande
H_C: Campo magnético coercitivo
hcMEC/D3: Células endoteliales de cerebro humano
HeLa: Células epiteliales de cuello uterino
H_2O: Agua
HEPES: Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacinil-(1)] etanosulfónico
HR-HAADF: Campo oscuro anular a ángulo grande en alta resolución
HRP: Enzima de peroxidasa de rábano picante
HRTEM: Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución
I: Intensidad de los rayos X transmitidos
I_0: Intensidad de los rayos X incidentes
IR: Infrarrojo
ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
ICP-OES: Espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente
I+D: Investigación y desarrollo
IGF: Factor de crecimiento recombinante humano insulinico-1
IgG: Inmunoglobulina G

IPA: Alcohol isopropílico
J_{12}: Constante de intercambio
K_1: Constante de anisotropía magnetocristalina
K: Constante de anisotropía
K_B: Constante de Boltzmann
K_{eff}: Constante de anisotropía efectiva
LFIT: Inmunoensayo de flujo lateral
LSPR: Resonancia de plasmón de superficie localizada
mat.magn: Masa del material magnético
m_e: Masa del electrón
M: Magnetización
M_R: Magnetización remanente
M_S: Magnetización de saturación
M_{SD}: Magnetización de nanopartículas monodominio
M_{XY}: Magnetización transversal
M_Z: Magnetización longitudinal
MA: Ácido metacrílico
MCM41: Cerámica mesoporosa
mEHT: Electro-hipertermia modulada
mMSC: Células madre mesenquimales de ratón
Mn_3O_4: Hausmanita
MNPs: Nanopartículas magnéticas
MRI: Imagen por resonancia magnética
N: Número de átomos
N_A: Constante de Avogadro
NaOAc: Acetato sódico
NIR: Infrarrojo cercano
NMR: Resonancia magnética nuclear
ns: No significante
NSF: Fibrosis sistémica nefrogénica
NSOM: Microscopía óptica de barrido de campo cercano
NPs: Nanopartículas
OA: Ácido oleico
ODE: Octadeceno
OLA: Oleilamina
OMS: Organización mundial de la salud
OX26: Anticuerpo monoclonal para receptores de la transferrina
PAA: Ácido policrílico
PBS: Tampón fosfafo salino
PDA: Polidopamina
PDI: Índice de polidispersidad
PEI: Polietilenimina
PET: Tomografía por emisión de electrones
PLGA: Ácido poli-láctico-co-glicólico
POC: Punto de atención
ppm: Partes por millón
pTau: Oligómero Tau fosforilado
PS: Poliestireno

PVP: Polivinilpirrolidona
r_1: Coeficiente de relajación longitudinal
r_2: Coeficiente de relajación transversal
RES: Sistema reticuloendotelial
RF: Radiofrecuencia
rhEGF: Factor de crecimiento epidermal recombinante
rhFGF: Factor de crecimiento fibroblastico recombinante humano
RITC: Isotiocianato de rodamina
ROS: Especies reactivas de oxígeno
S_1;S_2: Momentos magnéticos de espín de los electrones
SA: Estearato
SAR: Tasa de absorción específica
SI: Sistema internacional de unidades
SEM: Microscopía electrónica de barrido
STEM: Microscopía electrónica de transmisión por barrido
SPECT: Tomografía computarizada de emisión de fotones
SNC: Sistema nervioso central
SPM: Superparamagnético
SPR: Resonancia del plasmón de superficie
SQUID: Dispositivo superconductor de interferencia cuántica
Styr: Estireno
SUV: Valor estandarizado de captación
t: Tiempo
T: Temperatura
τ_0: Tiempo promedio de oscilación del electrón
T_1: Tiempo de relajación longitudinal
T_2: Tiempo de relajación transversal
T_B: Temperatura de bloqueo
T_C: Temperatura de Curie
T_d: Tiempo de duplicación celular
T_{room}: Temperatura ambiente
τ_N: Tiempo de relajación de Néel
TEM: Microscopía electrónica de transmisión
TEOS: Tetraetoxisilano
TGA: Análisis termogravimétrico
THF: Tetrahidrofurano
THPC: Cloruro de tetrahidroximetil fosfonio
TLC: Cromatografía de capa fina
τ_M: Tiempo de las mediciones experimentales
TMAO: N-óxido de trimetilamina
TMB: 3,3′,5,5′- Tetrametilbencidina
TOA: Trioctilamina
TryplE: Enzima de disociación celular
US: Ultrasonidos
UV-Vis: Ultravioleta-visible
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular recombinante humano
VSM: Magnetometría de muestra vibrante
WDS: Espectroscopía por dispersión de longitud de onda

χ: Propiedades intensivas de la materia
χ_{in}: Susceptibilidad magnética inicial
XPS: Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X
XRD: Difracción de rayos X
ZFC: Curva de enfriamiento sin campo magnético
ΔΨm: Potencial de membrana mitocondria
$\boldsymbol{\lambda_{dB}}$: Longitud de onda de Broglie de un electrón libre
$\boldsymbol{\lambda_F}$: Longitud de onda de Fermi
$\boldsymbol{\lambda_m}$: Camino libre medio

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. Introducción

En el discurso titulado "There's Plenty of Room at the Bottom" del físico y premio Nobel Richard Feynman, en el año 1959[4] se menciona por primera vez un campo científico sin explorar, la nanociencia. En él, Feynman postuló la capacidad de manipular y controlar la materia a niveles atómicos y moleculares, utilizando un conjunto de herramientas capaces de construir, visualizar y operar en la escala nanométrica.

Sin embargo, no fue hasta el año 1974 que nació el término "Nanotecnología", acuñado por primera vez por el científico japonés, Norio Taniguchi, donde el rango nanométrico quedaba definido como aquel en el que al menos una de las dimensiones, estuviese entre 3 y 100 nanómetros.

A partir de ese momento, el gran salto existente entre los marcos teóricos que explicaban las propiedades de la macroescala y los fenómenos cuánticos observados a nivel atómico, se empieza a completar con una nueva disciplina donde las propiedades de los sistemas escalan con el tamaño[5].

Los sistemas con comportamiento cuántico, (con tamaños $D< 2$ nm) tales como átomos, moléculas o clústeres atómicos, poseen propiedades que varían de manera no monótona con el número de átomos que los constituyen, fruto de la naturaleza discreta de sus niveles de energía que dan lugar a que las propiedades tengan valores discretos.

En el otro extremo, las propiedades de los materiales macroscópicos (con tamaños $D> 1$ µm), se pueden describir promediando los grados de libertad que posee el sistema a nivel microscópico. Dadas sus dimensiones, mucho mayor que la escala de cualquier mecanismo microscópico, y el elevado número de átomos que componen los materiales masivos, ($N>N_A$), sus propiedades intensivas, χ, son independientes del tamaño del sistema. En los sólidos masivos, además, la proporción de átomos en el interior domina, y hace que las propiedades fisicoquímicas de la superficie apenas contribuyan[6].

Sin embargo, cuando se reducen las dimensiones de un material hasta llegar a la escala nanométrica, las fluctuaciones que experimentan las propiedades físicas al variar el número de átomos del sistema son tan relevantes como el valor promedio de las mismas[7] y las propiedades dependen del tamaño del sistema. Además, la proporción de átomos en la superficie es comparable o mayor que los átomos internos, y las propiedades de superficie, en NPs de tamaño muy reducido, pueden llegar a dominar el comportamiento del sistema[8].

Destacan como propiedades que sólo se encuentran en el rango nanométrico, la resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR), que poseen las pequeñas partículas metálicas, y el comportamiento superparamagnético de NP magnéticas con un tamaño por debajo de un valor crítico.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Además de la oportunidad que a nivel fundamental ofrece la nanotecnología, pues permite completar el conocimiento de la materia en todas sus escalas, tecnológicamente los nanomateriales son de gran interés ya que mediante el control de su tamaño se pueden diseñar

sistemas con respuestas a medida muy útiles para aplicaciones en ámbitos muy dispares, desde la electrónica o la energía, hasta el medioambiente, o la medicina[9], entre otros.

En los últimos años el campo biomédico, se ha beneficiado de diferentes contribuciones de desarrollos nanotecnológicos tanto a nivel terapéutico como diagnóstico. De toda la gran variedad de nanomateriales existentes, tanto poliméricos (micelas, liposomas para liberación de fármacos, etc.), como inorgánicos (matrices de sílice mesoporosa para ingeniería de tejidos, partículas plasmónicas, quantum dots, entre otras) son las nanopartículas magnéticas las que acumulan un mayor número de desarrollos[10].

Destaca el uso teragnóstico de nanopartículas de magnetita de pequeño tamaño (D= 10 nm) para el tratamiento clínico de cáncer mediante una técnica de hipertermia magnética[3] y su aprobación como agentes de contraste para MRI[2] o como suplemento de hierro. Además, las NPs magnéticas tienen un papel fundamental en aplicaciones in vitro, pues mediante la conjugación con agentes biológicos, se pueden utilizar para identificar selectivamente y extraer magnéticamente biomarcadores en fluidos complejos. Así, por ejemplo, la magnetofección de células con genes o material biológico, aumenta, de forma considerable, la eficacia y rapidez en los procesos de producción biotecnológico en terapias celulares.

1.1 Efectos físicos relevantes en la nanoescala

La reducción de tamaño en los nanomateriales tiene dos efectos fundamentales que modulan la respuesta del sistema, por un lado, el peso de la contribución de los átomos/iones de la superficie y por otro la cercanía de las dimensiones del sistema con algunas escalas relevantes de fenómenos atómicos.

Los átomos/iones que se encuentran localizados sobre superficies o interfaces (figura 1.1) experimentan una interacción asimétrica debido al diferente entorno fisicoquímico a ambos lados. Como resultado de esto, a escalas atómicas, las propiedades físicas en las interfaces no varían de una manera abrupta, sino que lo hacen de un modo continuo, siguiendo un perfil ondulatorio, resultado de varias oscilaciones superpuestas, a lo largo de la dirección perpendicular a la superficie un hecho bien conocido en las ciencias de la superficie[7].

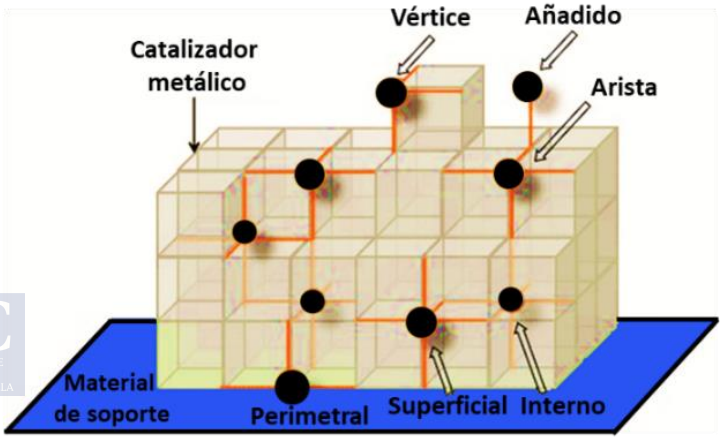


Figura 1.1: Representación esquemática de la coordinación atómica en una estructura de celosía cúbica cristalina.

La energía se puede reducir mediante una serie de mecanismos tales como:

• la contracción de las distancias interatómicas de los átomos de la superficie, lo que, por lo tanto, cambia la estructura de la superficie respecto al interior (por ejemplo, la red Au masivo es cúbico mientras que el Au de la superficie está empaquetado hexagonalmente);

• desplazar las cargas, mediante la inducción de un perfil de carga oscilante entre capas subsiguientes, (por ejemplo, los pares iónicos como en el NaCl, donde los iones Na^+ se desplazan hacia el interior y los iones Cl^- se desplazan hacia el exterior de la superficie;

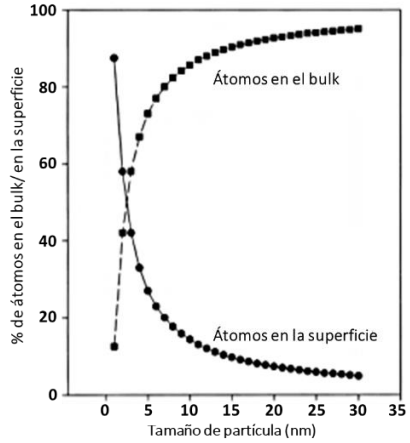
• mecanismos de segregación superficial, como en materiales compuestos por más de un tipo de átomo, donde una de las especies se difunde desde el núcleo y se acumula en la superficie, (por ejemplo, tal como sucede en las aleaciones de Au-Ag donde el componente con el punto de fusión más bajo, la plata Ag, se difunde hacia la superficie y disminuye la energía superficial total);

• o adsorción de moléculas en la superficie que disminuyen la energía.

Además, en la superficie de una partícula, los átomos/iones exteriores, además de estar sometidos a interacciones asimétricas, presentan números de coordinación menores que en el interior (figura 1.1). Las esquinas y ejes de la superficie exterior, que vienen determinadas por la morfología de la nanopartícula, modulan el número de coordinación y tienen una relevancia mayor en NPs de muy pequeño tamaño. Todos estos mecanismos tienen una relevancia crucial para determinar las propiedades de las NPs pequeñas, como la reactividad o las propiedades catalíticas[11].

Dado que las propiedades de las partículas son el resultado de un equilibrio complejo entre mecanismos de equilibrado de la superficie y su estructura interna, la proporción de átomos en superficie respecto al interior, es un parámetro muy relevante para determinar la contribución de los efectos superficiales. (figura 1.2).

De hecho, para partículas esféricas de un tamaño alrededor de 3 nm, el 50 % de los átomos o iones se encuentran sobre su superficie, lo que produce cambios significativos en las propiedades de los nanomateriales, tales como la conductividad electrónica, la absorción óptica o la reactividad química[12].



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 1.2: Variación del % de átomos interiores/átomos en superficie con tamaño de la nanopartícula. Imagen adaptada de la ref. 12. Copyright (2021) con permiso de Elsevier.

Además, en el rango de tamaños más bajos, cuando las dimensiones físicas de los nanomateriales se aproximan al rango de longitudes características muy fundamentales, las fluctuaciones de las propiedades al variar el tamaño, pueden ser del mismo orden que el promedio de las mismas[7]. En este límite de tamaños pequeños, las propiedades de las NPs heredan contribuciones relevantes de las propiedades superficiales y fenómenos que comparten la escala de longitudes cuánticas relevantes[11] tales como:

•Longitud de onda de Broglie de un electrón libre, $\lambda_{dB} = h/\sqrt{2\, m_e\, E}$ donde h es la constante de Planck, que para un electrón de masa (m_e= 9.1 10^{-31} Kg) y energía E =10 eV, es $\lambda_{dB} = 0.38\, nm$;

•Longitud de onda de Fermi de los electrones de valencia de un conductor, λ_F,que para un metal típico tiene un valor menor que $\lambda_F \approx 1$ (nm);

•Camino libre medio, λ_m, de los electrones de conducción entre colisiones con fonones, impurezas u otros electrones, para el Cu se estima λ_m, =2.85 nm.

1.1.1 Cambio de las propiedades magnéticas en la nanoescala

Las propiedades magnéticas de los sólidos están ligadas a las estructuras atómicas y a su entorno. No solo los electrones tienen un momento magnético. El núcleo a menudo tiene un espín distinto de cero, sin embargo, este momento magnético es muy pequeño ya que su tamaño escala con la inversa de la masa de las partículas: los momentos nucleares son típicamente mil veces más pequeños que los momentos electrónicos. Por éstas, y otras razones, tales como la ausencia de cualquier interacción fuerte entre núcleos en átomos adyacentes a temperaturas ordinarias de laboratorio y que las interacciones dipolares de origen nuclear son seis ordenes de magnitud más pequeñas que el caso electrónico, originan que, si hay momentos electrónicos en los sólidos, sus efectos eclipsarán por completo cualquier efecto nuclear y las propiedades magnéticas estarán básicamente gobernadas por los electrones.

La teoría microscópica del magnetismo de los electrones se basa en la mecánica cuántica de los momentos orbitales y de espín, y su interacción espín-orbita. Las propiedades magnéticas de los sólidos dependen de su estructura electrónica, así como de su composición química, tamaño y morfología. Si se establece una fuerte interacción entre los momentos magnéticos electrónicos aparecen estructuras con ordenamiento ferromagnético y ferrimagnético, que presentan magnetización espontánea en ausencia de un campo magnético aplicado por debajo de un punto crítico llamado temperatura de Curie, Tc. Los materiales antiferromagnéticos son estructuras con ordenamiento magnético que no exhiben magnetización espontánea, mientras que los materiales ferrimagnéticos sí lo hacen. Si no hay interacciones entre los momentos electrónicos aparecen los llamados materiales paramagnéticos y diamagnéticos con una magnetización neta igual a cero en ausencia de campo magnético aplicado (figura 1.3).

Al aplicarles a los materiales paramagnéticos un campo magnético externo, los momentos magnéticos electrónicos se alinean de manera proporcional y paralelamente al campo (susceptibilidad magnética baja y positiva)[13]. Este tipo de magnetismo se presenta en materiales como el aluminio, sodio o manganeso[14].

Los materiales diamagnéticos, tienen susceptibilidad magnética baja y negativa, y aunque este tipo de magnetismo está presente en todos los materiales, es tan débil que solo se puede observar en ausencia de otras contribuciones magnéticas, como ocurre en el helio o bismuto[14,15].

En el caso de los materiales ferromagnéticos, los momentos magnéticos de los átomos del material permanecen alineados paralelamente debido a la interacción de intercambio. Este acoplamiento de los momentos atómicos permite que el material posea un valor de la magnetización elevada (susceptibilidad muy alta y positiva), como sucede por ejemplo en materiales como el hierro, cobalto o níquel[16]. En el caso de materiales ferrimagnéticos, dentro del material coexisten subredes magnéticas ordenadas de manera antiparalela, que presentan magnetización espontánea menor que los materiales ferromagnéticos, siendo las ferritas un ejemplo muy conocido de ferromagnetismo[17]. Los materiales antiferromagnéticos, de forma similar a los ferrimagnéticos, resultan del acoplamiento antiparalelo de subredes magnéticas, aunque de igual momento magnético, provocando una cancelación de la magnetización espontánea[18]. Aleaciones como las compuestas por hierro-manganeso u óxidos de níquel presentan este tipo de comportamiento magnético.

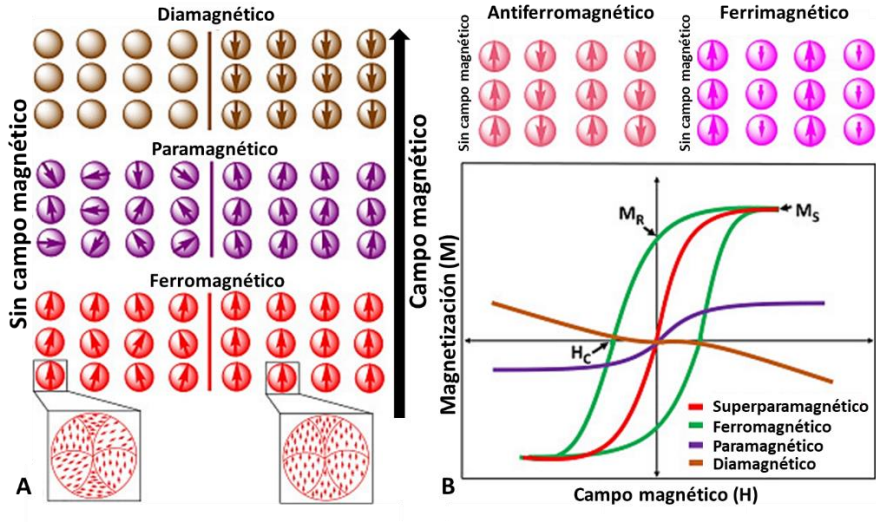


Figura 1.3: Distinta respuesta magnética de los materiales al aplicar un campo magnético externo (A) y sus respectivas curvas de histéresis (B). Imagen adaptada de la ref. 19. Copyright (2021) con permiso de Elsevier.

Mediante el acoplamiento espín-órbita, los momentos magnéticos individuales resultantes siguen el orden estructural impuesto por el campo cristalino. Sobre esta estructura primaria, los momentos magnéticos individuales establecen una estructura magnética ordenada en función de la combinación de las interacciones (interacción de intercambio y la anisotropía cristalina) y de interacciones macroscópicas (campo desmagnetizante, interacción de Zeeman e interacción dipolar)[14,20]:

•Energía de Zeeman: explica la energía de un material magnético con magnetización M, expuesto a un campo magnético externo, H_{ext}. Está dado por la relación (en el SI):

$$E_Z = -\mu_0 \int \vec{M} \cdot \vec{H}ext \, dV$$

•Energía de intercambio: es un efecto mecánico-cuántico que combina las reglas de simetría que surgen de la indistinguibilidad de los electrones, interacciones espín-espín efectivas y la

superposición orbital, y para dos electrones que interactúan. Se encuentra en el modelo de Heisenberg la energía de intercambio:

$$E_{exc} = -J_{12}\,\vec{S}1 \cdot \vec{S}2$$

donde J_{12} es la constante de intercambio y S_1; S_2 son los momentos magnéticos de espín de los electrones. La fuerza y el carácter del orden magnético (con orientación paralela o antiparalela) dependerá de J_{12}, que contiene información detallada sobre la orbitales. Un valor de$J$< 0 favorece el orden ferromagnético paralelo mientras que J>0 conduce al ordenamiento antiparalelo de materiales antiferromagnéticos.

•Anisotropía magnética: está inducida por tres causas principales que inducen la orientación de la magnetización en ciertas direcciones preferentes del espacio: anisotropía magnetocristalina, anisotropía de forma y anisotropía superficial.

a) Anisotropía magnetocristalina: la energía de anisotropía surge de la interacción espín-órbita y del "bloque" parcial del momento angula. Las energías de anisotropía suelen estar en el rango de 10^2-10^7 Jm^{-3}. La energía de anisotropía es mayor en las redes (de iones magnéticos) de baja simetría y menor en las redes de alta simetría. Las direcciones preferentes de la red cristalina se imponen a la orientación de los espines entorno a un eje energéticamente favorable (eje fácil). Este tipo de anisotropía se denomina magnetocristalina, y en función de su intensidad, los materiales magnéticos presentan curvas de magnetización con histéresis. Los materiales ferromagnéticos se clasifican generalmente en duros y blandos, atendiendo al valor de su anisotropía, que determina el área de sus ciclos de histéresis. Los materiales magnéticos blandos son aquellos materiales que tienen un área más pequeña encerrada por su ciclo de histéresis. Los materiales magnéticos duros son aquellos materiales que tienen un área más grande encerrada por su ciclo de histéresis.

b) Anisotropía de superficie, debida a que en la superficie solo existen interacciones magnéticas provenientes del interior de la red, por lo que los espines superficiales, ante la falta de simetría de la interacción pierden la alineación magnética del interior, por lo que la anisotropía en la superficie es diferente de la del interior del cristal.

c) Anisotropía de forma, debida al campo desmagnetizante. La magnetización produce polos superficiales y la magnitud del campo de desmagnetización disminuye a medida que aumenta la distancia entre los polos. Por lo tanto, esto tiene consecuencias para la anisotropía de la forma de la muestra, se favorece la anisotropía que siga los ejes más largos del sistema.

Por lo general, en partículas ferromagnéticas de dominio único. La energía de anisotropía uniaxial toma la forma más simple posible:

$$E_{an} = K_{eff} V sin^2(\theta)$$

donde K_{eff} es una constante de anisotropía efectiva que incluye los efectos de las tres categorías y debido a la dependencia angular la magnetización tiene dos mínimos correspondientes a θ= 0; separados por una barrera de energía $\Delta E_{an} = K_{eff} V$.

•Energía desmagnetizante: es una energía magnetostática o energía dipolar asociada a los campos dipolares en los bordes de un material magnetizado. Como se ve en la Figura 1.4 (imagen de la izquierda).

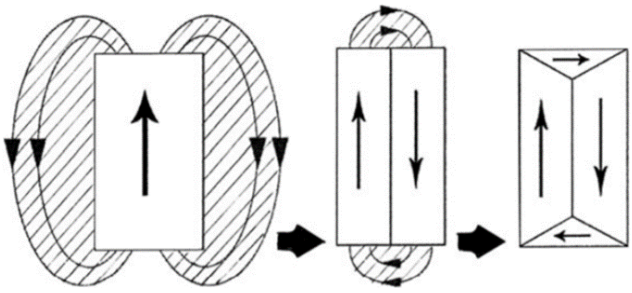


Figura 1.4: Representación esquemática de la energía magnetostática. El sombreado alrededor de los dominios magnéticos muestra el campo emergiendo de un solo dominio magnético (imagen de la izquierda), que se reduce a medida que la muestra se divide en dominios magnéticos (imagen del centro). La energía magnetostática es cero a la derecha ya que no hay campo desmagnetizante. Imagen reproducida de la ref. 21. Copyright (2022) con permiso de Springer.

El campo emergiendo de un solo dominio magnético se extiende al espacio y el coste de energía que requiere mantener ese campo, se denomina energía desmagnetizante[21].

•Dominios magnéticos: para alcanzar la estabilidad magnética el material magnetizado ha de minimizar la energía libre magnética total, $E_{free} = E_Z + E_{exc} + E_{an} + E_{Dm}$. Para alcanzar este estado, los materiales ferromagnéticos producen diferentes dominios magnéticos separados por paredes de dominio, que son regiones de transición, donde la magnetización M cambia suavemente para minimizar la interacción de intercambio de energía, pues un cambio abrupto de dirección provocaría energías de intercambio grandes (J_{12} es máxima para dos iones con espines antiparalelos). De esta manera y aunque dentro de las paredes de dominio la interacción de intercambio crece, pues los espines no son paralelos y se produce una densidad de energía superficial, las energías de desmagnetización y anisotropía en dominios pequeños, se reducen más fuertemente por lo que de manera neta se minimiza la energía magnética total.

•

Por lo general, la dirección de la magnetización de estos dominios es aleatoria, y por consiguiente que la magnetización total correspondiente a la contribución de todos los dominios que se cancelan entre sí, es muy baja o casi nula. Sin embargo, cuando se aplica un campo magnético, los dominios magnéticos tienden a alinear sus orientaciones siguiendo la dirección del campo, (minimizando la energía de Zeeman), lo que tiene como consecuencia el establecimiento de una magnetización neta no nula que depende de la intensidad del campo aplicado y la temperatura, dando sus propiedades magnéticas al material.

Los dominios mantendrán su orientación hasta que la temperatura del material sea lo suficientemente alta como para que la energía térmica (induce desorden) sea superior a la energía magnética (produce orden) sea capaz de romper el orden logrado y devolverlos a un estado aleatorio, produciendo una transición de un estado ferromagnético a uno paramagnético. Esta temperatura se denomina temperatura de Curie (para la magnetita masiva es del orden de T_C= 850 ºC).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.1.2 Superparamagnetismo

Al reducir el tamaño de una nanopartícula, todos los términos de energía magnéticos se van reduciendo, hasta que se alcanza un tamaño crítico por debajo del cual, la ventaja energética de reducir el campo de desmagnetización es menor que el coste energético que supone mantener las paredes de dominio[22]. Por ello, por debajo de un radio crítico es energéticamente más

favorable la existencia de un único dominio magnético (figura 1.5). Dependiendo de la composición y la calidad cristalina de las NPs, el tamaño crítico se encuentra dentro del rango nanométrico, D_c = [10; 100] nm. (Nps de cobalto y magnetita RC (Co) = 34 nm y RC (Fe_3O_4) = 49 nm)[23].

Precisamente, es en partículas con diámetros menores que su tamaño crítico donde se observa un comportamiento magnético propio de la nanoescala: el superparamagnetismo, observable solo en nanopartículas magnéticas de dominio único y sugerido por primera vez por Neel en 1949[24]. El término superparamagnético aglomera los dos hechos que definen esta propiedad:

•Las nanopartículas monodominio poseen un gran momento magnético total, del orden de $M_{SD} \approx 1000\ \mu_B$, pues todos los iones del cristal están ordenados siguiendo la orientación que marca la red magnetocristalina.

•Su respuesta magnética se asemeja a la de un material paramagnético pues por encima de una temperatura característica T_B, denominada temperatura de bloqueo carece de campo coercitivo o magnetización remanente.

La energía magnética de una nanopartícula magnética con un dominio único y volumen V, en ausencia de un campo magnético externo aplicado, se reduce a la contribución de la energía de anisotropía mostrada en la ecuación $E_{an} = K_{eff} V sin^2(\theta)$. Por lo tanto, para cambiar la dirección de la magnetización o para relajar la magnetización de un estado excitado a otro de equilibrio, hay que suministrar una energía que supere la barrera de energía de anisotropía, $\Delta E_{an} = K_{eff} V$, que disminuye fuertemente con el tamaño de partícula.

Para partículas muy pequeñas, la barrera de energía, E_{an}, se vuelve comparable al orden de magnitud de la energía térmica $E_T = K_B T$, y la magnetización comienza a fluctuar térmicamente al azar.

El tamaño crítico por debajo del cual la energía térmica rebasa a la energía de anisotropía estima mediante la ecuación:

$R_C = 36\sqrt{AK}/\mu_0 M_s^2$, donde A, representa a la constante de intercambio, K, la constante de anisotropía y Ms, magnetización de saturación[25,26].

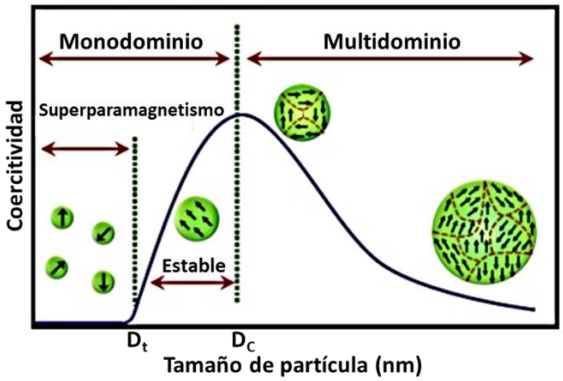


Figura 1.5: Representación de la estructura magnética según el tamaño de NP. Imagen adaptada de la ref. 27. Copyright (2021) con permiso de Elsevier.

Este es el llamado régimen superparamagnético, donde la energía térmica que induce fluctuaciones aleatorias, es más intensa que la anisotropía magnética, incapaz ya de mantener el orden magnético de los espines dentro del dominio. Néel propuso, para partículas aisladas, un modelo la relajación magnética entre dos estados estables de magnetización que se activa cuando la energía térmica rebasa la barrera de energía anisotropía magnetocristalina que separa ambos estados[24]. El tiempo de relajación de Néel τ_N se estima mediante:

$$\tau_N = \tau_0 e^{\left(\frac{K_{eff}V}{K_B T}\right)}$$

Donde τ_0 es el tiempo promedio de oscilación del electrón (t= 10^{-9} s). Sin embargo, además de la relación entre energía térmica ($E_T = K_B T$) y la energía de anisotropía ($E_{an} = K_{eff}V$), la observación del superparamagnetismo depende también el tiempo de las mediciones experimentales, τ_M. Si la medición es más lenta que la relajación de Néel, $\tau_M > \tau_N$, la magnetización puede relajarse varias veces antes de haber completado la medida experimental y durante el registro de la magnetización se suceden valores de M con orientación aleatoria y en promedio, el resultado de la medida experimental es una magnetización nula <M> = 0. Por el contrario, si la medición es muy rápida y M no tiene tiempo para relajarse $\tau_M < \tau_N$, durante el registro de la medida se observará una magnetización no nula, <M> ≠ 0 y se dice que la nanopartícula se encuentra en un estado bloqueado mostrando remanencia y coercitividad no nulas, como si estuviera en un estado ferromagnético[23,24].

Se ha determinado que para nanopartículas de magnetita con un diámetro entre D = 9-10 nm, para medidas o excitaciones magnéticas muy rápidas con frecuencias por encima de $f_M = 1/\tau_M$> 300-400 kHz, la relajación de la NP no puede seguir a la excitación de la medida y, ésta se encuentra en estado bloqueado[28].

Otro parámetro de interés práctico es la temperatura de bloqueo, T_B, definida como la temperatura a la que el tiempo de relajación experimental es igual al tiempo de relajación superparamagnético, $\tau_M = \tau_N$. La temperatura de bloqueo no se define de manera única, ya que depende de la técnica experimental utilizada:

$$T_B = \frac{-\Delta E}{K_B \ln\left(\frac{\tau_0}{\tau_M}\right)}$$

Estas predicciones ideales no se cumplen exactamente para NPs reales, pues el modelo está desarrollado para partículas no interactuantes, mientras que en medidas reales se precisa de muestras con muchas partículas donde existen interacciones dipolares, los tamaños son polidispersos, y la calidad cristalina no es perfecta, por lo que experimentalmente se pueden ver pequeñas curvas de histéresis[28].

1.1.3 Reducción de la magnetización neta

Además del comportamiento superparamagnético originado por la reducción del tamaño, la contribución relevante de los efectos de la superficie provoca la aparición de otra característica propia de las NPs magnética: la reducción de la magnetización neta con respecto al valor que posee el material masivo[29,30].

En este fenómeno participan dos efectos diferentes: el desorden de los iones superficiales y la tendencia a la oxidación.

a) Desorden de los espines superficiales. Mientras que los iones localizados en el interior de la partícula están sometidos a la simetría de las interacciones, pues están rodeados por el resto de iones de la red y sometidos por igual a las interacciones magnetocristalinas, aquellos que se encuentran en la superficie exterior están expuestos a la rotura de la simetría de las interacciones, ya que por la cara externa no experimentan las interacciones magnéticas de la red.

Por ello el orden magnético de los iones superficiales no sigue el orden magnetocristalino de los iones interiores, y se orientan de manera más desordenada. Además, mediante la interacción de intercambio, el desorden se transmite de manera parcial a los iones más cercanos, que se acomodan parcialmente al desorden de la magnetización superficial para minimizar la energía de la interacción. Esta región con orden reducido se denomina capa magnéticamente muerta, ya que su magnetización es débil, y produce en la partícula una reducción de la magnetización total. Este efecto es el responsable de que la magnetización de las nanopartículas sea menor que la observada en los materiales masivos. De hecho, para partículas magnéticas por debajo de los 4 nm, la reducción de la magnetización es muy drástica (M_S<50 % M_S-bulk)[29].

b) Además, en ciertos materiales, la tendencia a la oxidación de algunos materiales provoca que la capa externa se oxide, lo que ocasiona la distorsión de la red cristalina, la alteración de las interacciones magnéticas y la consiguiente reducción de la magnetización neta[30].

De manera general, otro factor importante que incide en la calidad magnética de las NPs es su calidad cristalina pues, para tener una magnetización cercana a la ideal, el cristal ha de carecer de distorsiones e impurezas que alteren el patrón e intensidad de las interacciones responsables de crear el orden magnético. Tener rutas sintéticas capaces de reproducir en cristales nanométricos los parámetros cristalinos del material masivo, es uno de los desafíos en los que la nanotecnología ha madurado en los últimos años y que ha permitido el desarrollo de NPs magnéticas con gran variedad de composiciones, morfologías y tamaños manteniendo una buena calidad cristalina y magnética[31-33].

En resumen, el comportamiento superparamagnético se caracteriza por poseer un momento magnético neto nulo en ausencia de un campo aplicado, remanencia y campo coercitivo despreciables y una respuesta rápida a campos aplicados externos[33]. Como resultado de esto, en ausencia de un campo magnético aplicado, las partículas SPM no interactúan magnéticamente ni forman agregados, lo que en aplicaciones biomédicas es esencial para prevenir la formación de trombos.

Además, la capacidad de las NPs SPM de ser activadas o desactivadas externamente mediante estimulación magnética, les permite su uso controlado bajo demanda en aplicaciones teragnósticas, como agentes de contraste en MRI, o en terapia tumoral, mediante hipertermia magnética, entre otras[34].

1.2 Magnetita, propiedades y NPs

De los diferentes materiales magnéticos para los que existen rutas químicas que permiten su producción en el rango nanométrica, la magnetita es el material que aparece descrito de manera preferente en la mayor parte de las publicaciones científicas dedicas al desarrollo de nanomateriales para aplicaciones biomédicas. Entre otras ventajas se puede citar su versatilidad, biocompatibilidad, su producción por métodos químicos sencillos y escalables, magnetización intensa (M_S aprox 70 emu/g), entre otros[34-36].

La magnetita (Fe_3O_4) es una ferrita que posee una estructura cristalina cúbica tipo espinela inversa donde se ubican los iones de Fe^{3+} y Fe^{2+} ajustándose a la formula (AB_2O_4= $[B[AB]O_4$, $Fe^{3+}[Fe^{2+}Fe^{3+}]O_4$)[37,38]. En dicha estructura, los aniones O^{2-} se encuentran formando una estructura cristalina cúbica compacta centrada en las caras (fcc, grupo Fd3m)[39] (figura 1.6), donde la mitad de los cationes Fe^{3+} (d^5) ocupan los intersticios tetraédricos y la otra mitad junto con los cationes Fe^{2+} (d^6) ocupan los intersticios octaédricos. El valor del parámetro de red de 0.8396 nm, determina el tamaño de la celda unitaria, la cual está formada por 8 celdillas, es decir que poseen 32 O^{2-}.

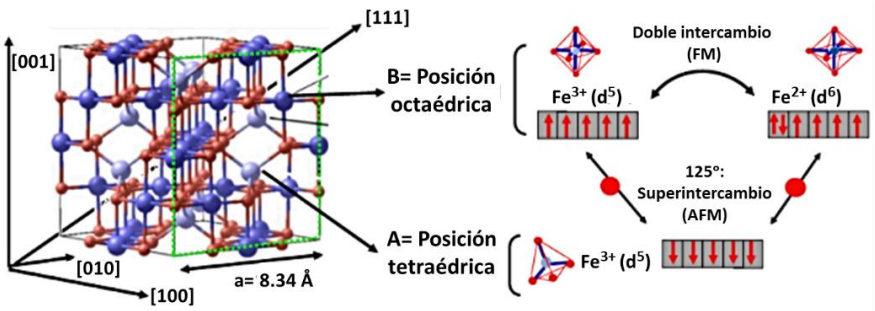


Figura 1.6: Estructura cristalina tipo espinela de la magnetita. Imagen adaptada de la ref. 38. Copyright (2021) con permiso de MDPI.

Dada la gran estabilidad de la estructura de espinela, los iones de Fe en las subredes A y B se pueden sustituir por una gran variedad de iones metálicos con valencias que van desde +1 a +6. Por ello, se puede encontrar magnetita de origen natural con impurezas de Ti, Al, Mg y Mn, y de manera artificial se pueden preparar ferritas sustituidas con metales de transición (Co, Mn, Zn) mediante procedimientos de química húmeda[40].

A temperaturas superiores a 118 K, los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} se distribuyen aleatoriamente sobre los sitios octaédricos, lo que permite el salto de electrones entre ellos y da lugar a la baja resistividad eléctrica, alrededor de ρ=7 (m-Ohm / cm) a temperatura ambiente, de la magnetita[40]. Por debajo de T=118 K, los iones Fe^{3+} y Fe^{2+} cambian su orden, y se observa una transición cristalográfica de cúbica a ortorrómbica, propuesta por Verwey[41]. El eje c de la nueva fase ortorrómbica es paralelo y ligeramente más pequeño que el borde del cubo de la fcc y, va acompañada por el ordenamiento de la carga electrónica de los iones Fe $^{3+}$ y Fe $^{2+}$ en los sitios B, lo que produce un gran aumento de la resistividad[42].

El orden magnético en la magnetita viene definido por las interacciones de superintercambio que se establecen, en función de la distancia y ángulo de enlace, entre los iones de Fe^{2+} y Fe^{3+} y los O^{2-} ubicados en las subredes A y B.

Dado que la interacción de intercambio directo entre los enlaces Fe-Fe es insignificante debido a la gran distancia entre los iones Fe[43], la principal contribución a las propiedades magnéticas viene condicionada por la interacción de superintercambio fuerte que se establece entre el orbital de electrones 3d de los iones de Fe se superpone con el orbital de electrones 2p de O^{2-}.

Esta interacción, denominada de superintercambio Fe-O-Fe, depende de la distancia y el ángulo de los enlaces entre los iones Fe y O, es responsable de la alineación antiparalela del momento magnético neto de las subredes A y B, lo que da lugar al orden ferrimagnético en la magnetita[40]. Según lo propuesto por Néel, los cationes Fe^{3+} alojados en las subredes A y B orientadas de manera opuesta, se cancelan entre sí, por lo que solo el momento magnético de los cationes Fe $^{2+}$, contribuye al momento magnético total de la magnetita[44].

Por otra parte, y sometidos a la interacción espín-órbita, los momentos magnéticos de espín se orientan de manera anisótropa dentro de la red cristalina para minimizar la energía global, entorno a unas direcciones preferentes, llamados ejes fáciles.

En la magnetita, el eje fácil (de más baja energía de anisotropía), el eje duro (de más alta energía de anisotropía) y el eje intermedio (de energía de anisotropía intermedia) corresponden con los ejes de la red cúbica [111], [100] y [110], respectivamente[40] (figura 1.6). La constante de anisotropía magnetocristalina (K_1) sufre, en la transición de Verwey, un cambio de signo de negativo a positivo asociado a la transición cristalográfica, que constituye un punto isotrópico magnético (K_1 = 0 a 118 K).

La magnetita posee una constante de anisotropía baja, una magnetización de saturación alrededor de $M_S \approx 90$ (emu/g), coercitividad de H_C= (10-40 mT), temperatura de Curie T_C= 850 ^oC[45] y un momento magnético molecular de μ=4,1[40].

Las partículas de magnetita presentan una estructura magnética de dominios múltiples, como cualquier material con magnetización espontánea y transitan a una estructura de dominio único cuando el tamaño se reduce por debajo del umbral de los D=80-90 nm. Por debajo de un tamaño crítico entorno a D_C = 25 a 30 nm, las NPs de magnetita presentan comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente, con remanencia y campo coercitivos despreciables y una susceptibilidad magnética inicial χ_{in} entre χ_{in}= [0,5-1], lo que permiten mantener una magnetización reversible y una manipulación magnética rápida de interés en los dispositivos electrónicos[46], muy deseables para el control magnético externo.

Los procedimientos químicos como la coprecipitación, solvotermal o la descomposición térmica, son las técnicas de química húmeda más utilizadas para proporcionar NPs de magnetita monodispersas y de alta calidad con diámetros que van desde 10 a 30 nm, que se han convertido en un material estándar como actuadores magnéticos de hipertermia con altas tasas de absorción específica (SAR) en aplicaciones clínicas (MAGFORCE-NanoTherm)[3] y/o como agentes de contraste comerciales T_2 para MRI (Feridex; Resovist, Ferumoxtran, entre otros)[1].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3 Biomedicina

En distintos ámbitos de la biomedicina vienen utilizándose las MNPs de óxido de hierro[1] por algunas de sus propiedades, tales como la fácil metabolización del hierro en el cuerpo, su

magnetización elevada, su contraste para imágenes de resonancia magnética o su respuesta en hipertermia magnética.

Además, dado el pequeño tamaño de las NPs de óxido de hierro SPM, por debajo de 30 nm, comparable a entidades biológicas de interés (proteínas, virus o ADN) y la versatilidad química de su superficie que se puede adaptar mediante técnicas de química húmeda para incorporar fluoróforos, agentes biológicos etc., hace de las NPs de magnetita unas herramientas muy versátiles para una gran variedad de aplicaciones biomédicas ya sea in vivo o in vitro.

Este nuevo campo denominado nanomedicina[47], abarca desarrollos in vitro e in vivo (figura 1.7) para, entre otras aplicaciones, la medicina regenerativa, el desarrollo de medicamentos innovadores, la detección de biomarcadores, terapias génicas o el diagnóstico por imagen.

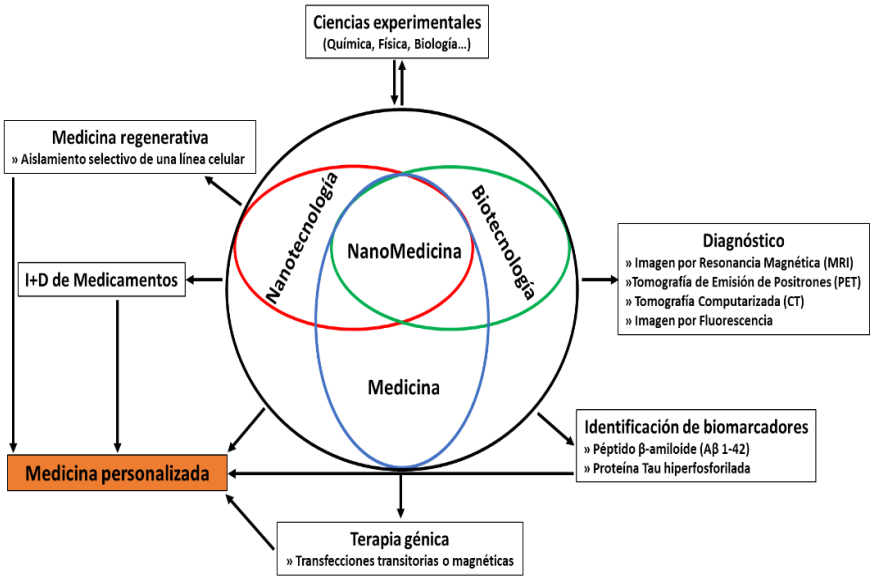


Figura 1.7: Esquema representativo del carácter multidisciplinar de la nanomedicina, con algunas de sus aplicaciones en la potenciación de la medicina personalizada.

1.3.1 Técnicas biomédicas

La posibilidad de combinar materiales, con distintas propiedades, en una única nanoestructura, es una estrategia muy útil para producir agentes multifuncionales para su uso simultáneo en diagnóstico y terapia. Además, la posibilidad de recubrir la superficie exterior con anticuerpos permite el uso selectivo de estas estructuras para diseñar acciones teragnósticas que solventen las limitaciones de soluciones clínicas convencionales[48,49].

Específicamente, las NPs superparamagnéticas con estructura compleja, son las más estudiadas por su versatilidad, pues permiten abordar desarrollos para diagnóstico por imagen médica multimodal (MRI y su combinación con otras técnicas de imagen, como PET, CT, etc.) y técnicas de biodetección de biomarcadores; y también aplicaciones en terapia, como la hipertermia magnética (tratamiento oncológico), la terapia génica o el aislamiento celular[50].

En la figura 1.8 se muestra una ilustración esquemática de varias aplicaciones biomédicas que implica el uso de los nanomateriales magnéticos.

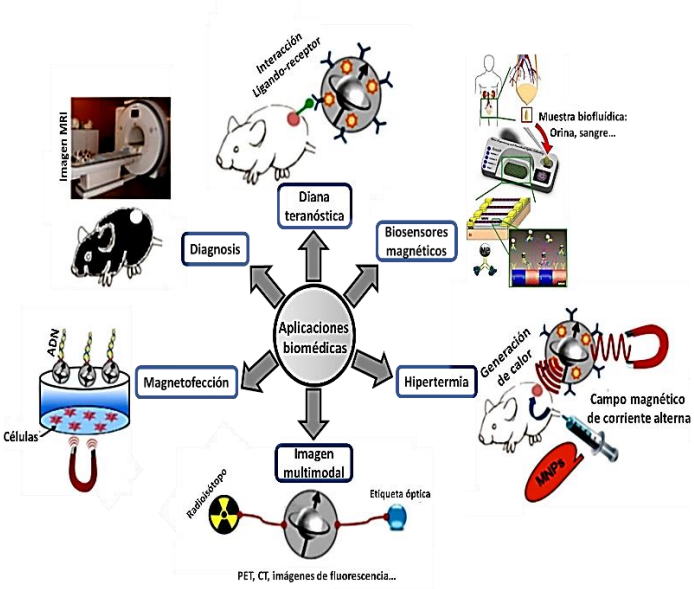


Figura 1.8: Representación esquemática de algunas aplicaciones biomédicas de los nanomateriales magnéticos. Imagen adaptada de la ref. 51. Copyright (2021) con permiso de Elsevier.

1.3.1.1 Diagnóstico

a. Diagnóstico por imagen médica

La imagen por MRI, técnica no invasiva en la que se excita magnéticamente los protones de las moléculas de agua que se encuentran en el cuerpo, para producir una imagen de los diferentes tejidos. Se basa en la aplicación de un campo magnético estático a lo largo del eje Z (B_0) para alinear los espines de los protones del agua en la dirección de B_0, produciendo una magnetización neta M_Z, o longitudinal, en la misma dirección. Tras la aplicación de pulsos de radiofrecuencia (RF) de 90 º, la magnetización neta se cambia al plano XY, generando una magnetización transversal (M_{XY})[52].

En cuanto cesan los pulsos de RF, los protones liberan esa energía absorbida mediante un proceso de relajación magnética donde la componente transversal, M_{XY}, irá desfasándose hasta desaparecer y reaparecerá la componente longitudinal, M_Z. Los tiempos que tardan en relajar la componente transversal y longitudinal, pueden ocurrir por dos mecanismos bien definidos: relajación longitudinal (relajación spin-red) y relajación transversal (relajación espín-espín)[53] (Figura 1.9, A).

El tiempo de relajación longitudinal (T_1) se define como el tiempo que tarda la magnetización longitudinal (M_Z) en alcanzar el 63 % de la magnetización original (Figura 1.9, B). Por otra parte, el tiempo de relajación transversal (T_2), se define como el tiempo que tardan los giros en desfase en alcanzar un valor del 37 % del valor original[54,55] (Figura 1.9, C).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

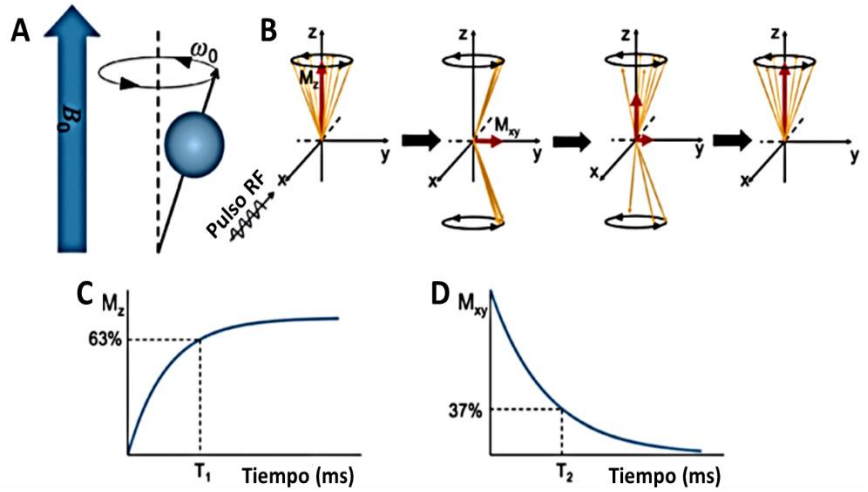


Figura 1.9: Representación esquemática de los principios del MRI. A) Los espines nucleares de los núcleos de hidrógeno se alinean de forma paralela o antiparalela al campo magnético externo aplicado (B_0). B) Después de irradiar con RF resonante perpendicular la magnetización longitudinal o M_Z decrece y aparece una magnetización transversal o M_{XY}. C) Tiempo de relajación longitudinal o T_1 y D) Tiempo de relajación transversal o T_2. Imagen adaptada de la ref. 54. Copyright (2021) con permiso de RSC.

El uso de esta técnica presenta un inconveniente a la hora de obtener una buena resolución espacial debido a diferencias poco significativas en los tiempos de relajación T_1 y T_2 de los tejidos, por lo que, para obtener imágenes más definidas se requiere del uso de agentes de contraste que alteren en la región de interés la relajación.

Mediante la administración de agentes de contraste con propiedades paramagnéticas o superparamagnéticas, se pueden acortar los tiempos de relajación T_1 y T_2, respectivamente[56,57]. La eficiencia de los agentes de contraste para reducir los tiempos de relajación de los núcleos de los protones del agua se denomina relajatividad o coeficiente de relajación (longitudinal o r_1 y transversal o r_2). Un agente de contraste eficaz en MRI-T_1, debe poseer un alto r_1 y una relación r_2/r_1 baja, mientras que los agentes de contraste para MRI-T_2, deben cumplir con el requisito de poseer un alto r_2[58].

Por otra parte, los agentes de contraste en T_1, aumentan la velocidad de la señal de recuperación de la magnetización longitudinal, acortando así el tiempo de relajación T_1 y, por lo tanto, proporcionando una mejora del contraste positivo en las imágenes ponderadas en contraste claro. Mientras que los agentes de contraste en T_2, aumentan la velocidad de decaimiento de la magnetización transversal, acortando así el tiempo de relajación T_2, mejorando el contraste negativo en las imágenes ponderadas en T_2.

Las MNPs compuestas por iones metálicos paramagnéticos con una gran cantidad de iones desapareados tales como Gd^{3+}, Mn^{2+} o Fe^{3+} son los más utilizados en la actualidad como agentes de contraste positivos[59]. Por el contrario, las MNPs utilizadas como agente de contraste negativo, deben poseer una elevada magnetización de saturación (M_S) que generen campos magnéticos inducidos, estos campos magnéticos perturban los procesos de relajación espín-espín (T_2) de los protones del agua, dando lugar a un mayor coeficiente de relajación negativo[60].

Las MNPs compuestas de óxido de hierro tales como la magnetita y maghemita, son los más utilizados como agentes de contraste en T_2, debido a su estabilidad química, falta de

toxicidad y biodegradabilidad[61]. Estas MNPs tienen la capacidad de acortar notablemente los tiempos de relajación T_2* en el hígado, bazo y la médula ósea mediante su captación selectiva y la acumulación en las células del tejido reticuloendotelial[62].

La característica más importante de las MNPs cuando se emplean como agentes de contraste en MRI, es su diámetro y morfología, ya que estos definen en gran medida la relajación y eficiencia del agente de contraste. La mayoría de las aplicaciones exige el transporte de los agentes de contraste por vía intravenosa, por lo que el tamaño y la agregación de la NP es determinante. Las NPs más pequeñas generalmente son absorbidas por el sistema linfático y la médula ósea, mientras que aquellas de más de 50 nm son asimiladas por células del hígado o bazo[63].

Sin embargo, limitaciones como la baja sensibilidad que presenta el MRI, es uno de los inconvenientes para la obtención de una información completa del tejido estudiado. En combinación con otras técnicas, se puede mejorar la sensibilidad de imagen y, por tanto, la precisión en el diagnóstico, como es el caso del PET. En la tabla 1.1 se muestran las ventajas y desventajas de las técnicas MRI y PET[64,65].

Tabla 1.1: Ventajas y desventajas del uso de las técnicas de imagen.

Modalidad	Ventajas	Desventajas
MRI Agentes de contraste (T_1 y T_2)	Alta resolución espacial	Baja sensibilidad
	Buen contraste en tejidos blandos y duros	Tiempos de adquisición relativamente largos
	Proporciona información tanto anatómico como funcional	Requiere de equipamiento costoso
PET	Alta sensibilidad	Riesgo de radiación ionizante
	Bajos tiempos de adquisición	Baja resolución espacial
	Puede monitorizar cambios en el metabolismo tumoral y la biodistribución de fármacos	Requiere de instalaciones específicas para manipulación de radionucleidos
	Escaneo de cuerpo entero	
	Sin límite de penetración de tejido	Requiere de equipamiento costoso

La imagen PET es una técnica no invasiva, que proporciona información fisiológica por medio de la inyección intravenosa de radiotrazadores para su posterior detección de la radioactividad emitida en el organismo y así analizar su distribución, proporcionando información útil de los estados de los tejidos y órganos[66].

El tiempo de exploración en PET depende del tiempo de semivida del radioisótopo utilizados tales como ^{18}F, ^{64}Cu o ^{89}Zr con tiempos de semivida ($t_{1/2}$) de 109 min, 12.7 h y 78.4 h, respectivamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

b. Diagnóstico por detección de biomarcadores

El crecimiento demográfico, la longevidad y la distribución desigual de recursos, plantean desafíos a los sistemas sanitarios. Para aligerar los tiempos de espera, reducir costes, incrementar la precisión de los diagnósticos y mejorar la eficacia de los tratamientos, se están

haciendo grandes esfuerzos en desarrollar soluciones innovadoras en lo que se ha venido a denominar “Point-of-Care” (POC, punto de atención).

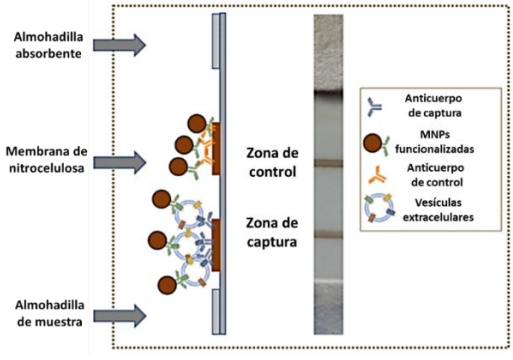
El POC se basa en la transferencia de pruebas clínicas que convencionalmente se realizan en centros médicos, hasta el hogar del paciente[67,68]. Este nuevo concepto, aprobado por la OMS[69], es posible gracias al desarrollo de biosensores de última generación, basados en la incorporación de una “nanoetiqueta” que generará, mediante un estímulo físico o químico, una señal para su posterior lectura y análisis.

Las nanoetiquetas más utilizadas son: nanoestructuras de oro o de plata, por sus propiedades ópticas, los quantum dots, por sus propiedades fluorescentes o las nanoestructuras magnéticas, por sus propiedades magnéticas[70]. El papel de las nanoestructuras, es mejorar la transducción de los biosensores, pues permiten concentrar sobre su superficie, de manera muy específica, el analito biológico (biomarcador) a testar, incluso a concentraciones muy bajas.

Entre los kits de biodetección que utilizan NPs superparamagnéticas como transductores, destacan los biosensores basados en papel como los inmunoensayos de flujo lateral (LFIT)[71], que tienen un gran potencial para ofrecer diagnósticos POC, o los sensores magnetorresistivos, basados en la introducción de las MNPs conjugadas con agentes biológicos, capaces de concentrar el biomarcador de interés mediante el uso de una cámara de agregación magnética[72].

Los LFIT se basa en la migración de la muestra, que contiene el analito a estudiar, a través de unas tiras de nitrocelulosa, que poseen dos líneas de anticuerpos inmovilizados y suelen estar formadas por: una almohadilla de muestra (donde se adiciona la disolución de la muestra). Una almohadilla conjugada (donde se encuentra inmovilizado una línea de anticuerpo bioconjugado con las MNPs). Una zona de captura (donde el complejo formado por el analito-anticuerpo@MNPs se une a un segundo anticuerpo inmovilizado, produciendo una línea visible) y una zona de control (donde el exceso del MNPs@anticuerpo se une y produce una segunda línea visible, lo que nos indica que la migración de la muestra tuvo éxito)[70].

En la imagen 1.10 se muestra una representación esquemática y una fotografía de una LFIT para la detección magnética de vesículas extracelulares, consideradas como una nueva fuente de biomarcadores con especial interés en biopsia líquida[73].



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 1.10: Representación esquemática y fotografía (vista frontal) de un LFIT para la detección de vesículas extracelulares usando MNPs. Imagen adaptada de la ref. 71. Copyright (2021) con permiso de MDPI.

Otras técnicas de biodetección magnética tales como los biochips de microfluidos o los preconcentradores magnéticos de biomarcadores, son más complejos estructuralmente que los LFIT. Estos suelen poseer componentes incorporados como canales en los que se encuentran las MNPs biofuncionalizadas, imanes, sensores de detección y mezcladores de disoluciones. Las MNPs biofuncionalizadas, se desplazan por el canal siguiendo el gradiente creado por imanes permanentes, lo que permite que se mezclen de manera eficiente con el fluido biológico y la inmovilización del analito sobre la superficie de la NP sea óptimo. De esta manera, se pueden separar del resto de moléculas y concentrar magnéticamente los biomarcadores de interés de las muestras de fluidos complejos, lo cual es clave para la detección específica en la posterior transducción de estas señales[74,75].

Por otra parte, la necesidad de detectar biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer (AD) de manera temprana para ralentizar el gran deterioro cognitivo que experimentan los pacientes[76], han llevado a numerosos y destacados estudios para poder detectar en fases tempranas estas proteínas indicadoras de AD, utilizando desde pequeñas moléculas, como la curcumina o rojo congo, obteniéndose una baja selectividad[77,78], hasta el desarrollo de aptámeros o anticuerpos (anti-Aβ o anti-pTau), proporcionando una alta afinidad de unión al péptido Aβ y a los oligómeros pTau[79-81].

El enlace proteína-proteína ha demostrado ser los más específicos en la actualidad. Sin embargo, este enlace necesita de una etiqueta (nanoestructuras magnéticas radioetiquetadas, por ejemplo) para poder ser detectado mediante técnicas de imagen como MRI y PET o para concentrar estas proteínas indicadoras para inmunoensayos. Estas son algunas de las posibles alternativas que se están siguiendo para incrementar la precisión en el diagnóstico precoz de AD[82] o facilitando la cuantificación de Aβ o pTau en kits de inmunoensayo ELISA (figura 1.11).

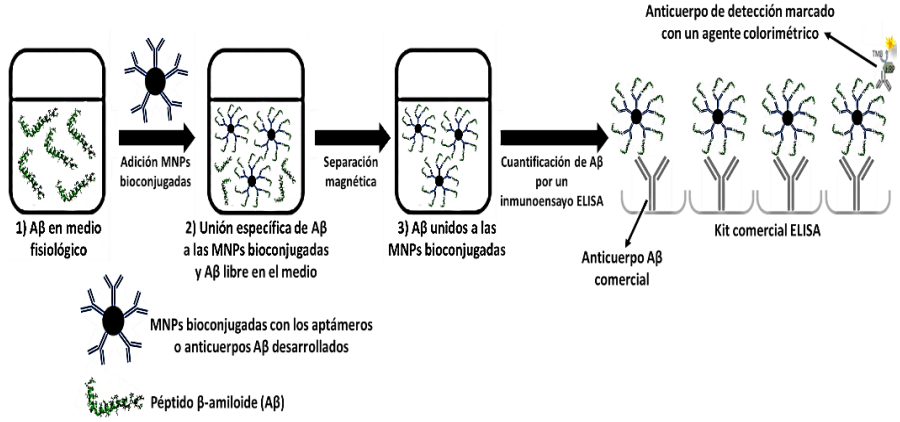


Figura 1.11: Representación esquemática de un proceso unión específica de las MNPs bioconjugadas con aptámeros o anticuerpos Aß al péptido Aß y su cuantificación por un kit ELISA.

1.3.1.2 Terapia

a. Hipertermia magnética

La producción de calor mediante la exposición a campos magnéticos alternos es una de las aplicaciones terapéuticas de las MNPs más estudiadas en los últimos años, que busca destruir de manera selectiva células cancerígenas como terapia para el tratamiento del cáncer[83].

La exposición de las MNPs a un campo magnético alterno en el rango de la radiofrecuencia que provoca la relajación del momento magnético de la NP y la generación de calor. Cuando la partícula se encuentra en régimen SPM, el momento magnético relajará respecto a la red del cristal, lo que se denomina relajación de Néel, mientras que en MNPs bloqueadas, el momento magnético ligado a la red cristalina, hará rotar la NP creando calentamiento por fricción, lo que se denomina relajación de Brown[84]. Dado que las MNPs obtenidas por métodos de síntesis producen una dispersión de tamaños, ambos procesos de relajación pueden darse de manera simultánea en un mismo sistema.

Un tratamiento eficiente de hipertermia, ya sea magnética o de otro tipo, requiere incrementar la temperatura entre 41-45 ºC, donde se produce la muerte de células tumorales, debido a que éstas presentan una mayor sensibilidad a los aumentos de temperatura que las células sanas[85].

Comparado con otros tratamientos oncológicos tradicionales, tales como la quimioterapia o radioterapia, la hipertermia magnética, ofrece ventajas como una mayor selectividad (el efecto del calentamiento puede circunscribirse a la región tumoral), menores efectos secundarios (se evita la toxicidad sistémica de la quimioterapia) y seguridad en cuanto al control del sobrecalentamiento para evitar daños en los tejidos sanos[85,86]. En la figura 1.12 se muestra una representación de un proceso de hipertermia magnética tras la administración in vivo de las MNPs.

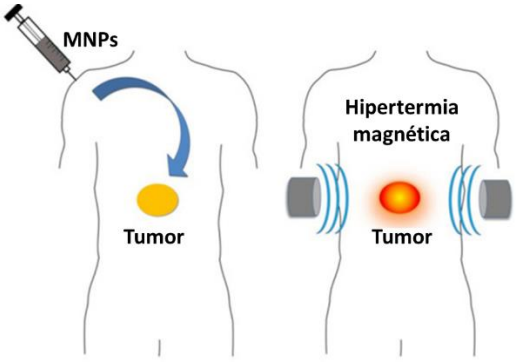


Figura 1.12: Representación esquemática de un proceso de hipertermia magnética mediada por MNPs in vivo. Imagen adaptada de la ref. 87. Copyright (2021) con permiso de Elsevier.

La cuantificación del calor producido por las MNPs se obtiene mediante la tasa de absorción específica o SAR, definido como la potencia absorbida por unidad de masa bajo un campo magnético alterno[88].

$$SAR = \frac{potencia\ absorbida}{m}$$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para la determinación experimental del SAR, la ecuación utilizada sería la siguiente[88]:

$$SAR = \frac{c\Delta T}{m_{mm}\,\Delta t}$$

Donde c es la capacidad calorífica y ΔT es el incremento de temperatura en un tiempo determinado (Δt) y m_{mm}, la masa del material magnético. Los valores de frecuencia (f) y campo magnético alterno (H) aptos para este tipo de tratamientos de hipertermia en aplicaciones clínicas, no deben exceder el límite de seguridad, $H \cdot f < 4.85 \cdot 10^8$ $A \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$, cuando se trabaja con muestras celulares[89].

b. Terapia génica: magnetofección

La terapia génica es una técnica novedosa que utiliza material genético de distintas fuentes para tratar o prevenir diferentes enfermedades como trastornos genéticos y hereditarios, patologías como el cáncer, trastornos autoinmunes o neurodegenerativos, entre otros[55]. El fundamento de esta técnica se basa en la introducción de vectores virales (retrovirus, etc.) o vectores no virales como ADN en células, con el fin de corregir genes defectuosos, aumentar o silenciar la expresión de genes ya presentes con beneficios altamente potenciales como la alta especificidad o la ausencia de toxicidad, en comparación con la quimioterapia[90].

El desafío de esta terapia se focaliza en la internalización de material plasmídico para cruzar la membrana celular. Esta dificultad puede superarse con el uso de nanotransportadores como las MNPs que facilitan la transfección celular ayudadas por la acción de un campo magnético externo. La administración de las MNPs puede llevarse a cabo mediante mecanismos de administración sistémica o mediante administración local[91].

En la figura 1.13, se muestra una representación de una magnetofección, donde se utilizan MNPs funcionalizadas con vectores, tanto virales, como no virales.

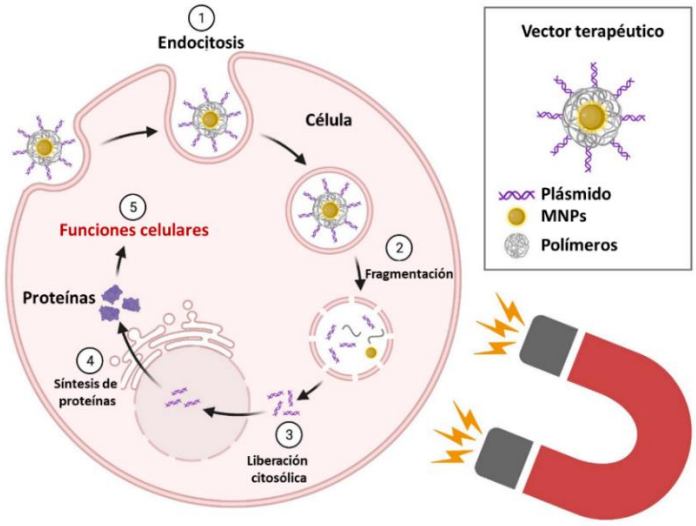


Figura 1.13: Representación esquemática de un proceso de magnetofección. Imagen adaptada de la ref. 92. Copyright (2021) con permiso de MDPI.

1.3.1.3 Procedimientos biológicos

a. Aislamiento celular

La posibilidad de funcionalizar la superficie de MNPs con moléculas biológicas (anticuerpos, antígenos, aptámeros, ADN, etc.) hacen de ellas unas nanoherramientas

magnéticas útiles para la separación no solo de proteínas, sino también de entidades de mayor tamaño como las células[93,94]. Mediante el uso de MNPs de tamaño adecuado, y superficie conveniente bioconjugada, se puede conseguir la inmovilización sobre una célula específica dentro de un fluido biológico complejo y su posterior extracción magnética para el cultivo y producción de la línea celular de interés.

Esta técnica presenta ventajas como la alta selectividad, escalabilidad y de bajo coste, ya que no necesita de usos de kits comerciales, con posibilidad de reutilizar las MNPs una vez el aislamiento se haya realizado y su posterior purificación. Entre los múltiples usos en aplicaciones biomédicas, destaca la medicina regenerativa, medicina personalizada y terapias del cáncer[94].

En la imagen 1.14 se muestra una representación esquemática de un aislamiento celular mediado por MNPs con imágenes reales.

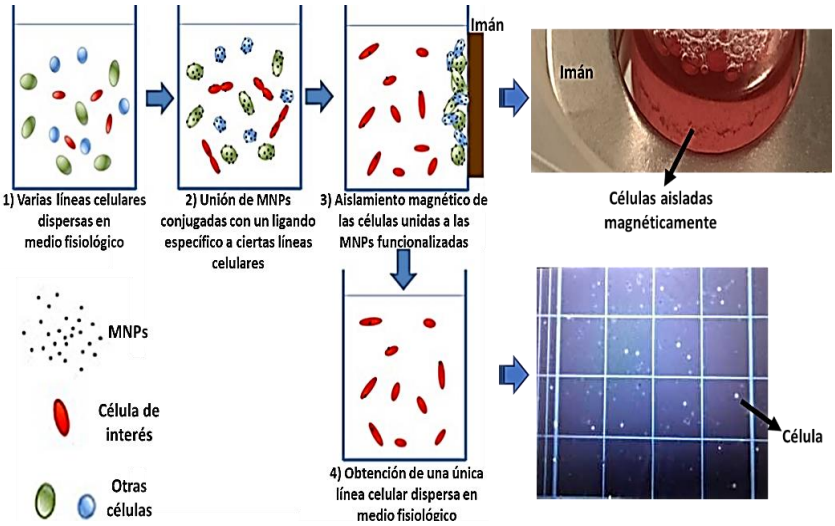


Figura 1.14: Representación esquemática de un proceso de aislamiento de una línea celular mediado por separación magnética.

1.4 Diseño de nanomateriales

El avance experimentado en los últimos años en el diseño de nanomateriales para aplicaciones diversas, se debe en gran medida al desarrollo y optimización de rutas sintéticas sencillas, que han permitido desarrollar una gran variedad de compuestos en escala nanométrica, y el avance en técnicas de caracterización, que permiten el estudio detallado con resolución nanométrica.

1.4.1 Procedimientos de síntesis

La necesidad de producir nanomateriales con propiedades a medida, ha llevado a desarrollo de técnicas de producción tanto físicos, químicos, fotoquímicos y biológicos, con un alto grado de control en cuanto a tamaño, morfología, composición o cristalinidad[95-97]. A lo largo de los años, la evolución de las técnicas de producción ha pasado por diferentes fases de madurez, tal y como se indica en la tabla 1.2, permitiendo alcanzar desarrollos de materiales cada vez más complejos.

Tabla 1.2: Desarrollo sucesivo de la madurez de procesos de producción en la nanotecnología[96,97].

Generación	Periodo	Tipo de desarrollo	Área de aplicación en la que ocurre el avance
Primera	Hasta 2001	Nanotecnología pasiva	Nanofabricación mediante top-down: cerámicas, polímeros, metales nanoestructurados, catalizadores, sistemas microelectromecánicos
Segunda	2001-2005	Nanotecnología activa	Nanofabricación mediante bottom-up: células fotoeléctricas, transistores, sensores, sistemas nanoelectromecánicos
Tercera	2005-2010	Nanosistemas	Nanofabricación mediante bottom-up: nanoestructuras biomiméticas, nanochips
Cuarta	2010-2015	Nanosistemas moleculares	Nanofabricación mediante bottom-up: manipulaciones atómicas y diseño de nanobots

De manera general, todos los procesos de fabricación de nanoestructuras, se clasifican en:

- Dispersantes o "top-down", basados en la fractura de la muestra inicial, de tamaño grande, y con una red cristalina controlada (como las técnicas de ablación láser[98], pulverización catódica o "sputtering"[99] o arco de descarga eléctrica[100,101]).

- condensantes o "bottom-up", basados en reacciones químicas (reducciones de las sales precursoras metálicas en solución, seguida de precipitación, formación y estabilización de las nanoestructuras obtenidas[102]).

Estos últimos procesos de fabricación *bottom-up*, son los más relevantes a la hora de desarrollar nanoestructuras, ya que, a diferencia de los procesos *top-down*, permiten un mayor control sobre los parámetros fisicoquímicos de la nanoestructura[103,104], tales como:

1) el tamaño, mediante la elección o la modificación de la concentración del agente reductor y/o la composición de las NPs;

2) la morfología, obteniéndose desde NPs esféricas hasta NPs más complejas como las huecas;

3) la calidad cristalina, lo que permite mejorar las propiedades dependientes del orden estructural (respuesta plasmónica y magnética);

4) la dispersión de tamaños se puede controlar a través de los parámetros de síntesis;

5) la versatilidad química, que permite una construcción jerárquica de capas sucesivas, mediante el recubrimiento con polímeros u óxidos inorgánicos, o agentes biológicos, entre otros, que permiten controlar la estabilidad coloidal, la biocompatibilidad o la actividad biomédica de la nanoestructura.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En La figura 1.15 se muestra un esquema representativo de las dos técnicas utilizadas para la producción de nanoestructuras.

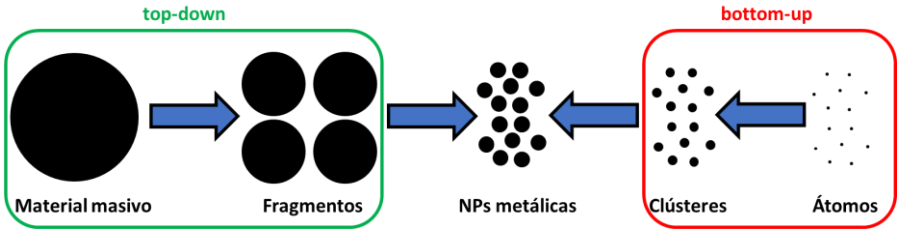


Figura 1.15: Representación sintética de nanofabricación por "top-down" (cuadro verde) y "bottom-up" (cuadro rojo).

En esta Tesis Doctoral, se utilizaron diferentes métodos sintéticos bottom-up para la obtención de nanoestructuras magnéticas complejas, que permitieron integrar diferentes actividades teragnósticas en una única estructura donde se anidaron núcleos magnéticos y diferentes materiales de cubierta. Para ello, se utilizó una combinación secuencial de algunas de las siguientes síntesis:

1) Co-precipitación: es el método más utilizado por su simplicidad para la obtención de MNPs[105]. Éste, consiste en la co-precipitación de los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} en la proporción molar 2:1, respectivamente, mediante la adición de una base, como hidróxido de sodio, amonio o hidracina, en un rango de temperatura de 20 a 90 ºC:

$$Fe^{+2} + 2Fe^{+3} + 8OH^{-} \rightarrow Fe_3O_4 + 4H_2O$$

Tanto el tamaño como la morfología de las MNPs obtenidas por este método, dependerá de la sal metálica precursora empleada (cloruro, sulfato, nitrato, etc.), de la proporción de iones férrico y ferroso, de la temperatura de reacción, de los valores de pH, de la fuerza iónica del medio y de otros parámetros de reacción como la velocidad de agitación y la velocidad de adición de la disolución básica[106].

Los valores de M_S obtenidos por este método están alrededor de 40-60 emu·g^{-1}. Entre las ventajas de este método se encuentran su bajo coste, cortos tiempos de síntesis, la estabilidad directa en agua de las MNPs resultantes, gracias al uso de agua como disolvente, y su escalabilidad. Sin embargo, inconvenientes como la obtención de NPs polidispersas afectan directamente a sus propiedades magnéticas, junto con su baja cristalinidad condicionan su uso en algunas aplicaciones en biomedicina.

2)Solvotermal: está basado en el mismo concepto que el método hidrotermal[107], con la diferencia del uso de un componente orgánico como disolvente en vez de agua. Los precursores metálicos utilizados, deberán ser completamente solubles en el solvente orgánico elegido para la síntesis.

La reacción se lleva a cabo bajo condiciones de alta temperatura y presión, por lo que se requerirá el uso de un autoclave. Dependiendo de las condiciones usadas, este método permite obtener nanoestructuras magnéticas monodispersas de alta cristalinidad, pudiéndose obtener un buen control de la morfología[108]. Inconvenientes como el uso de altas temperaturas (desde 100 a 200 ºC), largos tiempos de síntesis o escalabilidad, condicionada por el volumen del autoclave utilizado, se encuentran en el uso de este método.

3)Microemulsión: este método consiste en la formación de microgotas en una dispersión isotrópica estable de dos fases inmiscibles (agua y disolvente orgánico), en presencia de un surfactante. Este surfactante forma una monocapa en la interfase entre el agua y la fase orgánica, de modo que la parte no polar del surfactante queda disuelta en la fase hidrofóbica, mientras que la parte polar, queda orientada a la fase acuosa.

Este método ofrece un control relativamente bueno del tamaño del núcleo y morfología modificando la relación entre los medios orgánico/acuoso de la mezcla de disolventes[109], como resultado se obtienen MNPs monodispersas, con recubiertas tanto poliméricas como con óxidos inorgánicos. Sin embargo, desventajas como el rendimiento sintético y un exhaustivo proceso de purificación de estas MNPs están presentes en el uso de este tipo de procedimiento sintético.

4)Hidrólisis forzada: este método consiste en la obtención de óxidos metálicos coloidalmente uniformes, formados por medio de la aceleración de la hidrólisis de cationes polivalentes mediante la generación homogénea de iones hidroxilos, procedentes de sales como la urea, por el aumento de la temperatura y por el ajuste del pH.

Estos aniones pueden coordinarse fuertemente para disolver iones metálicos o afectar la morfología de las partículas sin incorporarse a los precipitados[110]. Sin embargo, inconvenientes como el bajo control del espesor de la formación de hidróxidos metálicos como recubiertas de NPs, incluso en las morfologías obtenidas, se encuentran en el uso de este método.

5)Descomposición térmica: este método se basa en la descomposición de compuestos organometálicos en disolventes orgánicos con alto punto de ebullición (200-360 ^{o}C) bajo condiciones controladas, mediante el empleo de tensioactivos o agentes estabilizantes tales como el ácido oleico u oleilamina[111,112].

Este método, ofrece el mejor control en tamaño y morfología de las nanoestructuras obtenidas, con altos grados de homogeneidad y cristalinidad, consiguiéndose incluso que las MNPs posean una alta M_S. La morfología y tamaños de estas nanoestructuras, dependerán fuertemente de las condiciones en cuanto a la proporción estequiométrica del precursor organometálico, tensioactivo y disolvente, junto con la temperatura y el tiempo de síntesis.

Las condiciones de reacción para este método sintético son muy exigentes y se requiere de una atmósfera inerte durante todo el proceso experimental. Este método puede ser escalado y dado su control sobre la nanoestructura cristalina obtenida y tamaño, las propiedades magnéticas de las MNPs, pueden ser moduladas.

Sin embargo, desventajas como la obtención de nanoestructuras estables en medio orgánico, conllevan a la necesidad de utilizar estrategias como el método de transferencia de fase de cara a potenciales aplicaciones biomédicas. Además, esta síntesis requiere el uso de temperaturas muy altas para su producción, lo que aumenta el coste de síntesis.

1.4.2 Técnicas de caracterización

En paralelo al avance en las técnicas de producción, la evolución de las técnicas de caracterización ha permitido determinar la forma, tamaño y algunas propiedades de superficie de los nanomateriales[113,114]. De hecho, en algunas técnicas se ha llegado a límites de resolución

espacial que han permitido el entendimiento de fenómenos de interacción y propiedades fisicoquímicas a escalas atómicas y moleculares[115].

En la tabla 1.3, se muestran las técnicas de caracterización fisicoquímicas más comúnmente utilizadas para conocer las propiedades de los nanomateriales.

Tabla 1.3: Técnicas de caracterización de nanomateriales comúnmente utilizadas en nanotecnología.

Propiedades de las nanoestructuras	Método de caracterización
Morfología (forma/tamaño)	Microscopía electrónica de barrido (SEM) Microscopía electrónica de transmisión (TEM) Microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM) Dispersión de luz dinámica (DLS)
Carga superficial	Potencial zeta
Estructura	Difracción de rayos X (XRD)
Química (Superficie)	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)
Óptica	Espectroscopía de fluorescencia Microscopía confocal
Composición	Termogravimetría (TGA) Espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS)
Magnetismo	Magnetometría de muestra vibrante (VSM) Curvas de susceptibilidad magnética (ZFC/FC)

1) Microscopía electrónica de barrido (SEM):

Los microscopios SEM permiten adquirir imágenes, con una resolución espacial lateral y composicional de hasta 10 y 100 nm, respectivamente, a partir de diferentes señales emitidas por la muestra como resultado de la incidencia de un haz de electrones (e^-) que barre la superficie a analizar. Dependiendo del modo de detección de la señal emergente, se puede obtener información sobre la topografía de la superficie[116].

Los microscopios SEM actuales están equipados con unidades de análisis tales como microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM), espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDX), espectroscopía por dispersión de longitud de onda (WDS) y fluorescencia de rayos X (XRF)[117].

2) Microscopía electrónica de transmisión (TEM):

Los microscopios electrónicos TEM y SEM comparten similitudes en cuanto al funcionamiento. Ambos utilizan un haz de electrones que impacta en la muestra dentro de una cámara de vacío. Sin embargo, en los microscopios TEM, los electrones del haz incidente atraviesan la muestra para construir la imagen mediante los electrones transmitidos[118]. Para conseguir una imagen, una limitación importante es el espesor de la muestra (que debe ser ultrafina, menor a los 100 nm)[118].

Los modos de operación asociados con un TEM de última generación son varios: campo claro (CTEM); campo oscuro (DFTEM); microscopía electrónica de transmisión de alta

resolución (HRTEM); campo oscuro anular a ángulo grande (HAADF); campo oscuro anular a ángulo grande en alta resolución (HR-HAADF); STEM; Crio-TEM. Además, se pueden acoplar técnicas analíticas EDX, espectroscopía por pérdida de energía de electrones (EELS) con su respectiva capacidad para realizar mapeo de elementos y los patrones de difracción de electrones en área seleccionada (SAED)[119].

3)Microscopía de transmisión por barrido (STEM):

La microscopía STEM, combina los principios de SEM y TEM (en la tabla 1.4, se reflejan las principales diferencias de ambas técnicas de imagen, para facilitar su comprensión).

Tabla 1.4: Resumen de las principales diferencias entre SEM y TEM.

	SEM	TEM
Corriente de e^-	Haz fino y focalizado	Haz ancho
Construcción de imagen	Topográfica/superficial	Estructura interna
Resolución espacial	Baja	Alta
Dimensión de la imagen	3D	2D
Espesor de la muestra	Fina o gruesa	Estrictamente fina
Penetración de la muestra	No	Si
Coste	Menos costoso	Más costoso
Velocidad de medición	Más rápido	Más lento
Operación	Fácil uso	Más complicado

La técnica STEM, proporciona imágenes con características complementarias, tales como HAADF, microanálisis EDX y mapeos de los elementos químicos presentes en la muestra (con EELS o la unidad EDX).

4) Dispersión de luz dinámica (DLS):

La dispersión de luz dinámica (DLS), también conocida como “espectroscopia de correlación de fotones” o “velocimetría Doppler con láser”, se ha convertido en la actualidad en una de las técnicas más utilizadas para evaluar la estabilidad coloidal de los nanomateriales en solución en respuesta a factores como: cambios en el pH, la temperatura, concentración de sal, presencia de enzimas, entre otros.

Específicamente, esta técnica se utiliza para determinar el diámetro hidrodinámico (D_h) promedio de partícula en una suspensión coloidal, así como su carga superficial o peso molecular[120]. Todo ello en un rango de tamaños de partículas, de 1 nm a 10 µm, y de moléculas, de hasta 1000 Da.

El fundamento de las medidas del D_h de una suspensión coloidal de nanopartículas por DLS, se basa en el mecanismo de dispersión de la luz de un láser que pasa a través de una suspensión coloidal y analiza la fluctuación de la intensidad de la luz dispersada en función del tiempo.

Además de determinar el tamaño de partícula, de manera simultánea se obtiene el parámetro de índice de polidispersidad (PDI), este índice provee información del estado de agregación/aglomeración de las NPs por medio del análisis del grado de uniformidad de una distribución de tamaño de partícula[121]. El PDI es adimensional y presenta una escala de valores comprendida entre 0 y 1. Los valores de PDI cercanos a 0 indican que la muestra es monodispersa y los valores superiores a 0.7, indican que la muestra presenta gran variedad de tamaños (polidispersa). Sin embargo, para que el uso de una NP sea considerada aceptable en diversas aplicaciones biomédicas (ensayos clínicos, por ejemplo), se requiere que los valores de PDI sean menores a 0.4[122].

Otro de los análisis que podemos obtener de esta técnica, es el potencial zeta de una partícula, que está asociado a la presencia de cargas en la superficie de los nanomateriales o moléculas dispersadas en un medio acuoso. El fundamento de las medidas de potencial zeta se basa en la movilidad electroforética de las NPs bajo la acción de un campo eléctrico generado por los electrodos localizados en la cubeta de medición[123].

El valor obtenido de la medida del potencial zeta de una NP, indicará el grado de estabilidad o agregación de ésta. Generalmente, las NPs, con valores de potencial zeta mayores que +30 mV o menores que -30 mV, se consideran que tienen suficiente fuerza de repulsión entre ellas para poseer una buena estabilidad coloidal[124]. Por otro lado, las NPs que presentan valores de potencial zeta bajos, tienden a agregarse y a flocular debido a las fuerzas de Van Der Waals que actúan sobre ellas. Esto puede ser perjudicial para aplicaciones biomédicas que requieran ensayos in vivo, ya que estas nanoestructuras serán reconocidas rápidamente por el sistema reticuloendotelial (RES)[123].

5) Difracción de rayos X (XRD)

Actualmente, la técnica de XRD se ha convertido en una de las caracterizaciones estructurales no destructivas más comúnmente utilizadas para la determinación estructural de la materia sólida, así como en el análisis de los cambios de fase y calidad cristalina.

Esta técnica, registra la dispersión de rayos X que se hacen incidir sobre una muestra para identificar los planos cristalinos de un material periódico. La periodicidad de los planos atómicos presentes en la estructura cristalina del sólido a analizar, hace que la interferencia de los haces de rayos X refractados solamente resulte constructiva para una serie de ángulos asociados a un patrón de difracción único dentro de una red cristalina[125].

Tanto los ángulos de incidencia asociados a los picos de difracción del patrón de XRD como la separación de los planos cristalinos del material, están relacionados mediante la ley de Bragg[126], cuya ecuación es la siguiente:

$$n\lambda = 2d_{hkl}\, sin\, \theta_{hkl}$$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Donde n es un número entero que representa el orden de la reflexión; λ es la longitud de onda del haz de los rayos X incidente; d es la distancia interplanar entre los planos de reflexión y θ es el ángulo de incidencia o ángulo de Bragg. hkl son los índices de Miller del plano cristalino.

Con respecto a los espectros obtenidos, si la muestra es cristalina, el difractograma revelará la presencia de picos de difracción bien definidos de los ángulos de dispersión específicos, mientras que las muestras amorfas (red cristalina con alguna deformación), poseerán picos de difracción con una anchura de varios grados de posición del pico de difracción (2θ).

Además, esta técnica puede proporcionar información sobre el tamaño de los cristales que componen la muestra. Dicho tamaño medio se puede calcular a partir de la anchura de los picos de difracción, utilizando la ecuación de Scherrer[126]:

$$t = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta_{hkl}}$$

Donde t es el tamaño medio del cristal; K es la constante de Scherrer, cuyo valor típico es de 0.9 para partículas esféricas; λ es la longitud de onda del haz de los rayos X incidente; β es la anchura a media altura de la intensidad máxima del pico de reflexión y θ es el ángulo de incidencia o ángulo de Bragg. hkl son los índices de Miller del plano cristalino.

La ecuación de Scherrer es utilizada para la determinación del tamaño promedio de NPs de diámetros por debajo de los 100 nm, ya que perdería precisión debido a la anchura de los picos poco significativa para partículas grandes. Por otro lado, para NPs muy pequeñas con un diámetro inferior a 2-3 nm, el ensanchamiento del pico es tan severo que el ancho de los picos no puede medirse con precisión o incluso detectarse. Asimismo, esta ecuación no es adecuada para determinar el tamaño medio de nanoestructuras anisotrópicas o de NPs con distribución de tamaño no uniformes[126]. Para estos casos, estos análisis deben interpretarse únicamente con otras caracterizaciones adicionales como TEM.

6) Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X, XPS, también conocida como espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA), es una técnica analítica de superficie utilizada para la determinación cuantitativa de la composición elemental química (con la excepción de los elementos de hidrógeno y helio[127]) y el estado electrónico de los átomos (con una sensibilidad atómica comprendida en el rango de 0.1 a 1 %) de un material.

Además, esta técnica no destructiva proporciona información de los estados de oxidación de los elementos presentes en la muestra, con una profundidad de análisis de superficie de entre 1-10 nm[125]. Por ello, esta técnica es una de las más utilizadas a la hora de determinar la composición química superficial de nanopartículas, nanoestructuras con diferentes recubrimientos, incluso de películas finas poliméricas.

El fundamento de la técnica XPS se basa en el efecto fotoeléctrico. La superficie a analizar se irradia con rayos X blandos (las fuentes de radiación más utilizadas son Al-Kα o Mg-Kα), que interactúan con los electrones de la superficie de la muestra, dando como resultado la emisión de un fotoelectrón eyectado con una energía cinética. Posteriormente, la energía cinética y el número de fotoelectrones que se emiten desde la superficie de la muestra, se miden en un analizador de energía de electrones.

A partir del espectro de energía fotoelectrónica se identifican las estructuras electrónicas de los átomos, ya que cada elemento produce un conjunto de picos XPS con valores característicos de energía de enlace. Estos picos corresponden a la configuración electrónica de los electrones de los átomos (1s, 2s, 2p, 3s, etc.). El número de electrones detectados en cada uno de los picos característicos, está directamente relacionado con la cantidad de un elemento dentro del área irradiada.

7) Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Otra de las técnicas analíticas que implica fotones incidentes es la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, FTIR. Esta técnica de caracterización estructural, es especialmente adecuada para la identificación de la estructura e interacciones moleculares de polímeros y compuestos orgánicos que recubren a una nanoestructura[125].

La espectroscopía FTIR se basa en la medición de los procesos de vibración de los átomos en una molécula a partir de los espectros de absorción de radiación electromagnética, dentro de la región infrarroja (IR) medio (4000-400 cm^{-1}). Cuando una molécula absorbe radiación IR, la vibración de dicha molécula modifica su momento dipolar eléctrico, mostrando en los espectros de absorción FTIR bandas características en la energía asociada a esta transición[128].

Por lo tanto, cada vibración entre los átomos de una molécula tiene asignada una frecuencia que corresponde a una banda de absorción en la región IR. Estos modos de vibración molecular pueden clasificarse en:

-Vibración de tensión o stretching (□), que implica cambios en la longitud del enlace entre dos átomos, estos enlaces pueden estirarse en fase (vibraciones de tensión simétricas) o en fuera de fase (vibraciones de tensión antisimétricas).

-Vibración de flexión o bending (□), originada por cambios en el ángulo del enlace, esta deformación de ángulo puede localizarse en el plano (vibraciones de flexión de balanceo o de tijereteo) o fuera del plano (vibraciones de flexión de aleteo o de torsión)[129].

Según el rango de absorción analizado en un espectro de FTIR, se pueden obtener distintos tipos de información sobre los enlaces de las muestras, dividiéndose en cuatro regiones según el tipo de enlace encontrado: la región de los enlaces simples (O-H, N-H, C-H, etc.) son detectables en el rango espectral comprendido entre 4000-2500 cm^{-1}.

En el rango comprendido entre 2500-2000 cm^{-1} y 2000-1500 cm^{-1}, son característicos de las regiones de los enlaces triples (C≡C, C≡N o X=C=Y, siendo X o Y átomos tales como C, N, O y S) y los enlaces dobles, respectivamente.

Finalmente, la zona situada entre 1500-400 cm^{-1}, es por lo general compleja ya que cada compuesto tiene una absorción característica en esta región, por esta razón a esta parte del espectro se denomina la huella del patrón (fingerprint region). En esta región se identifican las vibraciones atribuidas a los enlaces metal-oxígeno[130].

8) Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia o fluorometría es un tipo de espectroscopia electromagnética no destructiva que permite analizar la fluorescencia de una muestra.

Un material fluorescente emite fotones provenientes de especies moleculares o atómicas, que tras ser excitadas se relajan de nuevo a un estado electrónico fundamental[131]. Las moléculas con la capacidad de emitir fluorescencia, se conocen como fluoróforos.

Los espectros de excitación y emisión de fluorescencia, medidos por los espectrofotómetros de fluorescencia, permiten identificar el tipo de especie fluorescente en la muestra.

9) Microscopía confocal

La microscopía confocal es una de las técnicas de obtención de imágenes fluorescentes de alta resolución que han permitido estudiar de manera sistemática, aspectos estructurales de las proteínas biomarcadas en células[132].

Las ventajas de las imágenes obtenidas por microscopía frente a otras técnicas convencionales de fluorescencia, se encuentran, en gran parte, en la sensibilidad de la fuente de iluminación utilizada[132]. Dicha fuente de iluminación es un láser (radiación colimada en la que el haz monocromático se mantiene perfectamente lineal al propagarse) que ilumina a la muestra de forma específica con una intensidad elevada y estable, consiguiéndose una resolución espacial de hasta 800 nm.

10) Termogravimetría (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA), es una técnica de análisis térmico que mide los cambios de peso de un material en función de la temperatura y tiempo en una atmósfera controlada[57].

Esta técnica es muy útil a la hora de cuantificar la relación de materia orgánica e inorgánica en una muestra a partir de la pérdida de peso experimentada, con una sensibilidad de hasta 0.1 µg. Gracias a esto, es posible identificar la naturaleza y proporción de los recubrimientos orgánicos sobre un material inorgánico.

Un aparato de TGA consiste en registrar de forma continua la variación de masa que experimenta determinado material, colocado en una atmósfera controlada (favorecida por el uso de un gas inerte, N_2 o Ar u oxidativo, O_2 o aire), a medida que aumenta la temperatura (pudiendo alcanzar hasta los 1000 ^{o}C o incluso más) progresivamente a una tasa de calentamiento constante.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

11) Espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS)

La espectroscopía FAAS es una técnica analítica de uso frecuente para la determinación elemental de metales, con un límite de detección de partes por millón (ppm)[133]. Esta alta

sensibilidad, ha convertido a esta técnica en una herramienta muy utilizada para la determinación de la composición de nanoestructuras metálicas o de óxidos metálicos.

Para una determinación exacta del elemento metálico a analizar en un equipo FAAS, la muestra sólida (en este caso, las nanoestructuras magnéticas) se somete a un proceso previo de preparación que permite obtener una disolución del analito adecuada para la atomización.

Entre los métodos previos de preparación de muestra que existen, el método de digestión ácida es de los más utilizados[134]. Este método suele realizarse en un sistema presurizado usando vasos de teflón cerrados y climatizados en un horno microondas o autoclave, con el fin de prevenir contaminaciones o pérdida de analitos volátiles. Además de permitir una completa y rápida digestión de la muestra, debido a que el punto de ebullición del ácido es elevado cuando la presión interna del vaso de teflón aumenta.

Una vez la muestra está digerida, se procede a la atomización de la muestra en el equipo FAAS, en la cual, se administra una cantidad suficiente de energía para disociar las moléculas y así llevar a los átomos a su estado fundamental. Esta cantidad de energía es proporcional a la concentración del elemento que se mide[135].

12) Magnetometría de muestra vibrante (VSM)

La magnetometría VSM es una técnica usada para medir el momento magnético de una muestra. Cuando esta vibra en presencia de un campo magnético constante, genera una curva de histéresis en la cual se puede obtener información de la muestra como su magnetización, remanencia o campo coercitivo, entre otras propiedades magnéticas[136].

13) Magnetometría SQUID

La magnetometría SQUID (superconducting quantum interference device o dispositivo superconductor de interferencia cuántica), es una técnica muy precisa para detectar magnetizaciones muy pequeñas, con una sensibilidad de hasta 10^{-7} emu[137] (lo suficiente para detectar señales del cerebro y el corazón). El fundamento de la técnica SQUID, se basa en el efecto Josephson de las uniones superconductoras, cuantificando de esta manera el flujo magnético con una gran resolución[137]

Bibliografía

1. Y. Xiang & J. Wang. Current status of superparamagnetic iron oxide contrast agents for liver magnetic resonance imaging. World J. Gastroenterol. 2015, 21, 13400–13402.
2. Y. Huang, J. C. Hsu, H. Koo & D. P. Cormode. Repurposing ferumoxytol: Diagnostic and therapeutic applications of an FDA-approved nanoparticle. Theranostics, 2022; 12, 796–816.
3. https://www.Magforce.Com/En/Home/Our_Therapy/ (accessed on 21 December 2021).
4. R.P.Feynman. There's plenty of room at the bottom. Eng. Sci. 1960, 23, 22–36.
5. Y. Piñeiro Redondo, J. Rivas & M. A. López-Quintela. Chapter 4. The Emergence of Quantum Confinement in Atomic Quantum Clusters. Colloidal Foundations of Nanoscience, 2014, 81–105.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. Y. Piñeiro, D. Buceta, J. Rivas & M. A. López-Quintela. Chapter 1. From Nano- to Angstrom technology. Metal Nanoparticles and Clusters, 2018, 1–30.

7. S.O. Pillai. Solid State Physics, 6th ed. New Age International (P) Limited, Publishers, 2005.

8. S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani & F. Rizzolio. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. Molecules, 2020, 25, 112.

9. T. Thangadurai, N. Manjubaashini, S. Thomas & H. Maria. (2020) Nanomaterials, Properties and Applications. In: Nanostructured Materials. Engineering Materials. Springer, Cham.

10. K. McNamara & S. A. M. Tofail. Nanoparticles in biomedical applications. Advances in Physics, 2017, 2, 54–88.

11. E. Roduner. Nanoscopic Materials: Size-Dependent Phenomena. RSC Publishing, 2006.

12. K., Kenneth et al. Nanocrystals as stoichiometric reagents with unique surface chemistry. J. Phys. Chem. 1996, 100, 12142–12153.

13. P. Kelso, B. Tikoff, M. Jackson & W. Sun. A new method for the separation of paramagnetic and ferromagnetic susceptibility anisotropy using low field and high field methods. Geoph. Journ. Intern., 2002, 151, 345–359.

14. N.A. Spaldin. Magnetic Materials: Fundamentals and Application, 2nd ed.; Cambridge University Press: New York, 2010.

15. M. Lines & A. Glass. Principles and Applications of Ferroelectric and Related Materials. Clanrendon Press: Oxford, 1997.

16. J. Intrater. Ferromagnetic Materials – Structure and Properties. Mat. and Manufact. Processes, 1995, 10, 1300–1301.

17. J. D. Adam, L. E. Davis, G. F. Dionne, E. F. Schloemann & S. N. Stitzer. Ferrite devices and materials. IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques, 2002, 50, 721–737.

18. S. Mørup et al. Experimental and theoretical studies of nanoparticles of antiferromagnetic materials. Condens. Matter., 2007, 19 213202.

19. C.Tapeinos. 9- Magnetic Nanoparticles and Their Bioapplications. Micro and Nano Technologies, 2018, 131–142.

20. A. Gupta & D. Yan. Chapter 17 - Magnetic and Electrostatic Separation. Mineral Processing Design and Operations (Second Edition), 2016, 629–687.

21. L. E. Murr. Innovations in Magnetic Materials. Handbook of Materials Structures, Properties, Processing and Performance. Springer, 2016.

22. S. Blundell. Magnetism in condensed matter. Oxford university press, 2001, 127–133.

23. R. Skomski, & J. Zhou. Nanomagnetic models. Advanced Magnetic Nanostructures. Springer, 2006, 41–90.

24. M. L. Neel. Nouvelle theorie du champ coercitif. Physica, 1949, 15, 225–234.

25. R. Skomski & J. M. D. Coey, Permanent Magnetism. Taylor & Francis Group, 1999.

26. K. M. Krishnan, "Biomedical Nanomagnetics: A Spin Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy," in IEEE Transactions on Magnetics, 2010, 46, 2523–2558.

27. G. M. Lekha & S. George. Chapter 11- Colloidal magnetic metal oxide nanocrystals and their applications. Colloidal Metal Oxide Nanoparticles, 2020, 289–335.

28. A. S. Eggeman, S. A. Majetich, D. Farrell & Q. A. Pankhurst. Size and concentration effects on high frequency hysteresis of iron oxide nanoparticles. IEEE transactions on magnetics, 2007, 43, 2451–2453.

29. T. N. Shendruk, R. D. Desautels, B. W. Southern & J. van Lierop. The effect of surface spin disorder on the magnetism of γ -Fe_2O_3 nanoparticle dispersions. Nanotechnology, 2007, 18, 455704.

30. R. L. Rebodos & P. J. Vikesland. Effects of Oxidation on the Magnetization of Nanoparticulate Magnetite. Langmuir 2010, 26, 16745–16753.

31. S. Kumar & R. Madhuri. Chapter 6-Fundamentals for material and nanomaterial synthesis. Gr. Sust. Proc. for Chem. and Env. Eng. and Sci. 2021, 137–169.

32. J. C. Tarafdar, S. Sharma & R. Raliya. Nanotechnology: Interdisciplinary science of applications. African Journal of Biotechnology, 2013, 12, 219–226.

33. A. Lu, E.L. Salabas & F. Schüth. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection Functionalization, and Application. Angew. Chem. Int. 2007, 46, 1222–1244.

34. M. Avolio, C. Innocenti, A. Lascialfari, M. Mariani & C. Sangregorio. Medical Applications of Magnetic Nanoparticles. New Trends in Nanoparticle Magnetism. 2021, Springer Series in Materials Science, vol 308. Springer, Cham.

35. Y. Novoselova. Nanoscale magnetite: New synthesis approach, structure and properties. Appl. Surf. Sci. 2021, 539, 148275.

36. G. M. Lekha & S. George. Chapter 11- Colloidal magnetic metal oxide nanocrystals and their applications. Colloidal Metal Oxide Nanoparticles, 2020, 289–335.

37. R. M. Cornell & U. Schwertmann. The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurences and Uses, Second Edition. Wiley-VCH, 2003.

38. Y. Piñeiro, M. A. González Gómez, L. de Castro Alves, A. Arnosa Prieto, P. García Acevedo, R. Seco Gudiña, J. Puig, C. Teijeiro, S. Yáñez Vilar & J. Rivas. Hybrid Nanostructured Magnetite

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Nanoparticles: From Bio-Detection and Theragnostics to Regenerative Medicine. Magnetochemistry, 2020, 6, 4.

39. A. B. Seabra, M. T. Pelegrino & P. S.Haddad. Chapter 24- Antimicrobial Applications of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Perspectives and Challenges. Micro and Nano Technologies, 2017, 531–550.

40. S. K. Banerjee & B. M. Moskowitz. Chapter 2: Ferrimagnetic Properties of Magnetite. Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms, A New Biomagnetism. Springer, 1985.

41. E. J. W. Verwey. Electronic Conduction of Magnetite (Fe_3O_4) and Its Transition Point at Low Temperatures. Nature 1939, 144, 327–328.

42. M. S. Senn, J. P. Wright & J. P. Attfield. Charge Order and Three-Site Distortions in the Verwey Structure of Magnetite. Nature 2012, 481, 173–176.

43. J. B. Goodenough. Magnetism and the Chemical Bond, Wiley-Interscience, 1963.

44. K. Subir, B. Moskowitz & B. M. Moskowitz. Chapter 2: Ferrimagnetic Properties of Magnetite. Book: Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms, A New Biomagnetism. Plenum Press. New York and London, 1995.

45. D.J. Sellmyer & R. Skomski. Advanced Magnetic Nanostructures. Springer Science & Business Media, 2006.

46. K.Y. Yoon, Z. Xue, Y. Fei, J.H. Lee, V. Cheng, H.G. Bagaria, C. Huh, S.L. Bryant, S.D.Kong, V.W. Ngo, A-R. Rahmani, M. Ahmadian, C. J. Ellison & K. P. Johnston. Control of magnetite primary particle size in aqueous dispersions of nanoclusters for high magnetic susceptibilities. Journal of Colloid and Interface Science, 2016, 462, 359–367.

47. S. Saxena, R. Nyodu & S. Kumar. Current Advances in Nanotechnology and Medicine. Nanobiomedicine, Springer, Singapore, 2020, 3-16.

48. C. Fornaguera & M. J. García-Celma. Personalized Nanomedicine: A Revolution at the Nanoscale. J. Pers. Med. 2017, 7, 12.

49. W. Parka, H. Shinb, B. Choic, W-K Rhimc, K. Naa & D. Han. Advanced hybrid nanomaterials for biomedical applications. Progress in Material Sc. 2020, 114, 100686.

50. K. Herrmann & M. Rösslein. Personalized medicine: the enabling role of nanotechnology. Nanomedicine, 2016, 11, 1–3.

51. A. Guleria, K. Priyatharchini & D. Kumar. Chapter 12 - Biomedical Applications of Magnetic Nanomaterials. Micro and Nano Technologies, 2018, 345–389.

52. A. Guleria, K. Priyatharchini & D. Kumar. Chapter 12-Biomedical Applications of Magnetic Nanomaterials. In Applications of Nanomaterials Micro and Nano Technologies. Woodhead Publishing: 2018, 345−389.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

53. E. J. Blink. Basic MRI Physics. mri:Physics, 2004, 2nd edition.

54. N. Lee & T. Hyeon. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. Chem. Soc. Rev. 2012, 41, 2575–2589.

55. I. Dekkers et al. Consensus-based technical recommendations for clinical translation of renal T_1 and T_2 mapping MRI. Magn. Reson. Mater. Phy. 2020, 33, 163–176.

56. V. Vallabani, K. Singh & S. Ajay. Magnetic Nanoparticles: Current Trends and Future Aspects in Diagnostics and Nanomedicine. Current Drug Metabolism, 2019, 20, 457–472.

57. C. Ellis, J. Pellico & J. Davis. Magnetic Nanoparticles Supporting Bio-responsive T_1/T_2 Magnetic Resonance Imaging. Materials (Basel), 2019, 12, 4096.

58. N. Lee & T. Hyeon. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. Chem. Soc. Rev. 2012, 41, 2575–2589.

59. H. Na, I. Chan & T. Hyeon. Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents. Adv. Mater. 2009, 21, 2133–2148.

60. L. Yang et al. The Roles of Morphology on the Relaxation Rates of Magnetic Nanoparticles. ACS Nano, 2018, 12, 4605–4614.

61. L. Xiao et al. Water-Soluble Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles with Biocompatible Coating for Enhanced Magnetic Resonance Imaging. ACS Nano, 2011, 5, 6315–6324.

62. R. Semelka & T. Helmberger. Contrast agents for MR imaging of the liver. Radiology, 2001 218, 27–38.

63. D. Liu et al. Magnetic resonance imaging of post-ischemic blood-brain barrier damage with PEGylated iron oxide nanoparticles. Nanoscale, 2014, 6, 15161–15167.

64. R. Thomas, I. Park & Y. Jeong. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Multimodal Imaging and Therapy of Cancer. Int. J. Mol. Sci, 2013, 14.

65. Y. Zhao, W. Zheng, and M. Hassan. Chapter 4 - Nanoparticles for imaging application. Front. of Nanosc. 2020, 16, 67–88.

66. J. Vaquero & P. Kinahan. Positron Emission Tomography: Current Challenges and Opportunities for Technological Advances in Clinical and Preclinical Imaging Systems. Annu Rev Biomed Eng. 2015, 17, 385–414.

67. T. Nguyen et al. Point-of-care devices for pathogen detections: The three most important factors to realise towards commercialization. TrAC, 2020, 131, 116004.

68. J. Choi & K. Yong. Editorial for the Special Issue on Point-of-Care Devices. Micromachines, 2020, 11, 389.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

69. L. Heerden, M. Tomlinson & L. Swartz. Point of care in your pocket: a research agenda for the field of m-health. Bulletin of the World Health Organization, 2012, 90, 393–394.

70. B. Cao, K. Wang, H. Xu, Q. Qin, J. Yanga, W. Zhenga, Q. Jin & Daxiang Cui. Development of magnetic sensor technologies for point-of-care testing: Fundamentals, methodologies and applications. Sensors and Actuators A, 2020, 312, 112130.

71. A. Moyano, E. Serrano-Pertierra, M. Salvador, J.C. Martínez-García, Y. Piñeiro, S. Yañez-Vilar, M.A. González-Gómez, J. Rivas, M. Rivas & M.C. Blanco-López. Carbon-Coated Superparamagnetic Nanoflowers for Biosensors Based on Lateral Flow Immunoassays. Biosensors, 2020, 10, 80.

72. G. Reiss et al. Magnetoresistive sensors and magnetic nanoparticles for biotechnology. Journal of Materials Research, 2005, 20, 3294–3302.

73. B. Pang et al. Extracellular vesicles: the next generation of biomarkers for liquid biopsy-based prostate cancer diagnosis. Theranostics. 2020, 10, 2309–2326.

74. U. Hassan et al. A point-of-care microfluidic biochip for quantification of CD64 expression from whole blood for sepsis stratification. Nat. Commun., 2017, 8, 15949.

75. Q. Xiong et al. Magnetic nanochain integrated microfluidic biochips. Nat Commun., 2018, 9, 1743.

76. A. Kumar, A. Singh & E. Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. Pharmacol. Reports, 2015, 67, 195–203.

77. F. Yang et al. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. J. Biol. Chem. 2005, 280, 5892–5901.

78. W. Klunk, M. Debnath & J. Pettegrew. Development of Small Molecule Probes for the Beta-Amyloid Protein of Alzheimer's Disease. Neurobiology of Aging, 1994, 15, 691–698.

79. H. Chan et al. Highly sensitive quantification of Alzheimer's disease biomarkers by aptamer-assisted amplification. Theranostics. 2019, 9, 2939–2949.

80. S. Kim et al. Development of peptide aptamers as alternatives for antibody in the detection of amyloid-beta 42 aggregates. Anal. Biochem. 2020, 609, 113921.

81. C. Duan et al. Polyvalent Biotinylated Aptamer Scaffold for Rapid and Sensitive Detection of Tau Proteins. Anal. Chem. 2020, 92, 22, 15162–15168.

82. 119.X-G. Liu, L. Zhang, S. Lu, D. Liu, L. Zhang, X. Yu & R. Liu. Multifunctional Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Conjugated with Aβ Oligomer-Specific scFv Antibody and Class A Scavenger Receptor Activator Show Early Diagnostic Potentials for Alzheimer’s Disease. Int. J. Nanomedicine, 2020, 15, 4919–4932.

83. S. Moise, J. Byrne, A. El Haj & N. Telling. The potential of magnetic hyperthermia for triggering the differentiation of cancer cells. Nanoscale, 2018, 10, 20519–20525.

84. T. E. Torres et al. The relevance of Brownian relaxation as power absorption mechanism in Magnetic Hyperthermia. Sci. Rep. 2019, 9, 3992.

85. A. Bhardwaj, K. Parekh & N. Jain. In vitro hyperthermic effect of magnetic fluid on cervical and breast cancer cells. Sci. Rep. 2020, 10, 15249.

86. C. Kumar & F. Mohammad. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. Adv. Drug Deliv. 2011, 63, 789–808.

87. O. M. Lemine. Chapter 7- Magnetic Hyperthermia Therapy Using Hybrid Magnetic Nanostructures. Micro and Nano Technologies, 2019, 125–138.

88. C. Papadopoulos et al. Magnetic fluid hyperthermia simulations in evaluation of SAR calculation methods. Physica Medica, 2020, 71, 39–52.

89. Y. Piñeiro, Z. Vargas, J. Rivas, M. Arturo López-Quintela. Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Strategies in Biomedical Applications. Eur. J. Inorg. Chem. 2.15, 27, 4495–4509.

90. Y. Fujita, K. Kuwano, et al. Development of Small RNA Delivery Systems for Lung Cancer Therapy. Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 5254–5270.

91. M. Vaca et al. Physics of in vitro magnetofection. Effect of magnetic transport and redistribution of nanoparticles. J. of Magnet. And Magn. Mat. 2020, 53, 166606.

92. M.A. Yamoah et al. Transgene Delivery to Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Nanoparticles. Pharmaceuticals, 2021, 14, 334.

93. B. Plouffe, S. Murthy & L. Lewis. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review. Rep Prog. Phys. 2015, 78, 016601.

94. K. Zhang et al. Rapid Capture and Nondestructive Release of Extracellular Vesicles Using Aptamer-Based Magnetic Isolation. ACS Sens. 2019, 4, 1245–1251.

95. P. Slepicka, N. S. Kasálková, J. Siegel, Z. Kolská & V. Švorcík. Methods of Gold and Silver Nanoparticles Preparation. Materials, 2020, 13, 1.

96. S. Kumar & R. Madhuri. Chapter 6-Fundamentals for material and nanomaterial synthesis. Gr. Sust. Proc. for Chem. and Env. Eng. and Sci. 2021, 137–169.

97. J. C. Tarafdar, S. Sharma & R. Raliya. Nanotechnology: Interdisciplinary science of applications. African Journal of Biotechnology, 2013, 12, 219–226.

98. D. Riabinina, J. Zhang, M. Chaker, J. Margot & D. Ma. Size Control of Gold Nanoparticles Synthesized by Laser Ablation in Liquid Media. Inte. Sch. Res. Not. 2012, 5, 297863.

99. H. Kadavil, M. Zagho, A. Elzatahry & T. Altahtamouni. Sputtering of Electrospun Polymer-Based Nanofibers for Biomedical Applications: A Perspective. Nanomaterials, 2019, 9, 77.

100.J. KuangLung et al. Preparation of gold nanoparticles by arc discharge in water. J.of Al. and Comp. 2007, 434, 655–658.

101.N. Ahmadi, R. Poursalehi, A. Kirilyuk, M. Kazem & M. Farshi. Tuning the optical response of cross-linked Fe@Au nanoparticles. Appl. Surf. Sci. 2020, 514, 145921.

102.R. Thiruvengadathan et al. Nanomaterial processing using self-assembly-bottom-up chemical and biological approaches. Rep. Prog. Phys. 2013, 76 066501.

103.D. Thapa, V. Palkar, M. Kurup & S. Malik. Properties of magnetite nanoparticles synthesized through a novel chemical route. Mater Lett. 2004, 58, 2692–2694.

104.A.-H. Lu, E. L. Salabas & F. Schüth. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 1222–1244.

105.W. Daoush. Co-Precipitation and Magnetic Properties of Magnetite Nanoparticles for Potential Biomedical Applications. J. Nanomed. Res. 2017, 5, 00118.

106.T. Indira & P. Lakshmi. Magnetic nanoparticles - A review. Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol. 2010, 3, 1035–1042.

107.J. Li, Q. Wu & J. Wu. Synthesis of Nanoparticles via Solvothermal and Hydrothermal Methods. Handbook of Nanoparticles, Springer International Publishing, 2016, 295−328.

108.H. Khurshid, Z. Nemati, O. Iglesias, J. Alonso, M. Phan & H. Srikanth. Hollow Magnetic Nanoparticles. New Trends in Nanoparticle Magnetism. Springer Series in Materials Science, 2021, 308.

109.M. A. López-Quintela, C. Tojo, M. C. Blanco, L. García Rio & J. R. Leis. Microemulsion dynamics and reactions in microemulsions. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2004, 9, 264–278.

110.Z. Wang et al. Forced Hydrolysis and Chemical Co-Precipitation. Handbook of Nanophase and Nanostructured Materials. Springer, Boston, MA, 2003, 55–71.

111.D. Maity, J. Ding & J.-M Xue. Synthesis of Magnetite Nanoparticles by Thermal Decomposition: Time, Temperature, Surfactant and Solvent Effects. Functional Materials Letters, 2008, 1, 189–193.

112.A. Odularu. Metal Nanoparticles: Thermal Decomposition, Biomedicinal Applications to Cancer Treatment, and Future Perspectives. Bioinorg. Chem. Appl. 2018, 9354708.

113.C. W. Oatley. The early history of the scanning electron microscope. J. Appl. Phys. 1982, 53, R1–R13.

114.G. Binnig, C. Quate & C. Gerber. Atomic Force Microscope. Phys. Rev. Lett. 1986, 56, 930–933.

115.M. Glasscott A. Pendergast, M. Choudhury & J. Dick. Advanced Characterization Techniques for Evaluating Porosity, Nanopore Tortuosity, and Electrical Connectivity at the Single-Nanoparticle Level. ACS Appl. Nano Mater. 2019, 2, 819–830.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

116.K. Vernon-Parry. Scanning Electron Microscopy: an introduction. III-Vs Review, 2000, 13, 40–44.

117.W. Zhou, R. Apkarian, Z. Wang & D. Joy. Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM). Scanning Microscopy for Nanotechnology, Springer, 2006.

118.B. Inkson. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. Materials Characterization Using Non-destructive Evaluation (NDE) Methods, 2016, 17–43.

119.P.D. Nellist. Scanning Transmission Electron Microscopy. Springer Handbook of Microscopy, 2019.

120.R. C. Murdock. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. Toxicological Sciences, 2008, 101, 239–253.

121.N. Raval, R. Maheshwari, D. Kalyane, S. R. Youngren-Ortiz, M. B. Chougule & R. K. Tekade. Chapter 10 - Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. Advances in Pharmaceutical Product Development and Research, 2019, 369–400.

122.M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani & M. R. Mozafari. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. Pharmaceutics, 2018, 10, 57.

123.M. Gumustas, C. T. Sengel-Turk, A. Gumustas, S. A. Ozkan & B. Uslu. Chapter 5 - Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems. Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics, 2017, 67–108.

124.J. Clogston & A. Patri. Zeta Potential Measurement. Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. Methods in Molecular Biology, 2011, 697.

125.A. Rajeswari, E. Jackcina Stobel, S. Gopi, K. Jayaraj & A. Pius. Chapter 9 - Characterization studies of polymer-based composites related to functionalized filler-matrix interface. Interfaces in Particle and Fibre Reinforced Composites, 2020, 219–250.

126.M. Kaliva & M. Vamvakaki. Chapter 17 - Nanomaterial characterization. Polymer Science and Nanotechnology, 2020, 401–433

127.M.C. Burrell. Chemical Analysis, Electron Spectroscopy. Encyclopedia of Materials: Science and Technology (Second Edition), 2001, 1142–1149.

128.S. Mourdikoudis, R. M. Pallares & N. T. Thanh. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. Nanoscale, 2018, 10, 12871–12934.

129.C. Berthomieu & R. Hienerwadel. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Photosynth Res. 2009, 101, 157–170.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

130.M. A. Mohamed, J. Jaafar, A. F. Ismail, M. H. D. Othman & M. A. Rahman. Chapter 1 - Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. Membrane Characterization, 2017, 3–29.

131.P. S. Kumar, K. G. Pavithra & M. Naushad. Chapter 4 - Characterization techniques for nanomaterials. Nanomaterials for Solar Cell Applications. Elsevier, 2019, 97–124.

132.S. Wang & I. V. Larina. High-resolution imaging techniques in tissue engineering. Monitoring and Evaluation of Biomaterials and their Performance In Vivo, 2017, 151–180.

133.L. Chaparro et al. Automatic flow analysis method to determine traces of Mn2+ in sea and drinking waters by a kinetic catalytic process using LWCC-spectrophotometric detection. Talanta, 2016, 148, 583–588.

134.O. Acar, A. Tunçeli & A. R. Türker. Comparison of Wet and Microwave Digestion Methods for the Determination of Copper, Iron and Zinc in Some Food Samples by FAAS. Food Anal. Methods, 2016, 9, 3201–3208.

135.D.A. Skoog, S. R. Crouch F. J. & Holler. Principios de análisis instrumental (5ª Ed.). 2008, Madrid: McGraw Hill.

136.A.O. Adeyeye & G. Shimon. Chapter 1 - Growth and Characterization of Magnetic Thin Film and Nanostructures. Handbook of Surface Science, 2015, 5, 1–41.

137.F. Lombardi & T. Bauch. d-Wave YBCO dc superconductive quantum interference devices (dc SQUIDs). Woodhead Publishing Series in Electronic and Optical Materials, 2011, 370–389.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. Desarrollo y caracterización de nanoestructuras magnéticas multifuncionales

Para desarrollar MNPs multifuncionales de utilidad en aplicaciones biomédicas hay que integrar en una única estructura materiales con propiedades específicas tales como núcleos superparamagnéticos (empleados como agentes de contraste negativos, o T_2, en imagen por MRI), recubrimientos biocompatibles y químicamente versátiles (polímeros, sílice, hidróxido de aluminio) que, aparte de otorgar una buena estabilidad coloidal en medios biológicos, protección frente a la corrosión, agregación u oxidación, permitan mejorar las limitaciones que conlleva el uso de las nanoestructuras en aplicaciones in vivo[1-3] asegurando:

-mayor eficiencia en los procesos de captación celular y en el cruce de la barrera hematoencefálica.

-aumento de la vida media de las nanoestructuras en el torrente sanguíneo, ya que suelen ser eliminadas del flujo sanguíneo por macrófagos del sistema antes de llegar a la célula diana.

-mejora de la biodisponibilidad del principio activo y ventana terapéutica más prolongada

Además, este recubrimiento debe permitir integrar de manera estable diversos materiales con actividad teragnóstica (como moléculas o polímeros fluorescentes (PDA, FITC o RITC), radiotrazadores para imagen PET (^{18}F o ^{89}Zr), agentes de contraste positivos, o T_1, en imagen por MRI (nanopartículas magnéticas de Mn_3O_4), agentes biológicos (aptámeros o anticuerpos)[4,5].

Por ello, las técnicas de síntesis en química húmeda utilizadas convencionalmente para desarrollar nanopartículas (co-precipitación, solvotermal, descomposición térmica, hidrólisis forzada, microemulsión, entre otros) han de optimizarse con el fin de integrar diferentes compuestos y controlar la composición, la cristalinidad y homogeneidad de tamaño, morfología y propiedades fisicoquímicas[6]. Es crucial, no solamente la identificación de todos los requisitos que la aplicación demanda para integrarlos en el diseño de la nanopartícula, sino que también hay que conseguir controlar los parámetros de la síntesis para obtener una nanoestructura que replique todos los elementos de dicho diseño.

En cuanto a la literatura científica que reporta el desarrollo de nanoagentes teragnósticos, las nanopartículas superparamagnéticas son las que acumulan el mayor número de ensayos, siendo la magnetita Fe_3O_4, el material más ampliamente utilizado[7-9]. La versatilidad que presentan las nanopartículas de Fe_3O_4, estriba en su biocompatibilidad, estabilidad química, disponibilidad de métodos químicos escalables que permiten control de tamaños y morfológico, buena cristalinidad y respuesta magnética[10].

En este capítulo se describen, en primer término, los procesos de síntesis, y posterior caracterización fisicoquímica, utilizados para obtener nanoestructuras magnéticas complejas compuestas por uno o varios núcleos magnéticos, embebidos de manera robusta en una cubierta biocompatible. Seguidamente, se presentan los procedimientos utilizados para la funcionalización de estas nanoestructuras con agentes fluorescentes o agentes biológicos con el objetivo de proveerlas de actividad óptica para estudios de imagen biomédica y especificidad biológica.

Todos los reactivos utilizados para la obtención de las nanoestructuras magnéticas y el método de preparación de las muestras para las diferentes técnicas de caracterización, se encuentran descritos en el anexo I de esta Tesis Doctoral.

2.1 Síntesis de núcleos magnéticos

Uno de los desafíos que se persiguen en la síntesis es que las nanopartículas obtenidas sean lo más uniformes posibles, es decir, que su distribución de tamaños sea estrecha y de una morfología concreta. Para ello, independientemente del método utilizado, el proceso de síntesis de nanopartículas se compone de dos etapas, nucleación y crecimiento[11]. Para obtener nanopartículas uniformes estas etapas deben estar diferenciadas entre sí, suceder en diferentes tiempos y además la etapa de nucleación debe ser única generándose todos los núcleos al unísono[11].

Además, se sabe que las propiedades magnéticas son fuertemente dependientes del tamaño en la escala nanométrica[12]. Sin embargo, el comportamiento magnético de las nanopartículas no sólo depende de la composición química y el tamaño, sino además de su estructura cristalina y la anisotropía de forma[12-14]. Es por esto por lo que el método sintético de las nanopartículas juega un papel muy importante, razón por la cual es necesaria una revisión cuidadosa de los mismos.

Uno de los objetivos de esta Tesis, fue desarrollar MNPs que exhibiesen un comportamiento magnético específico (superparamagnético, ferromagnético o paramagnético) mediante la selección de un procedimiento químico (de una o dos etapas) indicado para el control de tamaño, composición química y forma de las nanopartículas magnéticas sintetizadas. De este modo, se obtuvieron nanopartículas sólidas con diferentes formas: por un lado, nanoesferas con propiedades paramagnéticas y superparamagnéticas. Estas últimas con el mayor tamaño posible sin que sobrepasasen el tamaño crítico para evitar que dejasen de ser superparamagnéticas a temperatura ambiente y para que mostrasen una magnetización de saturación elevada. Por el otro, nanocubos de magnetita o nanoesferas de carburo de hierro con anisotropía de forma y que presentan propiedades ferromagnéticas y una alta magnetización de saturación.

Por otra parte, se desarrollaron MNPs de forma esférica y huecas, con la doble intención de uso como agente de contraste y al tener el interior libre, poder usarse como agente de transporte para liberación de fármacos.

Una vez obtenidas las nanopartículas, se procedió a su caracterización fisicoquímica y estructural, utilizando diferentes técnicas: difracción de rayos X (XRD), microscopía electrónica de transmisión y patrones de difracción de electrones en área seleccionada (TEM, STEM, HRTEM y SAED), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), dispersión de luz dinámica (DLS), análisis termogravimétrico (TGA), espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS). La caracterización magnética de las MNPs se llevó a cabo mediante medidas de magnetización vibracional (VSM) y sus respectivas curvas de susceptibilidad magnética ZFC/FC.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las medidas del potencial Z, los espectros de infrarrojos y otras caracterizaciones fisicoquímicas complementarias de las restantes MNPs obtenidas, se encuentran en el anexo II de esta Tesis Doctoral.

2.1.1 Fe_3O_4

a Esferas

Las síntesis de MNPs de óxido de hierro esféricas se llevaron a cabo siguiendo dos métodos de síntesis diferentes, el método de co-precipitación y el de descomposición térmica, que son los más utilizados en la obtención de MNPs para imagen biomédica[15]. Como se explicó en el capítulo 1, estos procedimientos sintéticos permiten controlar de manera distinta la forma, el tamaño de partícula y la cristalinidad de las nanopartículas obtenidas. Con el fin de desarrollar NPs de magnetita con diferentes tamaños se han optimizado ambos métodos.

En la tabla 2.1, se reflejan las principales ventajas e inconvenientes de estos dos métodos sintéticos para la obtención de MNPs esféricas y compactas.

Tabla 2.1: Principales ventajas e inconvenientes de las rutas sintéticas usadas para la obtención de MNPs de Fe_3O_4 esféricas.

Método	Ventajas	Inconvenientes
Co-precipitación	Simple, rápido y de bajo coste. Alto rendimiento y escalabilidad. MNPs hidrofílicas	Alta polidispersidad y agregación. Baja cristalinidad
Descomposición térmica	Alta monodispersidad, mayor control de la morfología, escalabilidad y alta cristalinidad	Mayor coste. Uso de reactivos tóxicos. MNPs hidrofóbicas

El método de co-precipitación se basó en el procedimiento descrito por Massart[16]. Este método se utilizó con el fin de obtener MNPs de un solo núcleo magnético y con un tamaño aproximado de 10 nm. Además, con la intención de mejorar la estabilidad coloidal de las MNPs en medio acuoso, la superficie de éstas se ha funcionalizado con agentes estabilizantes tales como el ácido aminoláurico (ALA), ácido poliacrílico (PAA) o citrato sódico, con el objetivo de proporcionarle a la NP de magnetita una barrera física que prevenga la agregación, una mayor biocompatibilidad y una superficie hidrofílica funcionalizada con grupos carboxílicos (citrato o PAA) o con grupos aminos (ALA).

Para ello, 45 mmoles de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ y 30 mmoles de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (con una relación molar Fe^{+3}/Fe^{+2} de 1.5), se disuelven en 100 mL de una disolución acuosa de HCl 10 mM, bajo agitación mecánica (210 rpm). Una vez disueltas las sales, la mezcla se lleva a una temperatura de 60 °C, alcanzada esta temperatura se adicionan 770 mmoles de NH_4OH, por lo que la muestra pasa de color castaño-marrón a negro indicando la formación de la magnetita. Transcurridos 30 segundos, se incorporan 1.11 mmoles del agente estabilizante (ALA, citrato sódico o PAA, según fuera el caso) y se deja reaccionar durante 1 hora.

Una vez enfriada la reacción y bajo agitación mecánica, ésta se acidifica con una solución al 9 % de HCl hasta conseguir un pH de 5 y las nanopartículas de magnetita se separan del medio de reacción mediante el uso de un imán de neodimio. Estas MNPs se lavan varias veces (6x) con agua Milli-Q y finalmente se redispersan en agua Milli-Q.

Por otra parte, la producción de MNPs esféricas y de un solo núcleo mediante un procedimiento de descomposición térmica, es una técnica más compleja que requiere tanto del uso de compuestos organometálicos precursores del óxido de hierro estables en medios orgánicos como el empleo de equipamiento y condiciones más específicas que las usadas en el método de co-precipitación. La estrategia más común para conseguir MNPs por este método, se basa en el uso de agentes surfactantes como el ácido oleico o la oleilamina que les confiere una buena estabilidad coloidal en medios lipofílicos.

Las síntesis de nanopartículas de magnetita de tamaños comprendidos entre 7 nm y 15 nm, se basaron en los procedimientos descritos por Sun[17] y Tong[18], respectivamente, pero introduciendo en los mismos varias modificaciones. Para ello, 100 mL de éter bencílico se mezclan, bajo agitación mecánica (450 rpm) y en atmósfera de nitrógeno, con $Fe(acac)_3$, ácido oleico (OA), oleilamina (OLA) y 1,2-hexadecanodiol, obteniéndose una disolución homogénea de color marrón oscuro. Posteriormente, la temperatura de la disolución se incrementa a 200 ºC a una velocidad de calentamiento de 5 $^{o}C \cdot min^{-1}$ y se deja reaccionar durante 2 horas a reflujo.

Finalmente, se incrementa la temperatura, a la misma velocidad de calentamiento, hasta los 300 ºC y se mantiene estable a esta temperatura durante 1 ó 2 horas a reflujo, según fuera el caso. En la tabla 2.2 se muestran las cantidades de los reactivos usados y sus respectivas relaciones molares Fe:surfactante (Eq) para la obtención de cada tamaño promedio de nanopartículas de magnetita.

Una vez enfriada la reacción, las MNPs obtenidas, se separan del sobrenadante mediante la adición de etanol y usando un imán de neodimio. Para realizar el lavado de las nanopartículas se utiliza una mezcla etanol:hexano (proporción 3:1, respectivamente). Para ello, la dispersión se agita mecánicamente y al cabo de 20 minutos, las nanopartículas son separadas nuevamente con la ayuda de un imán. Este procedimiento se realiza cinco veces. Finalmente, las NPs se redispersan en ciclohexano y esta disolución resultante se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos, descartando de esta forma, el precipitado formado que contiene MNPs agregadas.

Tabla 2.2: Condiciones sintéticas usadas para el desarrollo de MNPs esféricas obtenidas por descomposición térmica.

Tamaño (nm)	$Fe(acac)_3$ (mmol)/ Eq	OA (mmol)/ Eq	OLA (mmol)/ Eq	1,2-hexadecanodiol (mmol)/Eq	T^a (ºC)/ t (h)
7	10/1	30/3	20/2	50/5	200/2 300/1
16	6/1	48/8	12/2	24/4	200/2 300/2

Como se observa en la tabla anterior, la relación Fe:surfactante o el tiempo de síntesis son factores determinantes en la forma final y tamaño que presentan las nanopartículas, como previamente han demostrado varios trabajos anteriores[17-19]. En este trabajo, los surfactantes empleados fueron el ácido oleico (principal agente surfactante), el 1-2 hexadecanodiol y la oleilamina (como agentes surfactantes/estabilizantes y reductores).

Con el fin de interpretar la variación de los parámetros experimentales del tiempo de síntesis y como la relación de surfactantes empleados deriva en los dos tamaños obtenidos de MNPs usando el método de descomposición térmica, nos apoyaremos en el modelo de

LaMer[20,21]. Este modelo establece que, para que tenga lugar la formación de las nanopartículas tienen que darse dos procesos, la nucleación y el crecimiento. Antes de comenzar el proceso de nucleación, los reactivos se mezclan y generan las especies precursoras de los núcleos ($Fe(oleato)_x$). Cuando estas especies precursoras llegan a una concentración de sobresaturación (Cmin) comienza el proceso de nucleación.

Una vez ocurrido el proceso de nucleación, el número de precursores que forman los núcleos disminuye, por lo que ya no se formarán más núcleos y las especies en disolución se difundirán hacia la superficie de los mismos y propiciando su crecimiento.

Es en este proceso donde los surfactantes ejercen un efecto tanto estabilizante como coordinador con los átomos de Fe de los distintos núcleos formados, influyendo en la velocidad de crecimiento, el tamaño y la morfología final de la nanopartícula obtenida[21,22] (figura 2.1).

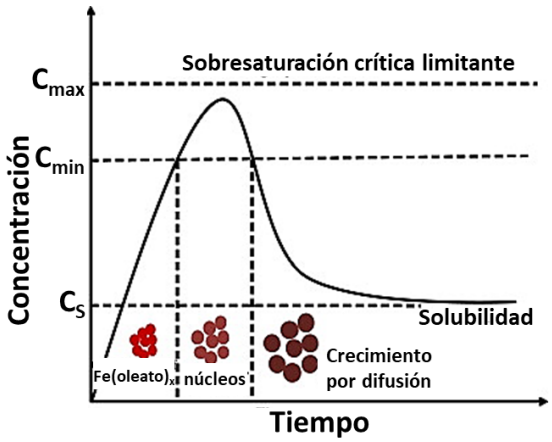


Figura 2.1: Diagrama de LaMer para la síntesis de MNPs. Imagen adaptada de la ref. 11. Copyright (2021) con permiso de Elsevier.

Para la formación de MNPs pequeñas (5-7 nm) mediante el método de descomposición térmica, una de las estrategias seguidas es la de disminuir la cantidad de complejo precursor (o $Fe(oleato)_x$) formado. Aunque se formen menos núcleos con un diámetro más grande, al disminuir la sobresaturación (S) y aumentar la tensión superficial (γ) (ecuación 2.1)[22,23], durante el crecimiento hay menor cantidad de complejo disponible y el tamaño final de las MNPs es pequeño:

$$r^* = \frac{-2\gamma}{\Delta G_V} = \frac{2\gamma V_M}{kT \ln S}$$

Donde r^* es el radio crítico y marca la barrera de energía que deben tener los núcleos para ser estables y no volver a redisolverse, ΔG_V es el cambio de energía libre de Gibbs por unidad de volumen, k la constante de Boltzmann y V_M es el volumen molar del precursor.

Otras de las estrategias seguidas para conseguir MNPs esféricas de tamaños pequeños, se basa en el empleo de surfactantes como el 1-2 hexadecanodiol, el cual favorece la formación de NPs pequeñas, ya que disminuye la tensión superficial y con esta el radio crítico, facilitando de esta forma la nucleación, y al quedar menos moléculas de complejo precursor, las NPs formadas poseen menor tamaño[24,25].

En cambio, para la obtención de MNPs de mayor tamaño (14-16 nm), se necesita aumentar de manera considerable la formación de complejos con ligandos que posean una buena capacidad de coordinación como el ácido oleico. Esto se consigue mediante el aumento de la relación molar Fe:oleico. De este modo, se favorece tanto la formación de los núcleos de las NPs de magnetita como el crecimiento de éstas.

La estructura cristalina de las nanopartículas esféricas de magnetita obtenidas mediante los métodos de co-precipitación y descomposición térmica, fue analizada mediante caracterización por XRD, HRTEM y SAED.

Los difractogramas de rayos X (figura 2.2) muestran que las posiciones e intensidades relativas de todos los picos de difracción concuerdan con la magnetita, con estructura tipo espinela inversa (ficha JCPDS 19-0629)[26].

El cálculo del tamaño de cristal, utilizando la fórmula de Scherrer[27], a partir de los picos de los difractogramas, es de 14.4 y 6.4 nm para las MNPs sintetizadas mediante descomposición térmica (de tamaños comprendidos entre 15 y 7 nm) y 6.7 nm para las obtenidas por co-precipitación.

Adicionalmente, se han obtenido los parámetros de red (a_0) de las MNPs a partir del análisis de los difractogramas utilizando la fórmula de la ley de Bragg[27,28]. Todos los parámetros de red obtenidos experimentalmente son similares al parámetro de red reportado de la magnetita (8.39 Å)[29-31]. Sin embargo, se puede observar que en el método de co-precipitación, las líneas de difracción están ligeramente desplazadas a mayores ángulos dando un parámetro de red de 8.35 Å. Por el contrario, el parámetro de red para las MNPs, de 7 y 15 nm de diámetro, sintetizadas por descomposición térmica es de 8.37 y 8.38 Å, respectivamente, lo que verifica la obtención de partículas de magnetita estequiométricas por este método.

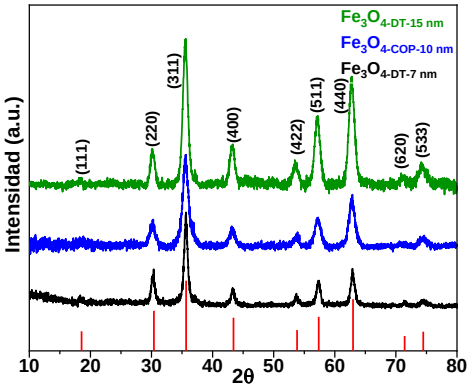


Figura 2.2: Difractograma de rayos X de las MNPs de Fe_3O_4 esféricas sintetizadas por co-precipitación (azul) y por descomposición térmica de diámetros comprendidos entre 7 nm (negro) y 15 nm (verde), comparado con las reflexiones principales de la magnetita determinadas teóricamente.

Además, el análisis estructural se ha completado con medidas de HRTEM y SAED con el fin de determinar el grado de cristalinidad de las MNPs sintetizadas (figura 2.3). En todas las micrografías de HRTEM de las MNPs se pueden observar los planos cristalinos, orientados paralelamente, de las nanoesferas magnéticas, con un espaciado interplanar de alrededor de 0.20 nm, que corresponde al interespaciado del plano cristalino (400) consistente con la estructura cristalina tipo espinela inversa de magnetita[26]. Dichos planos son más visibles en las

MNPs sintetizadas por descomposición térmica, sobre todo en las que tienen un diámetro promedio de 15 nm, lo que confirma su gran calidad cristalina.

Por su parte, las reflexiones halladas en los patrones de difracción SAED coinciden con los picos de difracción observados en el análisis de XRD. Dichas reflexiones encontradas en el análisis SAED están determinadas por unos anillos concéntricos (con una mayor definición en las MNPs sintetizadas por el método de descomposición) cuyas distancias interplanares promedio de 4.84, 2.97, 2.50, 2.10, 1.71, 1.61, 1.48, 1.32 y 1.27 Å se corresponden con los planos cristalinos (111), (220), (311), (400), (422), (511), (440), (620) y (533), respectivamente, asociados a la estructura tipo espinela inversa de la magnetita[32].

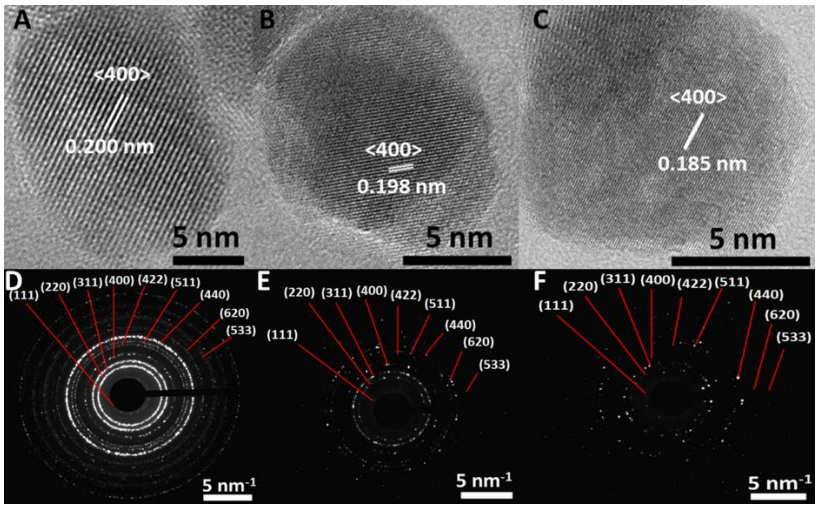


Figura 2.3: Micrografías de HRTEM y sus respectivos patrones de difracción SAED de las nanoesferas sintetizadas por descomposición térmica, de diámetros comprendidos entre 15 nm (A y D) y 7 nm (B y E), y por co-precipitación (C y F).

Mediante las imágenes obtenidas por TEM y los histogramas de distribución de tamaños, representados en la figura 2.4, se ha podido evaluar el tamaño y forma de las MNPs. Las micrografías A y B consisten en NPs bastante uniformes en tamaño, con una morfología esférica. También se puede observar que las NPs se encuentran bastante aisladas entre sí, debido al recubrimiento de ácido oleico que poseen. Por otra parte, en la micrografía de las NPs sintetizadas por co-precipitación (imagen C), se observa una morfología esférica menos definida en comparación con las MNPs sintetizadas por descomposición y con un cierto grado de aglomeración evidente, y que es independiente de los grupos funcionales anclados en la superficie.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

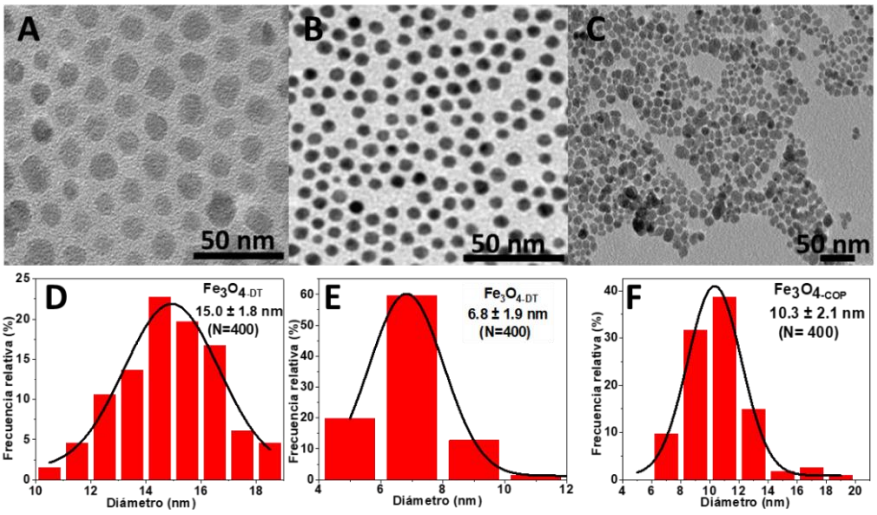


Figura 2.4: Micrografías TEM e histogramas de la distribución estadística de tamaños de las nanoesferas sintetizados por descomposición térmica, de diámetros comprendidos entre 15 nm (A y D) y 7 nm (B y E), y por co-precipitación (C y F).

Con el fin de evaluar la estabilidad coloidal en medio acuoso de las MNPs sintetizadas por ambos métodos, se midió el tamaño hidrodinámico, mediante espectroscopía de correlación de fotones (DLS), de las diferentes MNPs funcionalizadas con agentes estabilizantes hidrofílicos, para valorar su adecuación para aplicaciones biomédicas. Por este motivo, las MNPs sintetizadas por descomposición térmica, recubiertas en un primer paso mediante ácido oleico, lo que les permite ser estables en medios orgánicos de baja polaridad tales como hexano o ciclohexano, se funcionalizaron a posteriori con un polímero biocompatible (PAA) hidrofílico, utilizado para prevenir la agregación de las MNPs[33].

Para llevar a cabo la transferencia de estas MNPs a medio acuoso, 1 mL de una disolución de PAA en THF (a una concentración de 10 $mg \cdot mL^{-1}$) se adicionan a 10 mL de una solución que contiene las MNPs en ciclohexano, a una concentración de 1 $mg \cdot mL^{-1}$. La mezcla se introduce en un incubador con agitación orbital (200 rpm) a temperatura ambiente durante 2 horas.

Una vez terminada la reacción, las NPs se separan del sobrenadante con la ayuda de un imán de neodimio y se lava con una mezcla de etanol:hexano (proporción 3:1, respectivamente) para eliminar los restos de ácido oleico libre y el exceso de ácido poliacrílico que quedase sin reaccionar, la dispersión se agita mecánicamente y al cabo de 20 minutos, las NPs son separadas nuevamente con la ayuda de un imán. Este procedimiento se realiza cinco veces. Finalmente, las MNPs se redispersan en agua Milli-Q.

En la figura 2.5 se muestran las distribuciones estadísticas de los tamaños hidrodinámicos de las diferentes nanoesferas magnéticas funcionalizadas con PAA, los cuales presentan un pico único y definido en la distribución de tamaños, correspondiente a una única población, y característico de NPs monodispersas. Los diámetros hidrodinámicos promedios (D_h) varían en 8, 37 y 19 nm en comparación con los diámetros promedios de TEM de 7, 10 y 15 nm, respectivamente. Esta diferencia de tamaño es razonable considerando que el peso molecular del PAA es en promedio cercano a 2000 $g \cdot mol^{-1}$, y que mediante el DLS se determina el diámetro hidrodinámico del núcleo inorgánico y la corona de polímero, que se hincha en

disolución. En cuanto a los valores de PDI obtenidos, todos ellos se encuentran en torno a los 0.2, valor correlacionado con una buena monodispersidad.

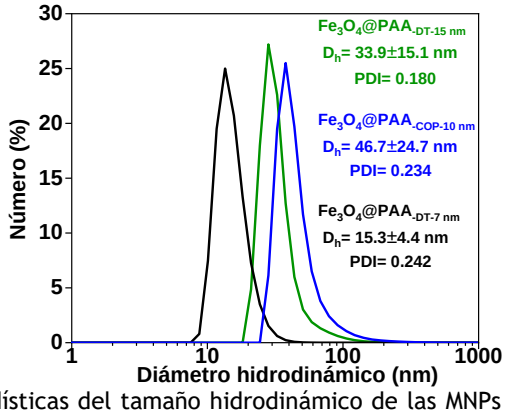


Figura 2.5: Distribuciones estadísticas del tamaño hidrodinámico de las MNPs sintetizadas por descomposición térmica, de diámetros TEM comprendidos entre 15 nm (verde) y 7 nm (negro), y por co-precipitación (azul).

Por último, se evaluó el comportamiento magnético de las nanoesferas de magnetita mediante medidas de magnetometría vibracional (VSM) y de susceptibilidad magnética ZFC/FC (SQUID) cuyos resultados se muestran en la figura 2.6 y en la tabla 2.4. En los ciclos de histéresis se puede observar que todas las MNPs presentan valores de campos coercitivos y magnetización remanente pequeños o casi nulos a temperatura ambiente (300 K). Dichos valores, junto con el tamaño que presentan todas estas MNPs, son características atribuidas a un comportamiento superparamagnético[34,35]. Aunque en sentido estricto para que una NP sea considerada superparamagnética, la magnetización de remanencia debería ser cero, el valor obtenido en las muestras, es atribuido a la medida dinámica (sin estabilización del campo magnético) en la que se lleva a cabo las medidas de magnetización de las muestras.

Por otra parte, se observa que estas MNPs poseen una magnetización de saturación que varía entre 62 a 83 emu/g_{Fe3O4}. Este valor es inferior al de la magnetita en su forma masiva o bulk, que es de 92 emu/g_{Fe3O4}[36], debido a que las NPs, por su pequeño tamaño, presentan una capa magnética superficial muerta que reduce su magnetización total[37]. Hay que destacar que las nanoesferas de magnetita sintetizadas por el método de descomposición térmica son las que poseen mayor magnetización de saturación a medida que aumenta el tamaño de éstas, aspecto que puede relacionarse con un mayor tamaño cristalino de la NP frente a las MNPs sintetizadas por el método de co-precipitación, obtenidas a una menor temperatura[38] (tabla 2.3).

Tabla 2.3: Valores de los tamaños de las MNPs obtenidos por TEM y XRD.

NP	D_{TEM} (nm)	D_{XRD} (nm)
$Fe_3O_{4\text{-DT-15 nm}}$	15.0	14.4
$Fe_3O_{4\text{-DT-7 nm}}$	6.8	6.4
$Fe_3O_{4\text{-COP-10 nm}}$	10.3	6.7

Para confirmar el comportamiento superparamagnético de estas MNPs, se determinó la temperatura de bloqueo (T_B) mediante la obtención de las curvas de magnetización ZFC/FC, obtenidas mediante un magnetómetro SQUID (figura 2.6, B), a partir del máximo de la curva ZFC del sistema estudiado.

Como se puede ver en la tabla 2.4, la T_B de las MNPs esféricas, se encuentra por debajo de los 300 K, lo que confirma que todas son superparamagnéticas a temperatura ambiente[39], observándose que la magnetización aumenta al incrementar el tamaño de NP.

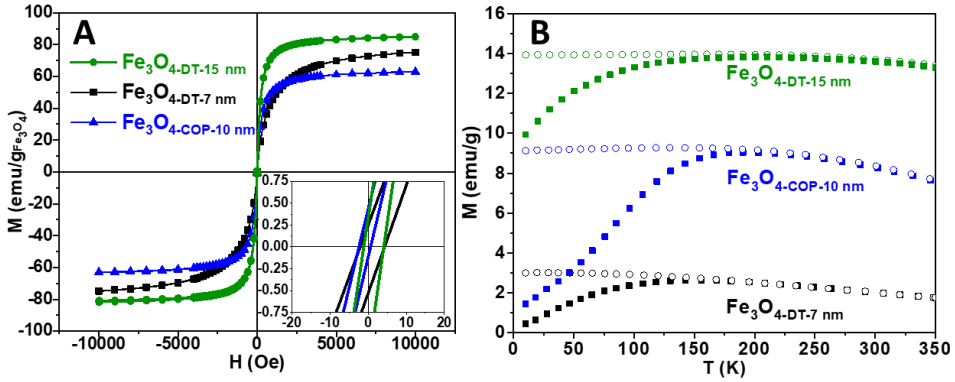


Figura 2.6: Ciclos de histéresis a 300 K (A) y curvas de magnetización en función de la temperatura (B) de las MNPs sintetizadas por descomposición térmica, de diámetros TEM comprendidos entre 15 nm (verde) y 7 nm (negro), y por co-precipitación (azul).

Tabla 2.4: Parámetros magnéticos de las nanoesferas de magnetita.

NP	M_S (emu/g_{Fe3O4})	M_R (emu/g_{Fe3O4})	H_C (Oe)	$T_{B\ 100\ Oe}$ (K)
$Fe_3O_{4\text{-DT-15 nm}}$	82.9	0.7	2.6	186
$Fe_3O_{4\text{-DT-7 nm}}$	74.8	0.4	3.2	142
$Fe_3O_{4\text{-COP-10 nm}}$	62.9	0.3	1.5	171

b Cubos

Con el fin de obtener MNPs con remanencia[40], se han sintetizado nanocubos de magnetita. En primer lugar, los nanocubos de magnetita se obtuvieron mediante la cristalización del precipitado hidróxido ferroso descrito por Sugimoto[41], con la modificación en las cantidades de NaOH utilizadas con el fin de generar MNPs cúbicas lo más pequeñas posibles. Este procedimiento da lugar a nanocubos sin ningún tipo de recubrimiento polimérico, estables en medio acuoso.

Para ello, 26 mM de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ se mezclan con 80 mL de agua Milli-Q y se someten a agitación mecánica (210 rpm) en atmósfera de nitrógeno. Una vez obtenida una disolución homogénea, se adicionan 10 mL de una disolución 2M de KNO_3 y 10 mL de una disolución de NaOH (en la tabla 2.5 se muestra la relación entre la cantidad de NaOH utilizada y el tamaño de NP obtenido) gota a gota, observándose un cambio de color verde a negro. Posteriormente, la reacción se calienta hasta 90 ºC durante 2 horas.

Una vez enfriada la reacción, las nanopartículas magnéticas son lavadas con agua Milli-Q y separadas magnéticamente con la ayuda de un imán de neodimio. Este proceso de lavado se realiza cinco veces. Finalmente, las nanopartículas se redispersan en agua Milli-Q.

Tabla 2.5: Relación entre la concentración de [OH^-], el tamaño y la morfología de las MNPs obtenidas por el método de cristalización de $Fe(OH)_2$.

NP	$[OH^-]_{dis}$ (mM)	$[OH^-]_{exc}$ (mM)	Morfología
$Fe_3O_{4\text{-}68\ nm}$	100	24	Cubo
$Fe_3O_{4\text{-}66\ nm}$	92	20	Cubo
$Fe_3O_{4\text{-}62\ nm}$	84	16	Cubo
$Fe_3O_{4\text{-}50\ nm}$	76	12	Cubo
$Fe_3O_{4\text{-}44\ nm}$	68	8	Cubo
$Fe_3O_{4\text{-}43\ nm}$	60	4	Cubo
$Fe_3O_{4\text{-}241\ nm}$	52	0	Esfera

Tal y como se observa en la tabla anterior, tanto la morfología como el tamaño de las NPs son fuertemente dependientes de las concentraciones de KOH presentes en la reacción. Un exceso de concentración de KOH en la reacción, favorece la formación de nanocubos. En nuestro caso, no se pudieron obtener nanocubos de tamaños inferiores a los 43 nm sin que se viese alterada la morfología y el tamaño de la NP (figura 2.7). Por este motivo, se exploró la ruta sintética de descomposición térmica, con el fin de obtener nanocubos con tamaños inferiores a 40 nm.

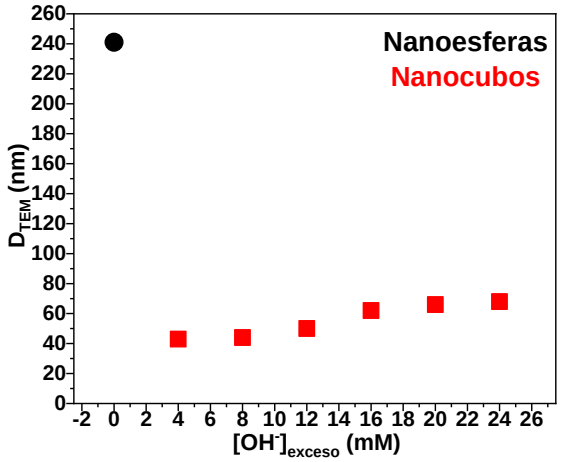


Figura 2.7: Representación gráfica de la relación entre la concentración de [OH^-] en exceso y el tamaño de las MNPs obtenidas por el método de cristalización de $Fe(OH)_2$.

Como se ha explicado anteriormente, una de las ventajas del procedimiento de descomposición térmica, es la obtención de MNPs con un alto grado de monodispersidad, parámetro importante para aplicaciones biomédicas. Mediante la modificación de diversos parámetros de esta ruta sintética, tales como la composición y concentración de los precursores del óxido de hierro, la temperatura y el tiempo de reacción o las cantidades estequiométricas entre agente precursor y agentes surfactantes, también se pueden conseguir MNPs cúbicas se diferencian de las MNPs esféricas en sus propiedades físicas y magnéticas.

Para el desarrollo de estos nanocubos, se abordaron dos diseños que se diferencian en la composición del metal precursor de la magnetita, lo que permite obtener dos tamaños distintos de NPs. En ambos diseños se empleó el método de descomposición térmica que, llevada a cabo por la presencia de tensioactivos, permite la obtención de MNPs con una distribución muy estrecha del tamaño de NP.

La síntesis para obtener nanocubos de magnetita con un tamaño aproximado de 12 nm, está basada en el procedimiento descrito por Park[38]. Previamente se prepara el oleato de hierro (III). Para ello, se disuelven 40 mmoles de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ y 120 mmoles de oleato de sodio en una mezcla de disolventes compuesta por 80 mL de etanol, 60 mL de agua y 140 mL de hexano. Bajo agitación magnética (210 rpm) y reflujo, la disolución se calienta hasta alcanzar los 70ºC y se mantiene a esta temperatura durante 4 horas. Finalizada la reacción, ésta se trasvasa a un embudo de decantación y se lava con 30 mL de agua Milli-Q tras cada separación de fase, quedando en la fase orgánica el complejo metálico formado. Este lavado se realiza tres veces (3x).

Una vez terminado el proceso de lavado, la fase orgánica se trasvasó a un vaso de precipitado y se colocó sobre una placa calefactora a 90 °C hasta evaporar todo el disolvente, como resultado se obtiene un sólido en forma de cera de color marrón oscuro.

A continuación, 3 mmoles de oleato de hierro (III) se mezclan con 1.5 mmoles de ácido oleico y se disuelven en 50 mL de TOA bajo agitación mecánica (210 rpm) y atmósfera de nitrógeno. La temperatura de la reacción se aumenta a 70 ºC y una vez alcanzada ésta, se deja reaccionar durante 30 minutos. Posteriormente la temperatura del sistema se eleva a 320 ºC a un ratio de incremento constante de 5 $ºC \cdot min^{-1}$ y se mantiene estable en ese valor durante 2 horas, tornando la disolución de un color marrón oscuro a negro intenso.

Una vez enfriada la reacción, las MNPs obtenidas se separaron del sobrenadante mediante la adición de etanol y usando un imán de neodimio. Para lavar estas nanopartículas se utiliza una mezcla etanol:hexano (proporción 3:1, respectivamente), la dispersión se agita mecánicamente y al cabo de 20 minutos, las NPs son separadas nuevamente con la ayuda de un imán. Este procedimiento se realiza cinco veces. Finalmente, los nanocubos se redispersan en ciclohexano.

Por otro lado, la obtención de los nanocubos de magnetita con un tamaño aproximado de 30 nm se basó en el procedimiento descrito por Kim[42]. Para ello, 10 mmoles de $Fe(acac)_3$ se adicionan a una mezcla de 10 mmoles de ácido 4-bifenilcarboxilico, 20 mmoles de OA y 50 mL de éter bencílico. La disolución es homogeneizada con la ayuda de agitación mecánica, a una velocidad de 420 rpm y desoxigenada durante 1h. Posteriormente, y utilizando las mismas condiciones de agitación, la temperatura se incrementa hasta los 290 ºC a un ritmo de aumento de 20 $ºC \cdot min^{-1}$ y una vez alcanzada dicha temperatura, se deja reaccionar durante 30 minutos.

Una vez enfriada la reacción, los nanocubos obtenidos se separan del sobrenadante mediante la adición de etanol y usando un imán de neodimio. Para lavar estas NPs se utiliza una mezcla etanol:hexano (proporción 3:1, respectivamente), la dispersión se agita mecánicamente y al cabo de 20 minutos, las MNPs son separadas nuevamente con la ayuda de un imán. Este procedimiento se realiza cinco veces. Finalmente, los nanocubos de magnetita se redispersan en ciclohexano.

USC

La estructura cristalina de los nanocubos de magnetita obtenidos por ambos métodos, se identificó por XRD, HRTEM y SAED.

Los difractogramas obtenidos para los nanocubos de 12, 30 y 43 nm (figura 2.8) coinciden con los de una estructura cristalina tipo espinela inversa, correspondientes a los de

magnetita (ficha JCPDS 19-0629[26]). Por otra parte, se puede observar una mayor anchura de los picos en el difractograma correspondiente a los nanocubos de 12 nm que en los restantes difractogramas. Esto se debe, fundamentalmente, a un aumento en el tamaño del cristal a medida que se incrementa el tamaño de la NP, lo que concuerda con el tamaño de cristal calculado para los nanocubos de 12, 30 y 43 nm (10.9, 28.7 y 41.7 nm, respectivamente). El cálculo del parámetro de red de estas MNPs cúbicas dio unos valores de 8.36, 8.38 y 8.38 Å para los nanocubos con diámetros de 12, 30 y 43 nm, respectivamente, corroborándose la obtención de NPs de magnetita, cuyo parámetro de red reportado, como bien se dijo anteriormente, es de 8.39 Å.

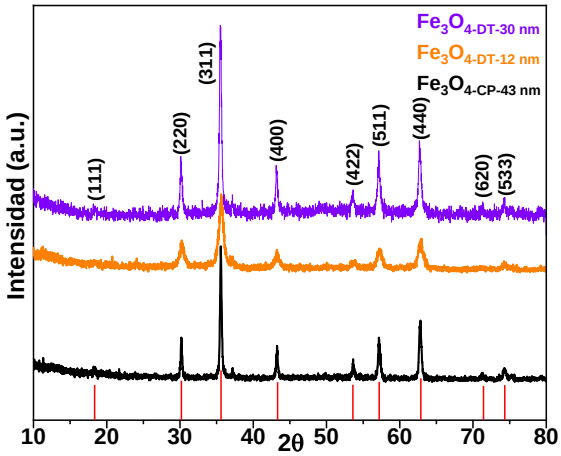


Figura 2.8: Difractograma de rayos X de las MNPs de Fe_3O_4 cúbicas sintetizadas por cristalización del precipitado $Fe(OH)_2$ (negro) y por descomposición térmica de diámetros comprendidos entre 12 nm (naranja) y 30 nm (violeta), comparado con las reflexiones principales de la magnetita determinadas teóricamente.

En la figura 2.9 se muestran tanto el patrón de difracción SAED como las imágenes de HRTEM de los nanocubos de magnetita de tamaños 12, 30 y 43 nm. En todas las micrografías de HRTEM se observan los planos cristalinos cuyo espaciado interplanar promedio (0.20 nm) corresponde al interespaciado del plano cristalino (400) consistente con la estructura cristalina tipo espinela inversa de magnetita[26]. Tal y como se observaba en las MNPs esféricas, los planos son más definidos en las MNPs sintetizadas por descomposición térmica, y su morfología cúbica tiene un mayor grado de control.

Mediante el análisis de los patrones de difracción SAED, se corroboró las distancias interplanares promedio medidas (4.89, 3.01, 2.57, 2.10, 1.71, 1.60, 1.47, 1.33 y 1.26 Å), se corresponden con los planos cristalinos (111), (220), (311), (400), (422), (511), (440), (620) y (533), respectivamente, asociados a la estructura tipo espinela inversa de la magnetita[32].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

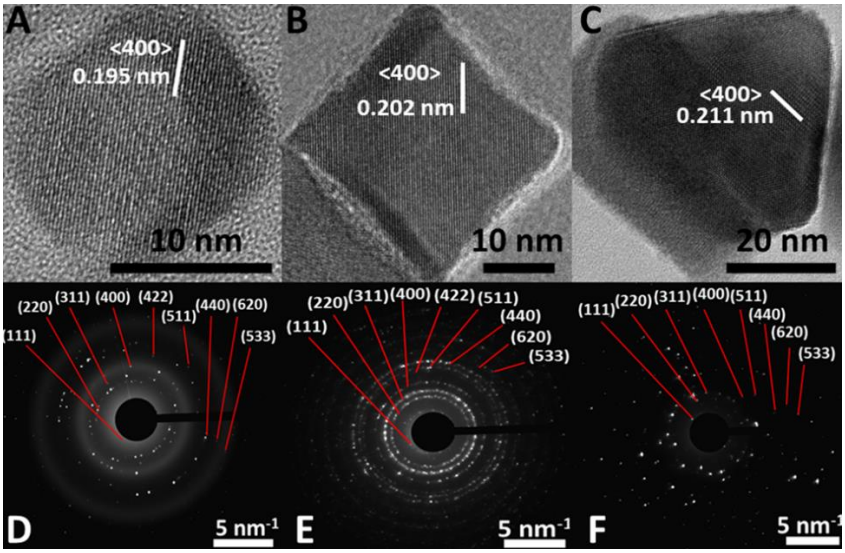


Figura 2.9: Micrografías de HRTEM y sus respectivos patrones de difracción SAED de los nanocubos sintetizados por descomposición térmica, de diámetros comprendidos entre 12 nm (A y D) y 30 nm (B y E) y por cristalización del precipitado $Fe(OH)_2$ (C y F).

En la figura 2.10, se representan las micrografías de TEM de las MNPs cúbicas y los respectivos histogramas de distribución de tamaños. Todas las micrografías muestran NPs con una morfología cúbica bien definida, especialmente en las sintetizadas por el método de descomposición térmica. A medida que se disminuye el tamaño, los nanocubos resultantes ganan uniformidad en tamaño y forma.

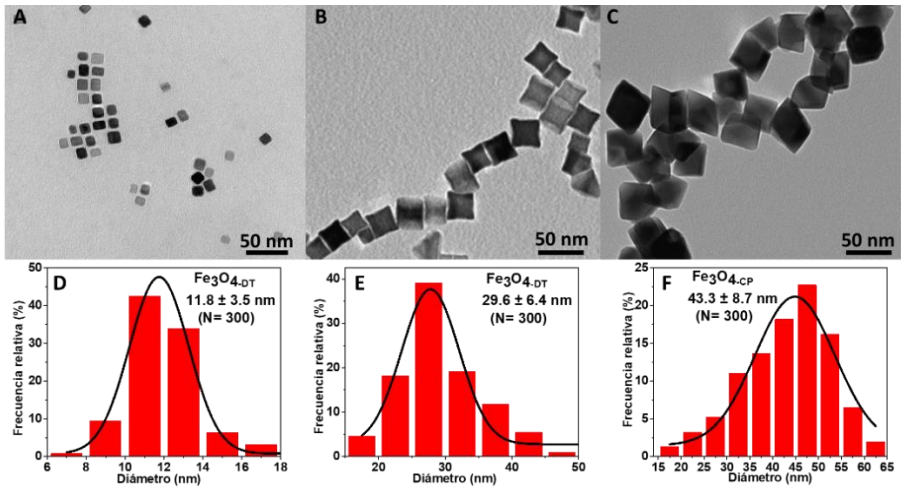


Figura 2.10: Micrografías TEM e histogramas de la distribución estadística de tamaños de los nanocubos sintetizados por descomposición térmica, de diámetros comprendidos entre 12 nm (A y D) y 30 nm (B y E) y por cristalización del precipitado $Fe(OH)_2$ (C y F).

Posteriormente para adecuar la estabilidad coloidal de los nanocubos de magnetita a aplicaciones biomédicas en medios acuosos, las MNPs sintetizadas por descomposición térmica se funcionalizaron con PAA para hacerlas hidrofílicas. Para llevar a cabo la transferencia de estas MNPs a medio acuoso se siguió el mismo procedimiento de transferencia de fase utilizado para las nanoesferas de magnetita sintetizadas por descomposición térmica.

En la figura 2.11 se muestran las distribuciones estadísticas de los tamaños hidrodinámicos de los nanocubos de magnetita, dichas distribuciones presentan un pico único y definido correspondiente a una única población. Los D_h promedios experimentan un incremento de 6, 20 y 23 nm en comparación con los diámetros promedios de TEM de 12, 30 y 43 nm, respectivamente. Este incremento de tamaño es inferior en los nanocubos de menor tamaño, que está relacionado con el comportamiento de los polímeros en disolución. Sin embargo, a medida que aumenta el tamaño de las MNPs, el comportamiento ferromagnético es más notorio, provocando la agregación de éstas. Este efecto se justifica con el valor de PDI cerca 0.4 obtenido para los nanocubos de 43 nm, valor correlacionado con una agregación moderada de las NPs en medio acuoso.

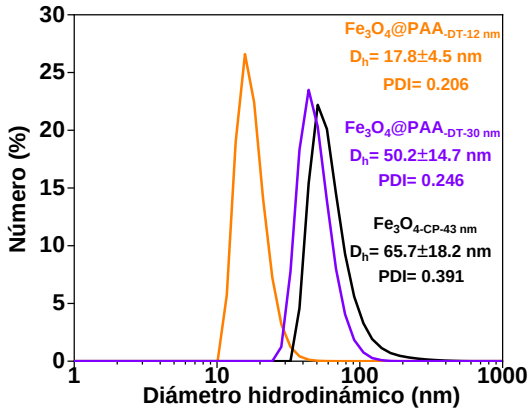


Figura 2.11: Distribuciones estadísticas del tamaño hidrodinámico de las MNPs sintetizadas por descomposición térmica, de diámetros TEM comprendidos entre 12 nm (naranja) y 30 nm (violeta) y por cristalización del precipitado $Fe(OH)_2$ (negro).

Finalmente, las propiedades magnéticas obtenidas mediante el uso de un magnetómetro VSM ponen en manifiesto el carácter ferromagnético de todos los nanocubos magnéticos tal y como demuestra la presencia de campo coercitivo en los ciclos de histéresis (figura 2.12, A), que aumenta a medida que aumenta el tamaño de los nanocubos (tabla 2.6). Esto es debido a que, a medida que el tamaño de partícula se aproxima al tamaño crítico de transición entre un estado superparamagnético y ferromagnético, las MNPs presentarán mayor histéresis y remanencia[43]. Sin embargo, factores como la composición, morfología o cristalinidad pueden modificar esta tendencia.

Además, el comportamiento ferromagnético presentado en estas MNPs, se corroboró por la determinación de la temperatura de bloqueo (T_B) mediante la obtención de las curvas de susceptibilidad magnética ZFC/FC (figura 2.12, B). En donde se observa que la T_B de todas las MNPs se encuentra por encima de la temperatura ambiente, lo cual implica un comportamiento ferromagnético a esa temperatura.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

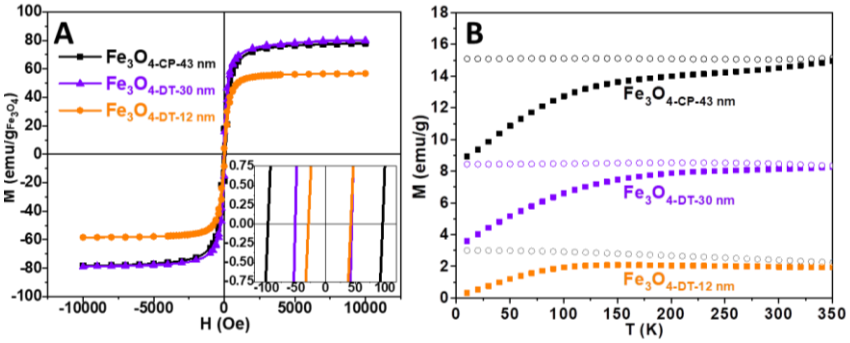


Figura 2.12: Ciclos de histéresis a 300 K (A) y curvas de magnetización en función de la temperatura (B) de las MNPs sintetizadas por descomposición térmica, de diámetros TEM comprendidos entre 12 nm (naranja) y 30 nm (violeta) y por cristalización del precipitado $Fe(OH)_2$ (negro).

Tabla 2.6: Parámetros magnéticos de las nanoesferas de magnetita.

NP	M_S (emu/g_{Fe3O4})	M_R (emu/g_{Fe3O4})	H_C (Oe)	$T_{B\ 100\ Oe}$ (K)
$Fe_3O_{4\text{-DT-12 nm}}$	58.3	6.4	35.7	>300
$Fe_3O_{4\text{-DT-30 nm}}$	79.9	15.5	47.5	>300
$Fe_3O_{4\text{-CP-43 nm}}$	78.6	19.1	97.1	>300

c Esferas huecas

En este apartado, se describen la síntesis y caracterización de nanoesferas huecas estables en medio acuoso, desarrollados para ser usadas potencialmente como agentes de contraste negativos, con capacidad para encapsulamiento de fármacos. Primeramente, estas MNPs se obtuvieron por el método solvotermal descrito por Lin[44], basado en la maduración de Ostwald. Mediante este procedimiento, se obtuvieron nanoesferas huecas de tres tamaños diferentes. Estos tamaños se consiguieron al variar la sal de amonio en la reacción (en la tabla 2.7 se muestra la relación entre la sal de amonio utilizada y el tamaño de NP resultante).

Tabla 2.7: Relación entre la sal de amonio y el tamaño de las MNPs obtenidas por el método solvotermal

NP	Sal de amonio	Morfología
$Fe_3O_{4\text{-81 nm}}$	NH_4HCO_3	Esfera irregular/poco porosa
$Fe_3O_{4\text{-551 nm}}$	DA	Esfera hueca/ muy porosa
$Fe_3O_{4\text{-130 nm}}$	DDA	Esfera hueca/ muy porosa

Para ello, 6 mmoles de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ y 6 mmoles de la sal de amonio seleccionada se disuelven en 30 mL de EG bajo agitación magnética (210 rpm) hasta obtener una disolución homogénea. Posteriormente, la mezcla se trasvasa a un recipiente de teflón y se introduce en un autoclave de acero inoxidable de 45 mL de capacidad, la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 200°C durante 12 h.

Finalizada la síntesis, el reactor se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Las nanoesferas huecas magnéticas obtenidas, se separan del medio de reacción con la ayuda de un imán de neodimio y posteriormente se llevan a cabo cinco lavados con agua Milli-Q. Finalmente, las NPs se redispersan en agua Milli-Q.

Como se observa en la tabla 2.7, tanto la morfología como el tamaño de las nanoesferas huecas obtenidas por este método, depende de la sal de amonio utilizada. Durante el proceso de síntesis, esta sal se hidroliza formando hidróxido amónico que, a su vez, consecuencia de la

temperatura en la que se lleva a cabo la reacción, genera burbujas que actúan como centro de nucleación de las NPs formadas[44]. Sin embargo, mediante este método no se pueden conseguir tamaños de nanoesferas inferiores a los 80 nm de diámetro ni tampoco controlar la morfología hueca requerida. Por este motivo, se recurrió al método de descomposición térmica para obtener nanoesferas huecas más pequeñas con un mayor control tanto de su tamaño como de su morfología.

La síntesis de nanoesferas huecas magnéticas pequeñas (13 nm) se basa en el procedimiento descrito por Peng[45]. Estas NPs se obtuvieron por la oxidación controlada del núcleo de hierro de las nanoestructuras de tipo core@shell ($Fe@Fe_3O_4$), previamente sintetizadas y cuyo procedimiento se describe a continuación.

En un matraz redondo de tres bocas, se adicionan 9.12 mmoles de OLA en 200 mL de ODE y se agita mecánicamente a 400 rpm en atmósfera inerte a 120 ºC durante 1 h para eliminar el oxígeno presente en la reacción. Una vez transcurrido este tiempo, la temperatura de la reacción se incrementa hasta los 180 ºC y una vez alcanzada esta temperatura, se adicionan a la mezcla rápidamente 53.2 mmoles de $Fe(CO)_5$ y se mantiene el sistema en estas condiciones durante 40 min.

Una vez enfriada la síntesis, se adicionan 30 mL de etanol para precipitar a las nanoestructuras formadas y con la ayuda de un imán de neodimio, se separan del medio de reacción. Para el proceso de lavado, se utiliza una mezcla etanol:hexano (proporción 3:1, respectivamente), la dispersión se agita mecánicamente y al cabo de 20 minutos, las MNPs obtenidas son separadas nuevamente con la ayuda de un imán. Este procedimiento se realiza cinco veces. Finalmente, las NPs de $Fe@Fe_3O_4$ se redispersan en hexano.

A continuación, se procede a la oxidación del núcleo de estas NPs core@shell para la obtención de las nanoesferas huecas. Para ello, 5.33 mmoles de TMAO se disuelven en 200 mL de ODE mediante agitación mecánica (210 rpm) y bajo atmósfera de nitrógeno durante 30 minutos. A continuación, la temperatura de la reacción se incrementa hasta los 130 ºC y se mantiene en estas condiciones durante 1 h. Posteriormente, con la ayuda de una jeringa, se adicionan 6.25 mL de nanopartículas de $Fe@Fe_3O_4$ (800 mg, resuspendidas en hexano) y se deja reaccionar 2 horas para eliminar todo el hexano procedente de las nanopartículas. Finalmente, la temperatura se incrementa hasta los 210 ºC y una vez alcanzada dicha temperatura, se deja reaccionar durante 4 horas.

Una vez enfriada la reacción, se adicionan 30 mL de etanol para precipitar a las nanopartículas y con la ayuda de un imán de neodimio, se separan del medio de reacción. Para lavar estas nanopartículas se utiliza una mezcla etanol:hexano (proporción 3:1, respectivamente), la dispersión se agita mecánicamente y al cabo de 20 minutos, las nanopartículas son separadas nuevamente con un imán. Este procedimiento se realiza cinco veces. Finalmente, las nanoesferas huecas de magnetita se redispersan en hexano.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La estructura cristalina de las nanoesferas huecas de magnetita obtenidos por ambos métodos, se identificó por XRD, HRTEM y SAED.

Como se ve en los difractogramas obtenidos para las nanoesferas huecas de 13, 81, 130 y 551 nm (figura 2.13) aparecen picos de difracción que se corresponden con los de la magnetita con estructura cristalina tipo espinela inversa (ficha JCPDS 19-0629[26]) marcados de color rojo en el difractograma. Además, el parámetro de red calculado para todas las nanoesferas corrobora la obtención de NPs de magnetita, dando valores de parámetro de red cercanos al reportado teóricamente (8.39 Å), 8.43 Å para las nanoesferas huecas de 13 nm y alrededor de 8.39 Å para las demás nanoesferas huecas obtenidas.

Adicionalmente, se hallaron los tamaños de cristal para las nanoesferas huecas con diámetros inferiores a los 100 nm, ya que la ecuación de Scherrer, utilizada para calcular el tamaño de cristal, no puede aplicarse a partículas grandes, D> 100 nm[46]. Por ello, se obtuvo solamente el tamaño cristalino para las nanoesferas huecas de 13 nm y 81 nm, obteniendo tamaños de cristal de 4.65 y 46.34 nm, respectivamente. Estos valores difieren del diámetro de las NP obtenidas mediante TEM, pues corresponden a los pequeños cristales que conforman la cubierta de magnetita.

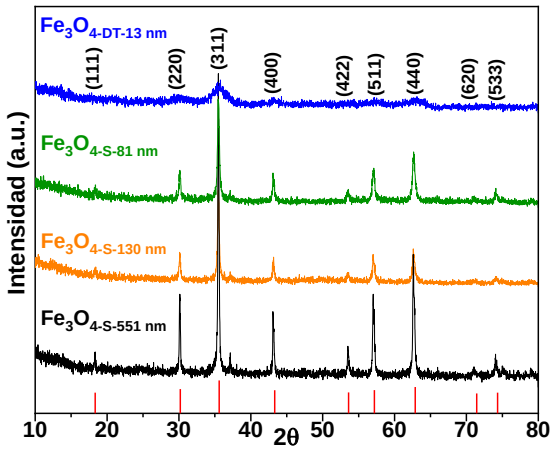


Figura 2.13: Difractograma de rayos X de las nanoesferas de magnetita huecas sintetizadas por descomposición térmica (azul) y por solvotermal de diámetros comprendidos entre 81 nm (verde), 130 (naranja) y 551 nm (negro), comparado con las reflexiones principales de la magnetita determinadas teóricamente.

Además, el análisis estructural se ha completado con medidas de HRTEM y SAED con el fin de determinar el grado de cristalinidad de las MNPs sintetizadas (figura 2.8).

En todas las micrografías de HRTEM de las nanoesferas huecas de 13 y 130 nm se pueden observar los planos cristalinos cuyo especiado interplanar (de aproximadamente 0.20 nm) corresponde al interespaciado del plano cristalino (400) consistente con la estructura cristalina tipo espinela inversa de magnetita[26]. Dichos planos son más visibles en las nanoesferas huecas de 130 nm en comparación con las de 13 nm, lo que confirma que, las nanoesferas grandes poseen mejor cristalinidad que la sintetizadas por descomposición térmica.

Por otra parte, las reflexiones halladas en los patrones de difracción SAED coinciden con los picos de difracción observados en el análisis de XRD, lo que confirma la naturaleza cristalina de las MNPs. Dichas reflexiones encontradas en el análisis SAED están determinadas por anillos concéntricos cuyas distancias interplanares promedio de 4.82, 2.94, 2.52, 2.09, 1.69, 1.60, 1.47, 1.31 y 1.28 Å se corresponden con los planos cristalinos (111), (220), (311), (400),

(422), (511), (440), (620) y (533), respectivamente, asociados a la estructura tipo espinela inversa de la magnetita[32].

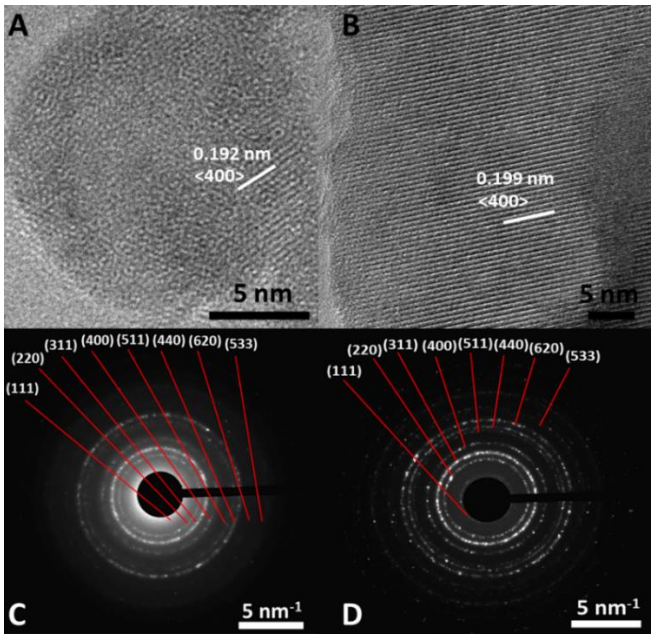
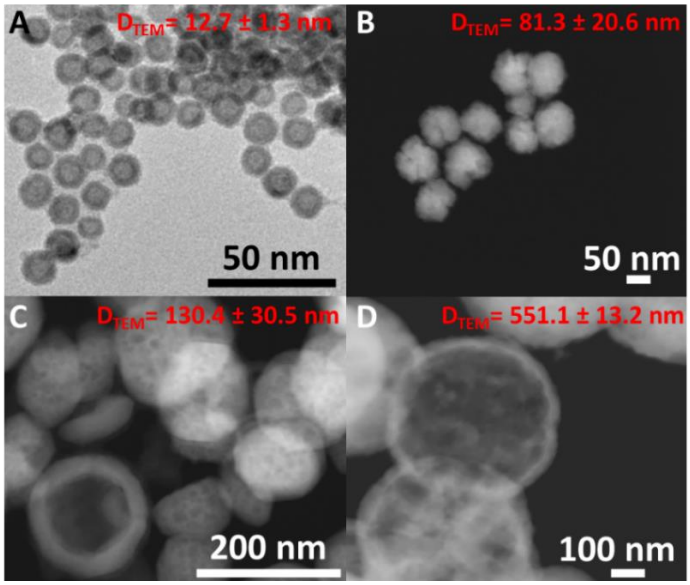


Figura 2.14: Micrografías de HRTEM y sus respectivos patrones de difracción SAED de Las nanoesferas huecas sintetizadas por descomposición térmica (A y C) y por solvotermal (B y D).

Como se observa en la figura 2.15, la micrografía TEM de las nanoesferas huecas sintetizadas por descomposición térmica (figura 2.15, A) consiste en NPs muy uniformes en tamaño y forma, con una cierta separación entre ellas por el recubrimiento de las moléculas del surfactante OLA. Sin embargo, en todas las micrografías STEM de las nanoesferas huecas sintetizadas por el método solvotermal, se muestran NPs relativamente esféricas, con cierta irregularidad en cuanto al tamaño y defectos en la estructura de la cubierta.



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 2.15: Micrografías TEM y STEM de las nanoesferas huecas sintetizadas por descomposición térmica (A) y solvotermal de tamaños comprendidos entre 81 nm (B), 130 nm (C) y 551 nm (D).

Para hacer adecuada la estabilidad coloidal de las nanoesferas huecas magnéticas para su uso en aplicaciones biomédicas en medio acuoso, la MNP sintetizada por descomposición térmica se funcionalizó con PAA con el propósito de dotarlas de una superficie hidrofílica, siguiendo el proceso ya descrito en secciones precedentes.

En la figura 2.16 se muestran las distribuciones estadísticas de los tamaños hidrodinámicos de las nanoesferas huecas, dichas distribuciones presentan un único pico mostrando una única población.

Los D_h promedios varían en 21, 310, 292 y 405 nm en comparación con los diámetros promedios de TEM de 13, 81, 130 y 551 nm, respectivamente. Este incremento de tamaño es inferior en las nanoesferas huecas de menor tamaño, que está relacionado con el comportamiento de los polímeros en disolución. Sin embargo, como ocurría en los nanocubos, a medida que aumenta el tamaño de las MNPs, el comportamiento ferromagnético es más notorio y al ningún tipo de recubrimiento polimérico, éstas comienzan a agregarse. Este efecto se justifica con el valor de PDI comprendido entre 0.3-0.5 valor correlacionado con una agregación moderada-alta de las NPs en medio acuoso.

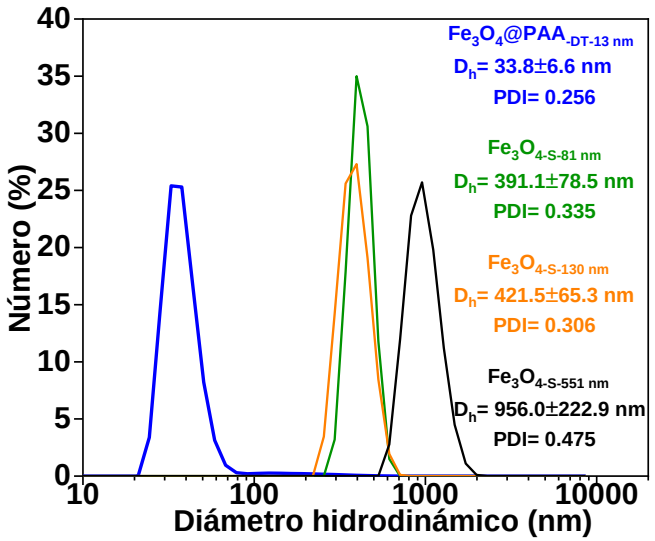


Figura 2.16: Distribuciones estadísticas del tamaño hidrodinámico de las MNPs sintetizadas por descomposición térmica de 13 nm de diámetro TEM (azul) y solvotermal, de diámetros TEM comprendidos entre 81 nm (verde), 130 nm (naranja) y 551 nm (negro).

Por último, en la figura 2.17 se muestra la caracterización magnética de todas las nanoesferas huecas obtenidas. Los ciclos de histéresis obtenidos mediante VSM (figura 2.17, A) ponen de manifiesto el carácter ferromagnético de todas las nanoesferas huecas de tamaños superiores a los 80 nm, con presencia de histéresis y coercitividad, mientras que las más pequeñas (de 13 nm de diámetro), presentan una baja coercitividad y remanencia casi nula, correspondiente a un carácter superparamagnético de NPs, debajo del tamaño crítico. Estos resultados se corroboraron mediante la determinación de la T_B obtenida de las curvas de susceptibilidad magnética ZFC/FC (figura 2.17, B). En la tabla 2.8, se muestran los resultados de todas las medidas magnéticas llevadas a cabo.

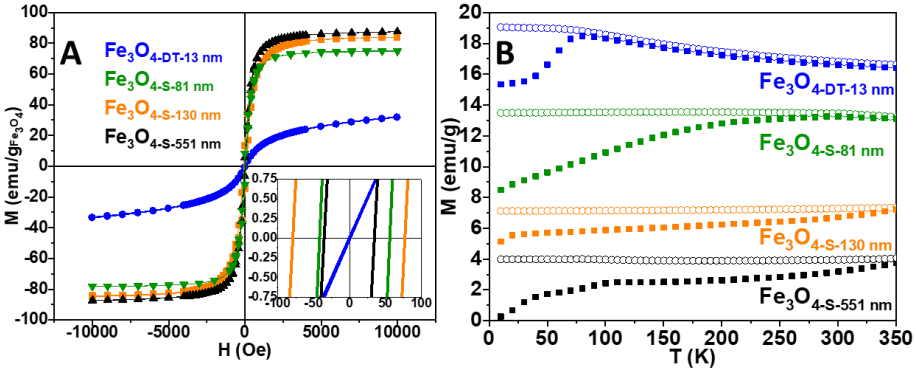


Figura 2.17: Ciclos de histéresis a 300 K (A) y curvas de magnetización en función de la temperatura (B) de las MNPs sintetizadas por descomposición térmica de 13 nm de diámetro (azul) y solvotermal, de diámetros comprendidos entre 81 nm (verde), 130 nm (naranja) y 551 nm (negro).

Tabla 2.7: Parámetros magnéticos de las nanoesferas de magnetita.

NP	M_S (emu/g_{Fe3O4})	M_R (emu/g_{Fe3O4})	H_C (Oe)	$T_{B\ 100\ Oe}$ (K)
$Fe_3O_{4\text{-DT-13 nm}}$	33.4	0.1	0.4	81
$Fe_3O_{4\text{-S-81 nm}}$	75.1	10.3	49.2	>300
$Fe_3O_{4\text{-S-130 nm}}$	84.6	14.2	77.5	>300
$Fe_3O_{4\text{-S-551 nm}}$	87.3	7.2	35.1	>300

2.1.2 Fe_5C_2

Se sintetizaron NPs de carburo de hierro, Fe_5C_2, de interés en aplicaciones por poseer una magnetización de saturación más elevada que la magnetita en masivo (M_s= 92 emu/g)[36] incluso en NPs con tamaños inferiores a los 20 nm. Esta propiedad magnética, las hace sumamente atractivas para aplicaciones en biomedicina, principalmente en MRI (como agentes de contraste negativos) o para aislamiento tanto celular como de material biológico[47].

La obtención de estas nanoesferas magnéticas se basó en el procedimiento de descomposición térmica[38,48], similar al utilizado para la obtención de los nanocubos de 12 nm.

Para la preparación del precursor de oleato, se disuelven 1 mmol de $NdCl_3 \cdot 6H_2O$, 14 mmoles de $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 10 mmoles de BCl_3 y 51 mmoles de oleato de sodio en una mezcla de disolventes compuesto por 60 mL de agua Milli-Q, 80 mL etanol y 140 mL de hexano bajo agitación magnética (210 rpm), atmósfera de nitrógeno y condiciones de reflujo. La solución resultante se calienta hasta alcanzar los 70 ºC y se mantiene a esta temperatura durante 4 horas.

Finalizada la reacción, ésta se trasvasa a un embudo de decantación y se lava con 30 mL de agua Milli-Q tras cada separación de fase, quedando en la fase orgánica el complejo metálico formado. Este lavado se realiza tres veces.

Una vez terminado el proceso de lavado, la fase orgánica se trasvasó a un vaso de precipitado y se colocó sobre una placa calefactora a 90 °C hasta evaporar todo el disolvente, como resultado se obtiene un sólido en forma de cera de color marrón oscuro.

A continuación, 6 moles de oleato de NdFeB se mezclan con 2 moles de ácido oleico y se disuelven en 100 mL de TOA bajo agitación mecánica (210 rpm) y atmósfera de nitrógeno. La temperatura de la reacción se aumenta a 60 ºC y una vez alcanzada ésta, se deja reaccionar durante 30 minutos. Posteriormente, la temperatura del sistema se eleva a 360 ºC a un ratio de incremento constante de 3 ºC·min^{-1} y se mantiene estable en ese valor durante 29 horas.

Una vez enfriada la reacción, las MNPs obtenidas se separaron del sobrenadante mediante la adición de etanol y usando un imán de neodimio. Para lavar estas nanoestructuras magnéticas obtenidas, se utiliza una mezcla etanol:hexano (proporción 3:1, respectivamente), la dispersión se agita mecánicamente y al cabo de 20 minutos, estas nanoestructuras magnéticas son separadas nuevamente con la ayuda de un imán. Este procedimiento se realiza cinco veces. Finalmente, las NPs de Fe_5C_2@C se redispersan en ciclohexano.

Asimismo, una vez obtenidas estas nanoesferas de carburo de hierro se procedió a la caracterización fisicoquímica de dicho nanomaterial. En primer lugar, se caracterizó su composición estructural mediante XRD y HRTEM.

El difractograma de las nanoesferas de carburo de hierro (figura 2.18, A) muestra la presencia de los picos característicos de la estructura de carburo de hierro cristalino correspondiente a la fase monoclínica de Fe_5C_2 (ficha JCPDS 36-1248, patrón rojo)[49], con una pequeña contribución de las principales reflexiones pertenecientes a la fase cristalina de magnetita[26] (patrón azul), que puede ser asociado a una oxidación parcial de hierro durante la formación del núcleo magnético.

Por su parte, en la micrografía HRTEM (figura 2.18, B) se puede observar que la cristalinidad de estas nanoestructuras se encuentra en el núcleo, siendo la coraza de carbono una estructura amorfa. Los planos cristalinos hallados dentro del núcleo, poseen un espaciado interplanar de 0.506 nm que corresponde al interespaciado del plano cristalino (510) consistente con la estructura cristalina de la fase monoclínica del carburo de hierro[49].

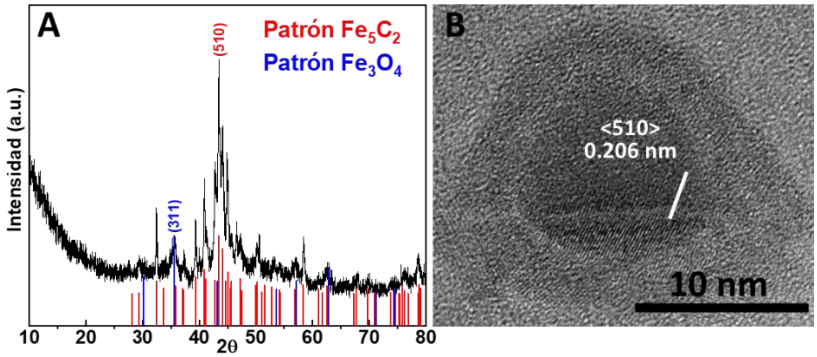


Figura 2.18: Difractograma de rayos X (A) de las nanoesferas de Fe_5C_2 comparado con las reflexiones del carburo de hierro y de la magnetita determinadas teóricamente y su respectiva micrografía HRTEM (B).

Por otra parte, el análisis del espectro general de XPS (figura 2.19, imagen A) ha permitido determinar la composición elemental superficial (en porcentaje atómico) de las nanoesferas de carburo de hierro obtenidas. La composición que refleja el espectro general comprende contribuciones de los compuestos Fe, O y C, con porcentajes atómicos de 3.87 %, 28.02 % y 56.66 %, respectivamente. Los restantes porcentajes atómicos encontrados (N, Si y Ge)

proceden del sustrato utilizado donde se encuentra depositada la muestra (silicon wafer) compuesto por silicona dopada con germanio y nitrógeno.

Para obtener información de las posibles fases de hierro que integran estas partículas (óxidos de hierro, carburo de hierro, se estudiaron sus espectros XPS. En el espectro correspondiente al C1s (imagen B) se observan tres contribuciones, la primera de ellas situada a 283 eV, correspondiente a la señal asociada al enlace Fe-C de carburo de hierro (Fe_5C_2)[50], siendo esta la de menor intensidad, debido a la gran cantidad de materia orgánica e inorgánica que las recubre. La siguiente contribución observada, se encuentra a una energía de enlace de 285 eV asociada a los grupos C-C y C-H de la cubierta de carbono funcionalizada con ácido oleico presentes en la superficie y que recubren a las nanoesferas. Finalmente, asociado a este surfactante, se encuentra la contribución situada a 289 eV asociada a los grupos C=O pertenecientes al surfactante OA[51].

Por otra parte, en la imagen C de la misma figura, se observa el espectro XPS de Fe2p, donde las contribuciones situadas a 707eV y 720 eV son atribuidas a los enlaces Fe-C[52], lo que corrobora la obtención de las MNPs de carburo de hierro por esta ruta sintética. Adicionalmente, se observan dos contribuciones localizadas a 711eV y 724 eV que son asignadas a la presencia de magnetita[53], coexistiendo con esta fase de carburo de hierro. La presencia de magnetita (procedente de la oxidación parcial del hierro en el proceso de síntesis) también fue corroborada por la contribución situada a 530 eV, correspondiente a los enlaces Fe-O encontrados en el espectro XPS de O1s (figura 2.18, figura D). La composición de estas partículas, integra no solo Fe_5C_2 sino también inclusiones de magnetita.

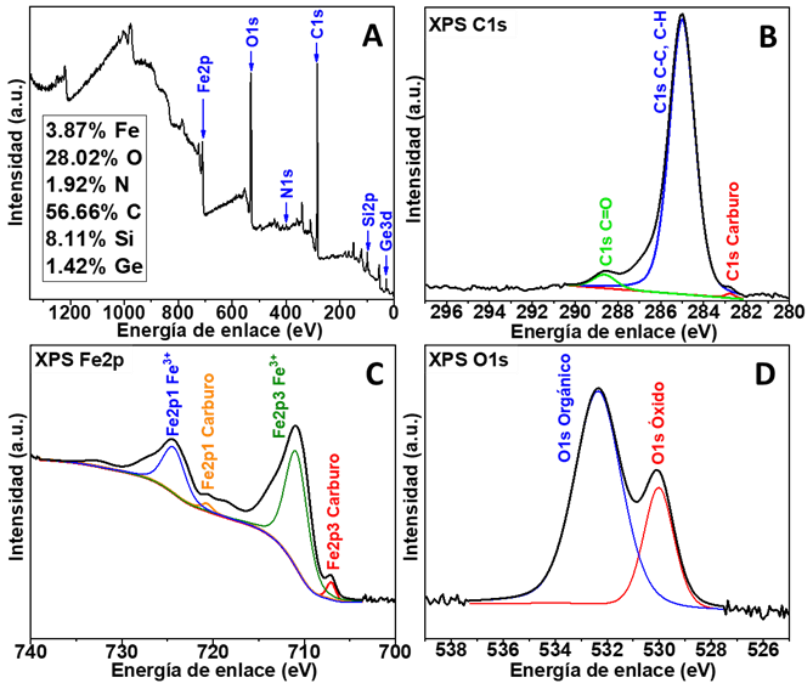


Figura 2.18: Espectro general XPS (A) y los detallados: carbono (B), hierro (C) y oxígeno (D) de las nanoesferas de F_5C_2 obtenidas por descomposición térmica.

El tamaño y morfología fue analizado mediante el uso de TEM (figura 2.19). En dicha figura, se puede observar que las nanoesferas presentan una estructura esférica, de un solo

núcleo magnético, y recubiertas en su totalidad por una capa de carbono. A mayores, se observa que estas MNPs poseen un nivel bajo de agregación.

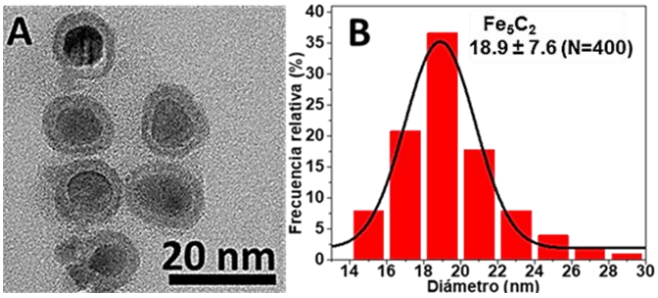


Figura 2.19: Micrografía TEM (A) e histograma de la distribución estadística (B) de las nanoesferas de F_5C_2.

Para asegurar la estabilidad coloidal en medio acuoso de las nanoesferas de carburo de hierro sintetizadas por descomposición térmica, se procedió a recubrir la superficie con PAA con el propósito de dotarlas con una superficie hidrofílica. Para llevar a cabo la transferencia a medio acuoso se siguió el mismo procedimiento de transferencia de fase descrito en secciones precedentes.

En la figura 2.20 se muestra la distribución estadística de tamaño hidrodinámico de las NPs carburo de hierro funcionalizadas con PAA, con un D_h promedio de 54.7 nm y un valor de PDI en torno de los 0.2, lo que indica ausencia de agregados.

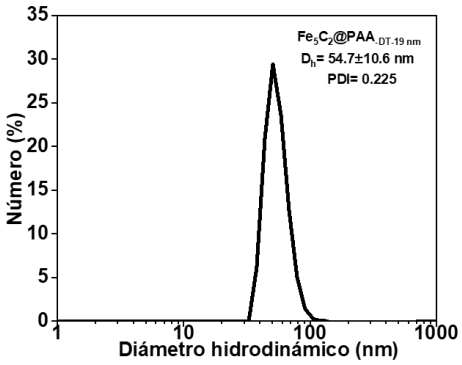


Figura 2.20: Distribución estadística de tamaño hidrodinámico de las nanoesferas de Fe_5C_2 sintetizadas por descomposición térmica de 19 nm de diámetro TEM.

Para finalizar con las caracterizaciones fisicoquímicas, se evaluó el comportamiento magnético mediante medidas de VSM y de susceptibilidad magnética ZFC/FC, cuyos resultados se muestran en la figura 2.21 y en la tabla 2.8.

Estas MNPs muestran un comportamiento ferromagnético a temperatura ambiente (figura 2.21, A), como indican los valores no nulos del campo coercitivo y la remanencia que se observan en las curvas de magnetización (H_C = 283.75 Oe, M_R=23.5 emu/g). Además, teniendo en cuenta el valor de la magnetización de saturación del carburo de hierro (M_S=140 emu/g) y la magnetita (M_S=92 emu/g), masivos[54] y dado el valor de la magnetización de saturación, normalizada con respecto a su masa magnética (mat.magnt.), de las NPs (M_S=119.3 emu/g) se interfiere que la proporción de carburo de hierro en la fase magnética es mayor que la de magnetita.

Además, los estudios de magnetización a bajas temperaturas, muestran en las curvas ZFC/FC que la temperatura de bloqueo, T_B, no se alcanza el rango estudiado (figura 2.21, B). Este hecho, indica que las NPs están bloqueadas a temperatura ambiente, lo que coincide con los valores de H_C y M_R obtenidos en la magnetización a T_{room}.

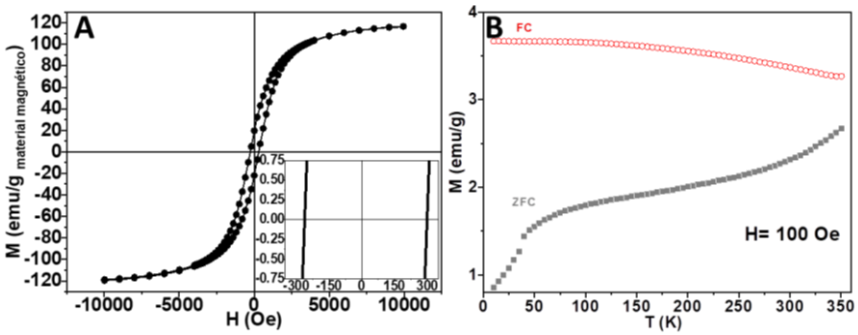


Figura 2.21: Ciclo de histéresis a 300 K (A) y curvas de magnetización en función de la temperatura (B) de las nanoesferas de carburo de hierro.

Tabla 2.8: Parámetros magnéticos de las nanoesferas de carburo de hierro.

NP	M_S (emu/$g_{mat.magn}$)	M_R (emu/$g_{mat.magn}$)	H_C (Oe)	$T_{B\ 100\ Oe}$ (K)
$Fe_5C_{2\text{-DT-19 nm}}$	119.3	23.5	283.8	>300

2.1.3 Mn_3O_4

Otro material magnético de interés en aplicaciones biomédicas es el óxido de manganeso, pues las NPs de óxido de manganeso, Mn_3O_4 con carácter paramagnético y cuya respuesta como agentes de contraste para imágenes de resonancia magnética en modo T_1 es muy eficiente[55].

La síntesis de NPs de Mn_3O_4 se llevó a cabo siguiendo el procedimiento solvotermal descrito por Zhao[56], que conlleva dos procesos: primero, la preparación del precursor metálico, estearato de manganeso (II) ($Mn(SA)_2$), seguido de la hidrólisis de éste para la obtención de las MNPs de Mn_3O_4.

Para la preparación del precursor $Mn(SA)_2$, 6.34 mmoles de NA(SA) se disuelven en 60 mL de agua Milli-Q, bajo agitación magnética (210 rpm) y atmósfera de nitrógeno, y se calienta a 90 ºC durante 30 minutos en condiciones de reflujo. A continuación, una disolución que contiene 2.02 mmoles de $MnCl_2{\cdot}4H_2O$ disueltos en 20 mL de agua Milli-Q, se introduce a la mezcla y en esta, de forma inmediata, se observa un precipitado blanco que corresponde a la formación del $Mn(SA)_2$. La reacción se deja 20 minutos bajo las mismas condiciones anteriores descritas.

Una vez la reacción alcanza temperatura ambiente, el precipitado blanco se separa de la síntesis mediante centrifugación (3000 rpm, 20 min), desechando el sobrenadante. Posteriormente, el precipitado se mezcla con agua Milli-Q desoxigenada caliente (alrededor de 60 ºC) y se repite la separación del $Mn(SA)_2$ por centrifugación. Este proceso de lavado se repite 4 veces más. Finalmente, el $Mn(SA)_2$ obtenido se deja secar en un horno a 60 ºC durante 16 horas.

Una vez obtenido el precursor metálico, se procede a la síntesis de las NPs de Mn_3O_4. Para ello, 0.3 mmoles de $Mn(SA)_2$ se mezclan con 2.70 mmoles de dodecilamina y 5 mL de tolueno bajo agitación magnética (210 rpm). A continuación, esta disolución se calienta hasta los 90 ºC para conseguir una disolución homogénea de color marrón-amarillo. Tras conseguir la homogeneización de la mezcla, esta se deja enfriar hasta temperatura ambiente.

Posteriormente, en un recipiente de teflón se adicionan una disolución que contiene 3.91 mmoles de terc-butilamina en 15 mL de agua Milli-Q, seguidamente de la disolución orgánica que contiene el $Mn(SA)_2$, obteniéndose una solución de dos fases. Esta mezcla se introduce en una autoclave de acero inoxidable de 45 mL de capacidad y la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 180°C por un periodo de 4 h.

Finalizada la síntesis, el reactor se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Las NPs obtenidas se separan del sobrenadante con ayuda de una centrifuga (7000 rpm, 20 min) y el precipitado se lava con acetona seis veces, seguido de cuatro lavados subsecuentes con ciclohexano. Finalmente, las nanoesferas de óxido de manganeso se redispersan en ciclohexano.

Las nanoesferas de óxido de manganeso, muestran un patrón de difracción, determinado por XRD, que se corresponde con la fase cristalina hausmanita, Mn_3O_4 (JCPDS 16-0154)[57], de estructura tetragonal. Hay que señalar que, en el difractograma no se encontraron picos adicionales pertenecientes a otras fases secundarias (figura 2.22).

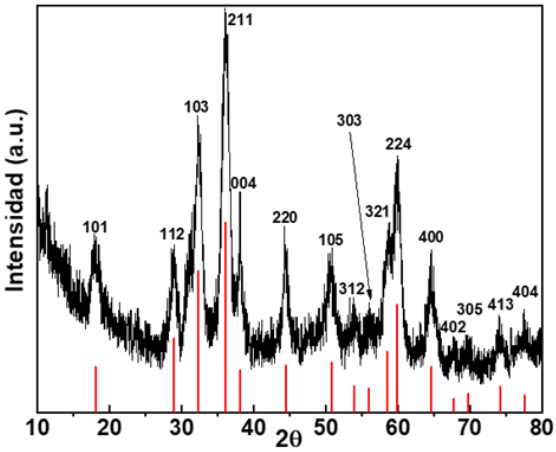


Figura 2.22: Difractograma de rayos X de las nanoesferas de óxido de manganeso comparado con las reflexiones principales de la hausmanita, Mn_3O_4, determinado teóricamente.

La caracterización morfológica realizada, mediante las imágenes obtenidas por TEM, muestra NPs con una morfología esférica, tal y como se observa en la micrografía de la figura 2.23. El cálculo de la distribución de tamaños muestra que el tamaño promedio de las partículas es pequeño, (D=7.9 nm) y el conjunto presenta una dispersión de tamaños baja (σ=±1.3 nm).

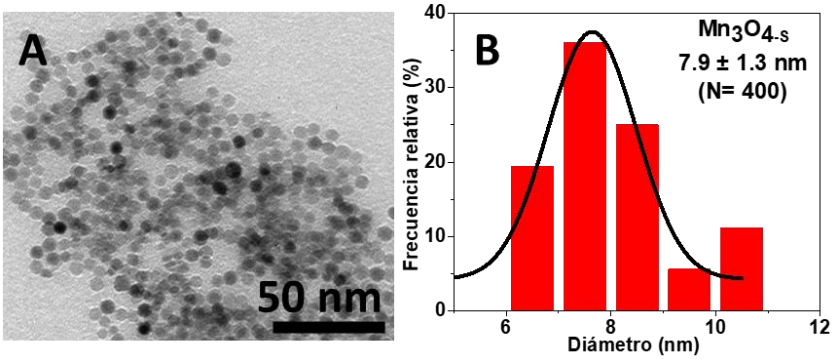


Figura 2.23: Micrografía TEM (A) e histograma de la distribución estadística (B) de las nanoesferas de Mn_3O_4.

Para asegurar su estabilidad coloidal en medio acuoso para su uso en diversas aplicaciones o procedimientos químicos ulteriores, se procedió al recubrimiento de la superficie con PAA, siguiendo el procedimiento descrito en secciones precedentes.

En la figura 2.24 se muestra la distribución estadística del tamaño hidrodinámico, con un valor promedio D_h= 18.3 nm y un índice de polidispersidad bajo, PDI=0.277, que indica ausencia de agregación. El tamaño hidrodinámico excede en 10 nm al tamaño medio obtenido por microscopía electrónica, como es habitual en partículas con una cubierta polimérica que se hidrata en medio acuoso y presenta un tamaño por dispersión de luz mayor.

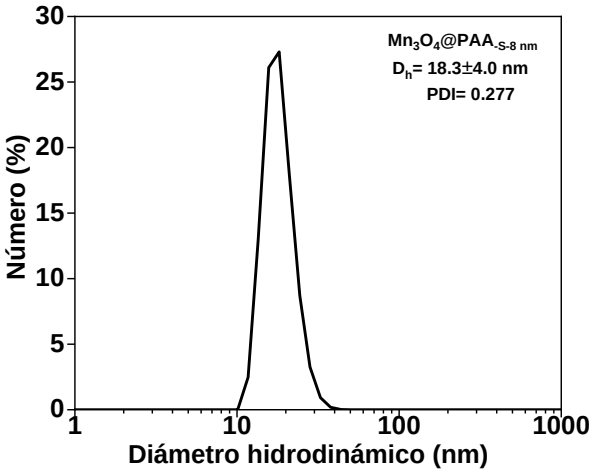


Figura 2.24: Distribución estadística de tamaño hidrodinámico de las nanoesferas de Mn_3O_4 sintetizadas por solvotermal de 8 nm de diámetro TEM.

Por último, la curva de magnetización en función del campo magnético aplicado (hasta 50000 Oe) de las MNPs de Mn_3O_4 se muestra en la figura 2.25. Los resultados demuestran el carácter paramagnético que exhiben estas NPs, la magnetización es lineal con respecto al campo y la magnetización normalizada con respecto a su masa magnética para el máximo campo aplicado, fue de M_S= 2.01emu/g_{Mn3O4}, valor similar a los encontrados por Costa-Kramer[58].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

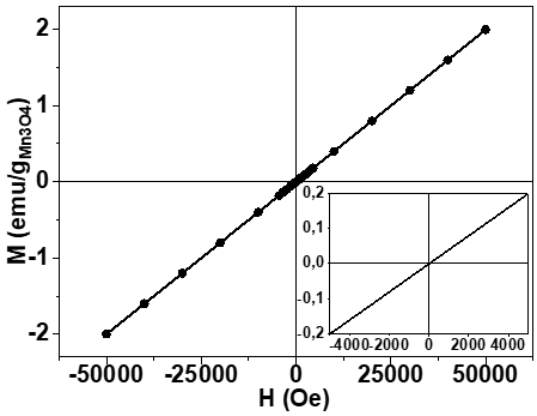


Figura 2.25: Ciclo de histéresis a 300 K de las nanoesferas de hausmanita.

2.2 Síntesis de nanoestructuras complejas

La viabilidad de una NP en aplicaciones biomédicas in vivo, depende de su estabilidad coloidal en líquidos de interés biológico y condiciones fisiológicas (pH neutro, T= 37 ºC), de su robustez para resistir diferentes medios o flujos a gran presión y de su capacidad para evitar la agregación, pues la formación de trombos dentro de los vasos sanguíneos, puede ser un peligro letal[59].

Parte de estos requerimientos para aplicaciones in vivo se solventan recubriendo a las NPs con una cubierta que aporte estabilidad, que sea robusta y que, además, posea propiedades intrínsecas que provean al nanocompuesto resultante de una funcionalidad superior. Los materiales de cubierta pueden clasificarse de manera muy general en dos tipos, orgánicos e inorgánicos.

En el caso de los recubrimientos orgánicos, las estrategias seguidas en esta Tesis se basaron en el intercambio de ligandos de moléculas bifuncionales o también llamado transferencia de fase a medio acuoso, aplicado repetidas veces, para la transferencia de MNPs hidrofóbicas, tal y como se refiere en las secciones precedentes. Estos ligandos poseen como mínimo dos grupos funcionales, uno con el que se unen a las nanopartículas (suele ser un grupo alcohol o carboxilo) y otro con el que estabilizan a las partículas en agua normalmente por carga (grupo alcohol, amino o carboxilo)[60]. La otra estrategia seguida fue la síntesis de NPs en presencia de polímero, utilizada para la síntesis de las MNPs mediante el método de co-precipitación.

En este apartado se abordarán la síntesis y caracterización de MNPs funcionalizadas con recubrimientos inorgánicos. Dentro de este tipo de recubrimientos se encuentran la sílice y el hidróxido de aluminio. La sílice es biocompatible, inerte y permite aportar una superficie que se puede funcionalizar fácilmente en etapas posteriores gracias a los grupos hidroxilos[61]. Las síntesis utilizadas para el recubrimiento de las MNPs de sílice, son los métodos de microemulsión y Stöber.

Por otra parte, el hidróxido de aluminio también es conocido por su alta porosidad y biocompatibilidad cuyo uso está aprobado en fármacos o como adyuvante en vacunas[62]. La vía utilizada en esta Tesis para recubrir las MNPs de hidróxido de aluminio, es el método de hidrólisis.

a Métodos de recubrimiento de sílice

Dependiendo del método de síntesis utilizado, se obtuvieron dos tipos de nanoestructuras magnéticas core@shell con diferentes tamaños: nanoesferas con un solo núcleo de magnetita, logradas por el método de microemulsión descrito por Fang[63] y de varios núcleos de magnetita, siguiendo el procedimiento de hidrólisis descrito por Stober[64].

En todo momento, la síntesis de las nanoesferas core@shell de un solo núcleo y con un diámetro aproximado de 19 nm, se lleva a cabo bajo agitación mecánica (210 rpm) y temperatura ambiente. Para ello, 15 g de Igepal CO-520 se adicionan a 180 mL de CHX y se deja agitando durante 15 min con la finalidad de homogeneizar la mezcla. A continuación, se adicionan 20 mL de una disolución de MNPs de Fe3O4@OA (al 0.5 % en peso en ciclohexano), preparadas previamente y cuya síntesis está descrita en el apartado 2.1.1. Tras 30 min de homogeneización, se adicionan 2.1 mL de NH4OH seguido de 2.4 mL de TEOS y se mantienen estas condiciones de reacción durante 16 h para permitir la total hidrolización del TEOS.

Terminada la reacción, se adiciona alcohol IPA para precipitar las nanoestructuras obtenidas, la mezcla continuó en agitación durante 15 minutos y transcurrido este tiempo, las nanoesferas de Fe_3O_4@SiO_2 resultantes se separaron del sobrenadante con ayuda de un imán de neodimio. Se realizaron cuatro lavados subsecuentes con etanol, agitando vigorosamente la muestra a temperatura ambiente y separándolas de la misma forma, posteriormente se llevaron a cabo cinco lavados con agua Milli-Q, dos bajo agitación mecánica, y tres en un baño de ultrasonidos de 20 min. Finalmente, las nanoestructuras se redispersan en agua Milli-Q.

Por otra parte, para la obtención de nanoesferas de varios núcleos magnéticos y con un diámetro aproximado de 146 nm, 1 mL de una disolución de las MNPs de Fe_3O_4@Citrato (3.5 mg/mL) previamente sintetizadas y cuya síntesis se describe en el apartado 2.1.1, se mezclan con 5 mL de etanol. La disolución se introduce en un baño de ultrasonidos durante 15 min con el fin de homogeneizar la mezcla. Posteriormente, se adicionan 2.29 µL de NH_4OH seguido de 2 µL de TEOS y se deja agitando orbitalmente (200 rpm) con la ayuda de una incubadora a temperatura ambiente durante 5 h.

Tras finalizar la reacción, las nanoestructuras magnéticas de Fe_3O_4@SiO_2 resultantes se separaron del sobrenadante con ayuda de un imán de neodimio. Se realizaron cuatro lavados subsecuentes con etanol, agitando vigorosamente la muestra a temperatura ambiente y separándolas de la misma forma. Posteriormente, se llevan a cabo cinco lavados con agua Milli-Q, dos bajo agitación mecánica, y tres en un baño de ultrasonidos de 20 min. Finalmente, estas nanoesferas core@shell se redispersan en agua Milli-Q.

b Método de recubrimiento de hidróxido de aluminio

La síntesis de estas nanoestructuras con multinúcleos magnéticos conlleva el uso de dos métodos diferentes. En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de las MNPs de Fe_3O_4@PAA, realizadas por el método de co-precipitación y cuya síntesis está descrita en el apartado 2.1.1 de esta Tesis, seguido de una hidrólisis forzada[65] para obtener la cubierta de hidróxido de aluminio, $Al(OH)_3$.

Para ello, 200 mg de las MNPs de Fe_3O_4@PAA se adicionan en 250 mL de agua Milli-Q y se introducen en un baño de ultrasonidos durante 15 min para homogeneizar la disolución. A continuación, se adicionan 11.6 mmoles de $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, 1.92 mmoles de $Al_2(SO_4)_3 \cdot 16H_2O$ y 0.5 moles de urea a la mezcla y se agita mecánicamente (210 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la temperatura de la reacción se incrementa a 98 ºC, y una vez alcanzada esta temperatura, de deja reaccionar durante 90 min.

Una vez enfriada la reacción, las nanoestructuras magnéticas de Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ son lavadas con agua Milli-Q y separadas magnéticamente con la ayuda de un imán de neodimio. Este proceso de lavado se realiza cinco veces. Finalmente, estas nanoesferas magnéticas de tipo core@shell se redispersan en agua Milli-Q.

Una vez obtenidas las nanoesferas magnéticas de tipo core@shell se procedió a la caracterización fisicoquímica de todas las nanoestructuras con recubrimiento inorgánico. En primer lugar, se caracterizó la composición estructural mediante XRD.

Los espectros de difracción de rayos X de todas las nanoestructuras de tipo core@shell (figura 2.26), con independencia del óxido inorgánico que las recubre, demostraron la presencia de una fase cristalina cuyos picos de difracción principales corresponden a la fase de la magnetita con una estructura de espinela inversa (JCPDS 19-0629[26]), demostrando que la magnetita no sufrió ningún tipo de cambio de fase durante la reacción.

En los espectros correspondientes a las nanoesferas de Fe_3O_4@SiO_2, se observa una banda ancha en el rango de 15-30º, que confirma la presencia de la recubierta de sílice amorfa[66]. Por otro lado en las nanoesferas de Fe_3O_4@$Al(OH)_3$, la banda ancha situada en el rango de 15-30º, corresponde a la estructura de bohemita (JCPDS card No. 20-0011[67]).

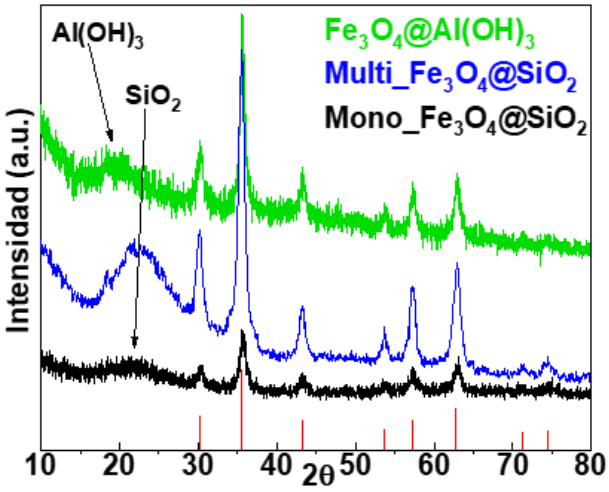


Figura 2.26: Difractogramas de rayos X de las nanoesferas con un solo núcleo (negro) y multinúcleos (azul) de magnetita recubierta de SiO_2 o con $Al(OH)_3$ (verde), comparado con las reflexiones principales de dichas estructuras determinadas teóricamente.

Una vez conocida la composición estructural de estas nanoestructuras de tipo core@shell, se procedió con el análisis de su composición superficial mediante el análisis por FTIR. En la figura 2.27 se presentan los espectros FTIR de dichas nanoestructuras magnéticas, compuestas por un solo núcleo de magnetita y recubiertas con sílice (espectro negro) o con varios núcleos

de magnetita (espectro azul) o las de tipo multinúcleos recubiertas de hidróxido de aluminio (espectro verde). En los tres espectros, se observa una banda ancha situada en 3384-3420 cm^{-1} que se corresponde con las vibraciones de tensión de los enlaces O-H, presentes en los nanomateriales hidrofílicos, así como la banda localizada entre 478-547 cm^{-1}, asociada a las vibraciones de tensión de los grupos tetraédricos (Fe^{3+}–O^{2-}) del enlace Fe-O[68,69], lo que confirma la existencia de las nanoesferas de magnetita encapsuladas.

Por otra parte, las bandas situadas a 1063 cm^{-1} y 1103 cm^{-1} se asocian a las vibraciones de tensión asimétrica de los enlaces Si-O-Si (de los grupos silanoles presentes en las nanoestructuras magnéticas recubiertas con sílice[70]) y a las vibraciones de flexión de los grupos Al-O, procedente de la recubierta de hidróxido de aluminio[71], respectivamente. Adicionalmente, en ambos espectros de $Fe_3O_4@SiO_2$ se observaron las vibraciones de tensión simétrica y de flexión de los enlaces Si-O-Si, correspondiente a las bandas situadas en aproximadamente 808 cm^{-1} y 462 cm^{-1}, respectivamente.

Por lo tanto, tras los resultados de los análisis por FTIR, se puede concluir la correcta obtención de las nanoestructuras de tipo core@shell en todos los sistemas estudiados.

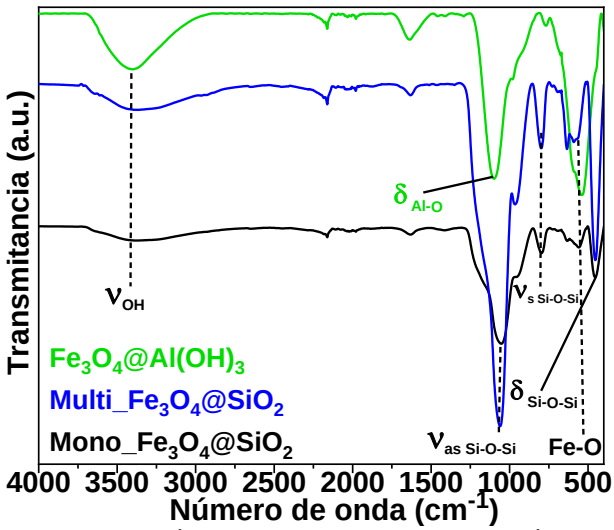


Figura 2.27: Espectro FTIR de las nanopartículas de magnetita de un solo núcleo recubiertas de SiO_2 (negro) y las que presentan multinúcleos de magnetita recubiertas con SiO_2 (azul) y con $Al(OH)_3$ (verde).

Por otra parte, la caracterización morfológica se ha realizado mediante las imágenes obtenidas por TEM, SEM STEM-EDX y los histogramas de distribución de tamaños.

Las micrografías de las nanoestructuras de magnetita recubiertas con sílice de la figura 2.28, muestran una morfología esférica, con mayor uniformidad en las que presentan un solo núcleo magnético, sin presenciar altos niveles de agregación. El tamaño de las nanoestructuras presentadas en este apartado, variaron dependiendo de la cantidad de TEOS utilizado para formar la capa de sílice, al igual que la composición de núcleos magnéticos que las recubre. Por este motivo, las que presentan un solo núcleo, su diámetro promedio es de 19.4 ± 4.1 nm, y en las de varios núcleos, de 146.2 ± 0.9 nm.

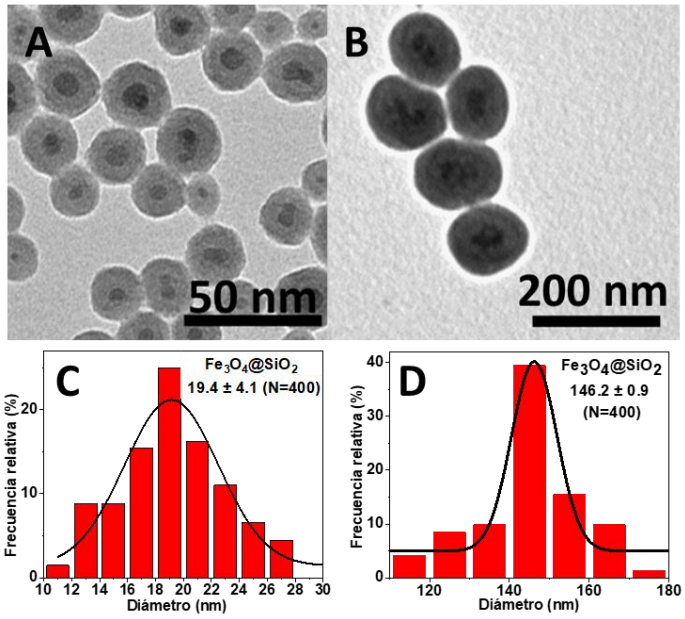


Figura 2.28: Micrografías TEM de las nanoestructuras de Fe_3O_4@SiO_2 mononúcleo (A) y multinúcleos (B), junto con sus respectivos histogramas de distribución estadística correspondientes (C y D).

Por otro lado, la micrografía TEM (figura 2.29) de las nanoestructuras de Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ muestra un nanomaterial compuesto por multinúcleos magnéticos de Fe_3O_4 (contraste oscuro) y recubiertas por un óxido inorgánico (contraste claro), que en este caso es el $Al(OH)_3$. A mayores, tanto las micrografías de SEM como de TEM de dichas nanoestructuras magnéticas, muestran una morfología cuasi-esférica, con un diámetro promedio de 210.8 ± 54 nm.

Adicionalmente, los resultados del mapeo STEM-EDS de la composición de las nanoestructuras, muestran que los elementos de hierro y aluminio se distribuyen de manera homogénea por toda la superficie de la nanoestructura, lo que confirma que el hidróxido de aluminio recubre adecuadamente los núcleos de magnetita.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

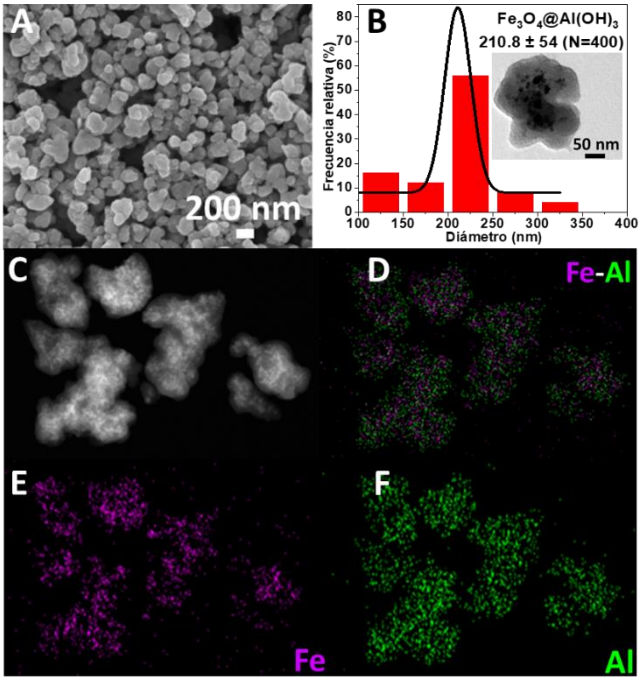


Figura 2.29: Micrografías SEM (A) y TEM (B) de las nanoestructuras de Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ y su histograma de la distribución estadística correspondiente (B) junto con su micrografía STEM (C) y mapeo-EDS de los elementos Fe y Al superpuestos (D), Fe (E) y Al (F) presentes en la muestra.

Los resultados obtenidos de las distribuciones de tamaño hidrodinámico medidos por DLS (figura 2.30) demostraron como tendencia general que las nanoestructuras de tipo core@shell resuspendidas en agua poseen valores de D_h próximos a los encontrados en las mediciones de tamaño TEM, sobretodo las nanoestructuras mononúcleo recubiertas con sílice, siendo esta la que tiene un valor de polidispersidad más bajo, próximo a 0.2. Este hecho proporciona información acerca del bajo nivel de agregación que presentan estas nanoestructuras redispersas en medio acuoso. Por otra parte, las nanoestructuras multinúcleo presentan un índice de polidispersidad de aproximadamente 0.3, un valor algo más elevado que ya indica que las NPs poseen tendencia a agregarse.

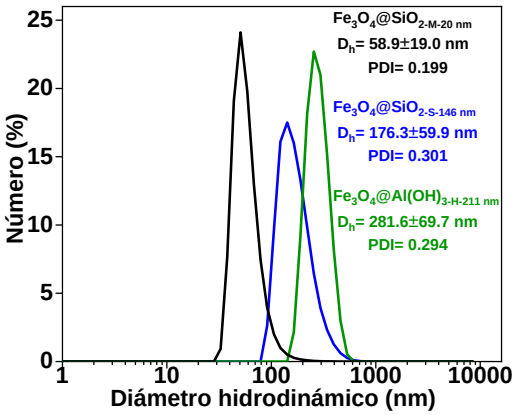


Figura 2.30: Distribuciones estadísticas del tamaño hidrodinámico de las nanoestructuras recubiertas con sílice de un solo núcleo (negro) y de varios núcleos (azul) y las multinúcleos recubiertas con hidróxido de aluminio (verde).

Adicionalmente se midieron las distribuciones de potencial zeta con el mismo equipo DLS cuyos datos se muestran en la tabla 2.9. En dicha tabla se aprecia que todas las nanoestructuras

recubiertas con sílice muestran valores de potencial zeta negativos, procedentes de los grupos silanoles que contienen en su superficie. Apreciándose un valor mayor del potencial Z en las nanoestructuras multinúcleos, debido a su mayor tamaño y por tanto al mayor número de cargas negativas que producen una carga neta mayor.

Por otro lado, las MNPs recubiertas con $Al(OH)_3$, presentan un valor promedio de potencial zeta positivo, debido a la presencia de los hidroxilos metálicos en su superficie, que podían aceptar protones y, por tanto, mostrar un potencial zeta positivo[72].

Tabla 2.9: Valores promedio del potencial zeta de las nanoestructuras core@shell.

NP	Potencial zeta (mV)
$Fe_3O_4@SiO_{2\text{-M-20 nm}}$	-36 ± 7
$Fe_3O_4@SiO_{2\text{-S-146 nm}}$	-47 ± 6
$Fe_3O_4@Al(OH)_{3\text{-H-211 nm}}$	15 ± 4

Finalmente, en los ciclos de histéresis obtenidos mediante VSM (figura 2.31, A) ponen en manifiesto el carácter superparamagnético de todas las nanoestructuras magnéticas, con campos coercitivos o remanencia despreciables. Como se puede observar en la tabla 2.10, la magnetización de saturación de todas las muestras presenta unos valores aproximados de 60 emu/g_{Fe3O4}. Este valor es inferior al de la magnetita en su forma masiva o bulk, que es de 92 emu/g_{Fe3O4}[36], lo cual es debido a que las MNPs, por su pequeño tamaño, presentan una capa magnética superficial muerta que reduce su magnetización total[37].

Por otra parte, el comportamiento superparamagnético presentado en estas MNPs, se corroboró por la determinación de la T_B mediante la obtención de las curvas de susceptibilidad magnética ZFC/FC (figura 2.31, B). En donde se observa que la T_B de todas las MNPs se encuentra por debajo de la temperatura ambiente, lo que confirma que todas estas nanoestructuras de tipo core@shell son superparamagnéticas a temperatura ambiente[39] y que el procedimiento de recubrimiento no altera la composición y propiedades de los núcleos de magnetita.

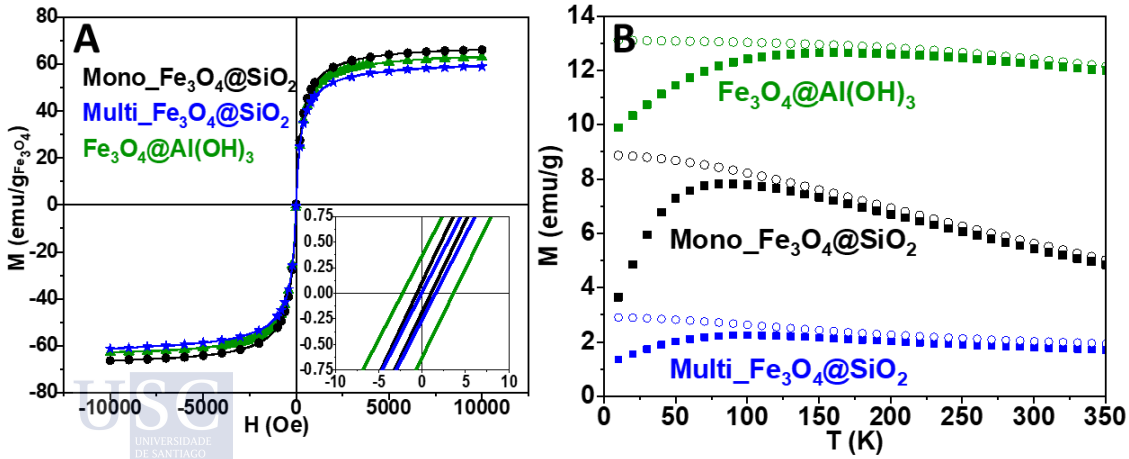


Figura 2.31: Ciclos de histéresis a 300 K (A) y curvas de magnetización en función de la temperatura (B) de las nanoestructuras recubiertas con sílice de un solo núcleo (negro) y de varios núcleos (azul) y las multinúcleos recubiertas con hidróxido de aluminio (verde).

Tabla 2.10 Parámetro magnéticos de las nanoestructuras core@shell.

NP	M_S (emu/g_{Fe3O4})	M_R (emu/g_{Fe3O4})	H_C (Oe)	$T_{B\ 100\ Oe}$ (K)
$Fe_3O_4@SiO_{2\text{-M-20 nm}}$	67.1	0.2	0.8	83
$Fe_3O_4@SiO_{2\text{-S-146 nm}}$	59.2	0.2	0.9	91
$Fe_3O_4@Al(OH)_{3\text{-H-211 nm}}$	62.8	0.5	2.9	125

2.3 Funcionalización con fluoróforos

Existen diversos tipos de materiales de recubrimientos con propiedades intrínsecas, tales como las NPs de Au o Ag con respuesta plasmónica, o las NPs semiconductores como Quantum Dots con respuesta óptica, o las moléculas o polímeros fluorescentes para aplicaciones de bioimagen, cuya inclusión en las cubiertas de las NPs magnéticas permite producir una nanoestructura multifuncional. Sin embargo, son los fluoróforos (compuestos fluorescentes), que producen una respuesta intensa a bajas concentraciones de manera rápida, barata y eficaz y suelen carecer de problemas de toxicidad, los más interesantes para estudios biomédicos de monitorización celular[73].

Para ello, se siguieron dos estrategias opuestas:

a) Internalización del fluoróforo dentro de la cubierta de una nanoestructura magnética de tipo core@shell, mediante el método de doble microemulsión, que protege de la degradación de la fluorescencia, al estar aislado el fluoróforo de las condiciones del medio externo. Dada la estabilidad coloidal, el pequeño tamaño de las NPs de $Fe_3O_4@SiO_2$, la respuesta SPM, y la versatilidad química de la superficie de sílice, se escogió esta nanoestructura para hacer diferentes estudios de anclaje de fluoróforos. En las estructuras obtenidas mediante este proceso, $Fe_3O_4@SiO_2$-FITC-SiO_2; $Fe_3O_4@SiO_2$-RITC-SiO_2; el núcleo magnético queda recubierto por una primera capa de sílice, seguido de una capa de fluoróforo y cubierto por una capa final de sílice.

b) Funcionalización externa de la MNP, "grafting externo", mediante una reacción de polimerización directa de la dopamina sobre la superficie de la NP, más rápido y de menor coste que el anclaje interno. Con este procedimiento se ancló el fluoróforo directamente sobre núcleos desnudos de Fe_3O_4, o sobre nanoestructuras mesoporosas de sílice (mesop.Si@PDA; mesop.Si@Fe_3O_4@PDA; mesop. Si@[$Fe_3O_4@SiO_2$]@RITC).

La síntesis y caracterización fisicoquímica no fluorescente de todas las nanoestructuras magnéticas fluorescentes, se encuentra en el anexo II de esta Tesis Doctoral.

2.3.1 Estudio de la actividad fluorescente

La caracterización óptica de la actividad fluorescente de las nanoestructuras magnéticas funcionalizadas con PDA (Fe_3O_4@PDA), FITC y RITC ($Fe_3O_4@SiO_2$-FITC-SiO_2; $Fe_3O_4@SiO_2$-RITC-SiO_2) se muestran en la figura 2.32. Como se puede observar, en todos los espectros de fluorescencia se muestran picos definidos tanto de excitación como de emisión. Los picos de emisión para cada medida tienen su máximo localizado en 424, 515 y 583 nm para las MNPs funcionalizadas con PDA, FITC y RTIC, respectivamente. Estos máximos de emisión concuerdan con los reportados teóricamente para cada fluoróforo[74-76]. Para corroborar si las nanoestructuras magnéticas fluorescentes tienen una respuesta suficiente para ser utilizadas en

imágenes de microscopia para estudios biológicos, se analizaron mediante microscopía confocal usando las líneas láseres de 405, 488 y 522 nm para la visualización del PDA, FITC y RITC, respectivamente.

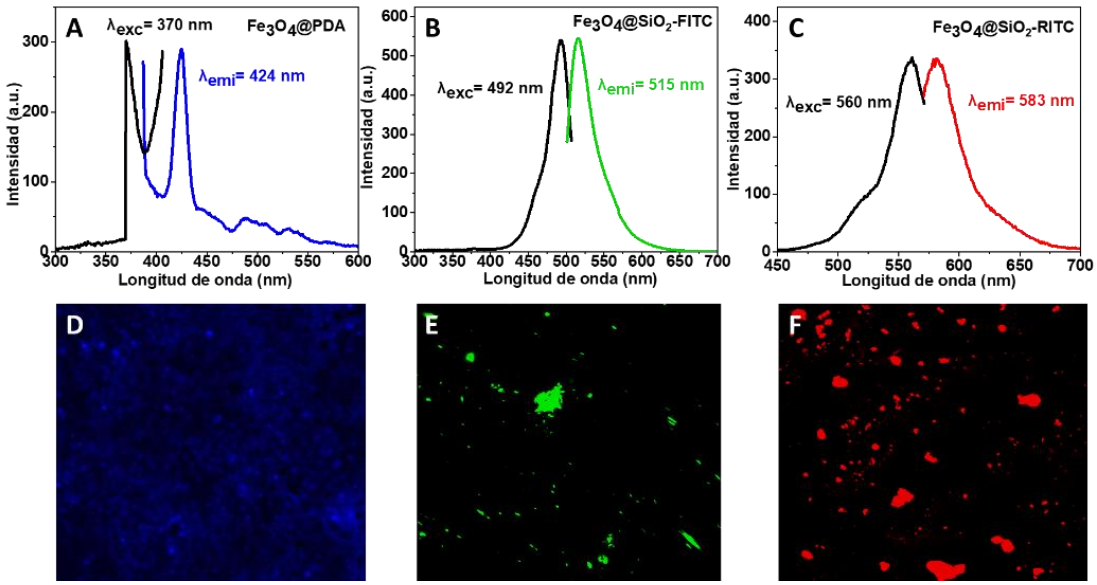


Figura 2.32: Espectros de fluorescencia y micrografías de fluorescencia confocal de las nanoestructuras magnéticas fluorescentes funcionalizadas con: PDA (A), FITC (B) y RITC (C).

Del mismo modo, se observó similares resultados al analizar por microscopía confocal las nanoestructuras mesoporosas de sílice funcionalizadas con PDA y RITC, (mesop.Si@Fe_3O_4@PDA; mesop. Si@[Fe_3O_4@SiO_2]@RITC) cuyas micrografías se muestran en la figura 2.33. En dichas imágenes de fluorescencia, se corroboró que las sílices mesoporosas magnéticas presentan fluorescencia, de acuerdo con los parámetros de excitación establecidos para la PDA (micrografía B) y RITC (micrografía C), observándose una mayor emisión por parte de las mesoporosas de sílice magnéticas funcionalizadas con las nanoestructuras core@shell dopadas con RITC, esto puede ser debido a una distribución más homogenea o mejor absorción por parte del nanomaterial de la molécula fluorescente.

Como prueba de control, las mesoporosas de sílice sin funcionalizar con fluoróforos se excitaron a las dos longitudes de onda correspondientes a la emisión de la PDA y RITC. Como era de esperar, no se observó ninguna respuesta de emisión fluorescente de este nanomaterial sin dopar.

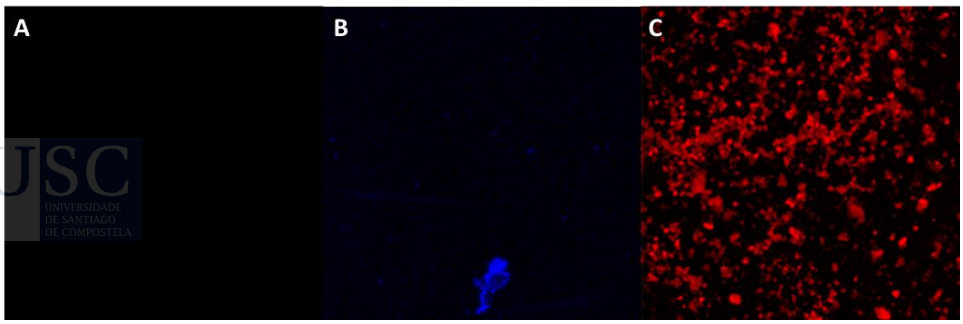


Figura 2.33: Micrografías de fluorescencia confocal de las nanoestructuras mesoporosas de sílice no magnéticas, (A) y magnéticas con actividad fluorescente funcionalizadas con: PDA (B) y RITC (C).

Con el fin de comprobar la fotoestabilidad de los fluoróforos (FITC o RITC) y del polímero fluorescente (PDA) anclados en las nanoestructuras magnéticas con el paso del tiempo (2 meses), se analizó la actividad fluorescente de distintas nanoestructuras (Fe_3O_4@PDA; Fe_3O_4@SiO_2-FITC-SiO_2 y Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2) mediante su separación del sobrenadante por centrifugación (13000 rpm) durante 15 min.

Para ello, se toma una alícuota de 1 mL de cada nanomaterial fluorescente, y tras la centrifugación se separan las nanoestructuras magnéticas del sobrenadante. Este precipitado se redispersa en 1 mL de agua Milli-Q y se analiza en un fluorímetro, mostrándose los resultados mostrados en la figura 2.34.

En esta figura, se observa que los espectros de fluorescencia, tanto de las nanoestructuras magnéticas dopadas con PDA y con RITC (espectros A y C, respetivamente) mantienen su estabilidad durante el paso del tiempo, confirmándose que estas MNPs seguían conservando su propiedad fluorescente, obtenida por el fluoróforo RITC o por la PDA, en donde la diferencia entre las intensidades de la fluorescencia emitida observada en ambos espectros de fluorescencia, pueden relacionarse con la concentración final obtenida tras la centrifugación de las nanoestructuras magnéticas fluorescentes. Sin embargo, en los espectros de fluorescencia relacionados con el fluoróforo FITC, se aprecia que la intensidad del fluoróforo disminuye a medida que transcurre el tiempo, esto es debido a un desprendimiento de la molécula FITC de la nanoestructura, asociado a la formación de un enlace no covalente o muy débil entre el fluoróforo y la molécula APTS y posterior recubrimiento de sílice.

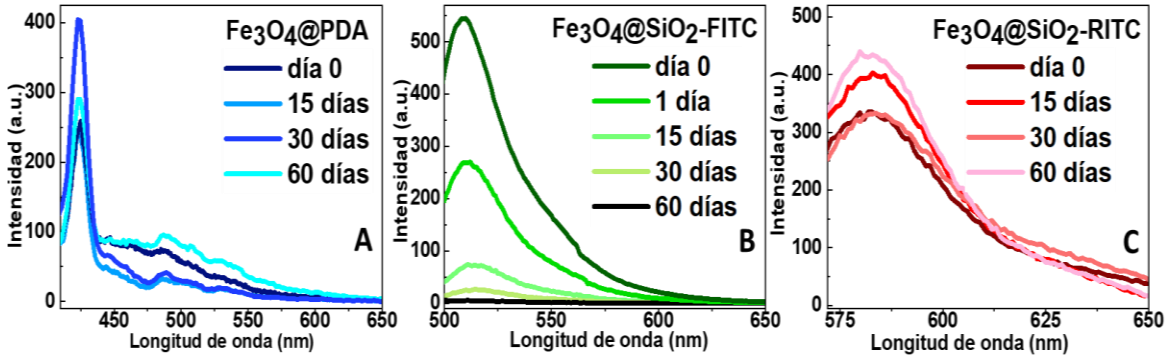


Figura 2.34: Estudio de la estabilidad de la actividad fluorescente presente en las nanoestructuras magnéticas funcionalizadas con: PDA (A), FITC (B) y RITC (C).

2.4 Bioconjugación

La construcción jerárquica de tipo core@shell, permite desarrollar agentes multifuncionales en los que las diferentes respuestas se van incrementando de manera secuencial y controlada. Dado que los anticuerpos, aptámeros, antígenos y demás biomoléculas precisan estar accesibles espacialmente para ser biológicamente útiles, su anclaje sobre los agentes teragnósticos ha de efectuarse en último lugar.

Por ello, tras incluir los núcleos dentro de una cubierta biocompatible, y añadir una respuesta óptica mediante la inclusión de fluoróforos, se optimizaron diferentes rutas de bioconjugación, para anclar de manera eficiente y robusta biomoléculas a la superficie exterior de las NPs superparamagnéticas.

Entre las rutas sintéticas de bioconjugación existentes, en esta Tesis se siguieron dos tipos de procedimientos para enlazar, de forma covalente, las nanoestructuras magnéticas a los anticuerpos o aptámeros:

- Mediante el anclaje directo de MNP y molécula biológica a través de la activación de grupos carboxílicos con carbodiimida, conocida como la ruta EDC/NHS;

- o utilizando glutamato como molécula orgánica espaciadora de la NP y el material tras la activación con EDC/NHS.

2.4.1 Bioconjugación de las MNPs de Fe_3O_4@SiO_2 con aptámero [Rgen3K(KLVFF)$_{16}$] usando glutamato como espaciador

La conjugación de las nanoestructuras magnéticas de sílice funcionalizadas con glutamato, se llevó a cabo mediante el método de la carbodiimida[77], el cual se basa en la activación de los grupos carboxílicos presentes en el glutamato, mediante carbodiimida (EDC) y N-hidroxisucidimida (NHS), lo que da lugar a la formación de un compuesto intermediario que reacciona con un grupo amino del aptámero, estableciéndose la unión covalente del mismo a la MNP. para su posterior acoplamiento a los grupos aminos presentes en el aptámero (figura 2.35).

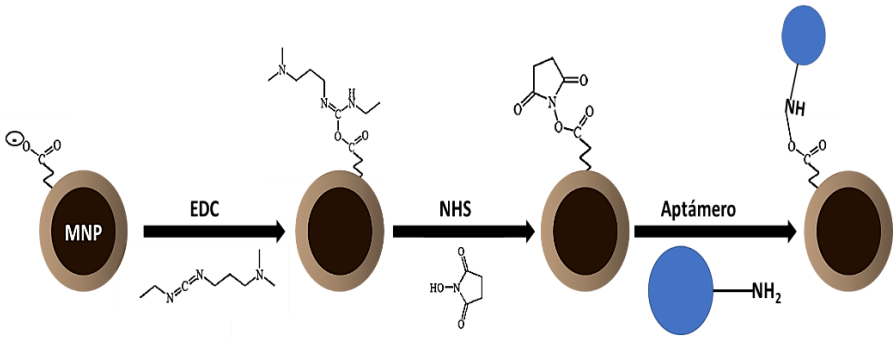


Figura 2.35: Representación esquemática del proceso de inmovilización covalente del aptámero a una MNP de Fe_3O_4@SiO_2.

Para ello, 10 mg de las nanoestructuras de Fe_3O_4@SiO_2, cuyo procedimiento de síntesis está descrito en el apartado 2.2, se resuspenden en 10 mL de etanol y se centrifugan a 3500 rpm durante 30 min. Una vez las nanoestructuras se separan del sobrenadante, éstas se vuelven a resuspender en 10 mL de etanol y se introducen en un baño de ultrasonidos durante 5 min. Este proceso de lavado se repite 3 veces. Posteriormente, se adiciona 1 mL de una disolución de peróxido de hidrógeno (3 % en peso) al precipitado, y se sonica la mezcla durante otros 5 min. Una vez la mezcla está homogeneizada, se introduce en una incubadora durante 15 min, a temperatura ambiente y bajo agitación orbital (200 rpm). A continuación, las MNPs son separadas del sobrenadante y a éstas se les adicionan 0.2 mmoles de glutamato disueltos en agua Milli-Q. Tras la adición del glutamato, se vuelven a introducir en la incubadora bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, las MNPs funcionalizadas con glutamato, se separan del sobrenadante con ayuda de un imán de neodimio para resuspenderlas en 1 mL de una disolución de buffer MES (0.1 M), que contiene 0.2 mmoles de EDC, 0.05 mmoles de NHS y 5 mg del aptámero Rgen3K(KLVFF)$_{16}$. La mezcla se sonica durante 2 min y se vuelve a incubar bajo agitación (200 rpm y 25ºC) durante 2 horas.

Finalizada la reacción, las nanoestructuras magnéticas bioconjugadas con el aptámero, Fe_3O_4@SiO_2@Rgen3K$(KLVFF)_{16}$, se separan de la síntesis con la ayuda de un imán de neodimio y se lavan tres veces con etanol y otras tres veces con agua Milli-Q. Finalmente, las NPs bioconjugadas se redispersan en una disolución buffer de betaina (100 mg/mL) con glucosa (0.01 % en peso).

2.4.2 Bioconjugación directa de las nanoestructuras magnéticas con anticuerpos monoclonales anti-Aβ 1-42 o anti-pTau

Para inmovilizar directamente los diferentes tipos de anticuerpos monoclonales (mAb), anti-Aβ o anti pTau B6, sobre nanoestructuras magnéticas con diferente superficie, Fe_3O_4@PAA, Fe_3O_4@$Al(OH)_3$, Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2 y mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2]@RITC, se modificó el método descrito por Puertas[78]. Dependiendo la composición de la superficie de la NP, se procedió a la activación con carbodiimida de grupos hidrofílicos (hidroxilos, carboxilos, etc.) sobre la partícula o sobre el anticuerpo.

a Activación de los grupos hidroxilos o carboxílicos presentes en las MNPs (Fe_3O_4@PAA, Fe_3O_4@$Al(OH)_3$, Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2):

Para ello, 200 µL de una disolución en buffer MES (50 mM), que contiene EDC (0.0432 M) y Sulfo-NHS (0.0648 M), se adicionan a una solución que contiene 500 µg de las MNPs dispersadas en 800 µL de buffer MES (50 mM), obteniéndose un volumen total de 1 mL. Después de homogeneizar la disolución en un agitador tipo vórtex, ésta se introduce en una incubadora durante 30 min bajo agitación orbital (200 rpm) y a 37 ºC. Posteriormente, el sobrenadante es retirado mediante una pipeta de las MNPs precipitadas con la ayuda de una centrífuga (13000 rpm, durante 15 min), resuspendiéndose las MNPs en 1 mL de agua Milli-Q bajo un baño de ultrasonidos durante 2 min. Este proceso de centrifugado se repite 2 veces. A continuación, se adicionan 50 µg del anticuerpo a las MNPs dispersas en agua Milli-Q y se incuban a 37 ºC (200 rpm) durante 16 h. Transcurrido este tiempo, la disolución que contiene las MNPs bioconjugadas, se centrifuga a 13000 rpm durante 15 min a una temperatura de 4 ºC. El sobrenadante se retira y las MNPs bioconjugadas se resuspenden en 1 mL de agua Milli-Q y estas son homogeneizadas con la ayuda del baño de ultrasonidos durante 2 min. Este proceso de lavado se repite dos veces más.

Finalmente, las MNPs bioconjugadas se resuspenden en 1 mL de una solución que contiene buffer HEPES (50 mM) y glucosa (0.01 % en peso). La concentración final de las MNPs bioconjugadas es de aproximadamente de 0.5 mg/mL.

b Bioconjugación de las nanoestructuras mesoporosas de sílice fluorescentes por activación de los grupos carboxílicos del anticuerpo:

Para llevar a cabo esta síntesis, 8 µL de una disolución en buffer MES (50 mM) que contiene EDC (0.432 M) y Sulfo-NHS (0.648 M) se adicionan a una solución que contiene 50 µg del anticuerpo dispersadas en 392 µL de buffer MES (50 mM), obteniéndose un volumen total de 400 µL. Después de homogeneizar la disolución en un agitador tipo vórtex, ésta se introduce en una incubadora durante 30 min bajo agitación orbital (200 rpm) y a 37 ºC. Transcurrido este tiempo, la reacción se trasvasa a un filtro concentrador de proteínas para centrífuga (Amicon) y se centrifuga a 13000 rpm durante 15 min y a 4 ºC. Tras el proceso de centrifugación, la proteína quedará concentrada en el filtro, eliminando así el sobrenadante que

contiene el exceso de EDC Y Sulfo-NHS sin reaccionar. Posteriormente, el anticuerpo con sus grupos carboxílicos activados, se resuspende en 400 µL de agua Milli-Q y se adicionan a 500 µg de las nanoestructuras mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2]@RITC dispersadas en 600 µL de agua Milli-Q y se incuban a 37 ^oC (200 rpm) durante 16 h. A continuación, la disolución que contiene las cerámicas mesoporosas magnéticas y fluorescentes bioconjugadas, se centrifuga a 13000 rpm durante 15 min a una temperatura de 4 ºC. El sobrenadante se retira y el nanomaterial bioconjugado precipitado se resuspende en 1 mL de agua Milli-Q y se homogeniza con la ayuda del baño de ultrasonidos durante 2 min. Este proceso de lavado se repite dos veces más.

Finalmente, este nanomaterial magnético bioconjugado se resuspende en 1 mL de una solución que contiene buffer HEPES (50 mM) y glucosa (0.01 % en peso). La concentración final de las MNPs bioconjugadas es de aproximadamente 0.5 mg/mL.

Una vez obtenidas todas las nanoestructuras magnéticas bioconjugadas, se procedió a su caracterización fisicoquímica, por FTIR, y biológica, mediante la determinación tanto cuantitativa como cualitativa de los anticuerpos monoclonales conjugados sobre todos los nanomateriales.

En la figura 2.35 se muestran los análisis de superficie de los espectros FTIR de las nanoestructuras magnéticas de tipo core@shell funcionalizadas y sin funcionalizar con el aptámero (figura A) y con el mAb (figura B), junto con sus respectivos espectros. En el espectro de las MNPs funcionalizadas con el aptámero (espectro azul), se observan la formación de nuevas bandas situadas a 3290 cm^{-1}, 1639 cm^{-1} y a 1544 cm^{-1}, asociadas a las vibraciones de tensión y de flexión, asimétrica y simétrica, de los enlaces amida (-NH) procedentes del aptámero[79].

Por otro lado, en el espectro de las nanoesferas de tipo core@shell fluorescentes bioconjugadas con el mAb (espectro rojo) se observa la banda asociada a las vibraciones de flexión de la amida II de la estructura proteica del mAb[79], situada a 1540 cm^{-1}.

Adicionalmente, en los demás espectros, se puede ver que en todas las nanoestructuras magnéticas bioconjugadas se mantienen las bandas relacionadas con los grupos silanoles. Concretamente las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica y las de flexión de los enlaces Si-O-Si, localizados entre 1060, 798, 445 cm^{-1}, respectivamente. Seguido de la banda localizada a 571 cm^{-1}, asociado a las vibraciones de tensión de los enlaces Fe-O[68,69], que confirman la exitosa funcionalización del material biológico sobre la superficie de las nanoestructuras magnéticas de tipo core@shell.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

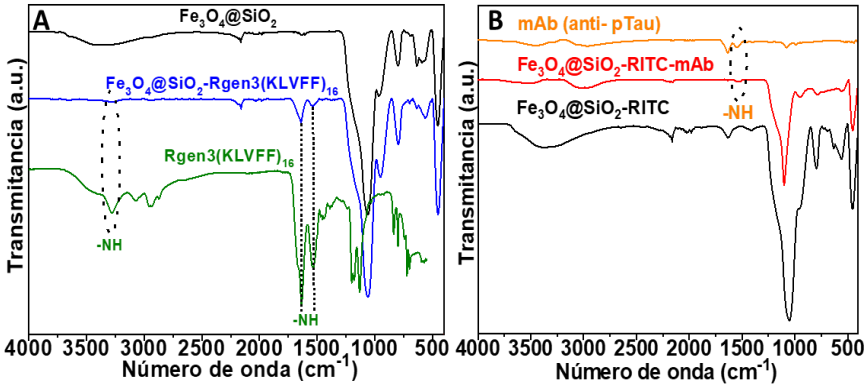


Figura 2.35: Espectros FTIR de las MNPs bioconjugadas con el aptámero (A) y con el anticuerpo monoclonal (B).

Una vez confirmado la presencia del material proteico sobre las nanoestructuras magnéticas, se procedió a la determinación, tanto cuantitativa como cualitativa de ambos mAb que contienen en la superficie dichos nanomateriales.

La cuantificación del mAb total (anti-Aβ o anti p-Tau) presente en las nanoestructuras magnéticas bioconjugadas (Fe_3O_4@PAA, Fe_3O_4@Al(OH)$_3$, Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2 y las mesoporosas de sílice mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2]@RITC) se realizó mediante la técnica de detección colorimétrica Micro BCA Protein Assay Kit. Esta técnica de detección está basada en el uso del ácido bicinchonínico (BCA), reactivo capaz de formar un complejo proteico, de color púrpura, con el catión Cu^{+1} en condiciones alcalinas, mediante la reducción del Cu^{2+}. Este complejo proteico-BCA muestra una absorbancia a 562 nm, la cual fue medida usando un lector multiplacas Multiskan GO (Thermo Scientific).

Para la realización de la recta de calibración, se utilizó BSA como proteína estándar. Para el cálculo del mAb, se tuvo en cuenta la contribución de la absorbancia procedente de las estructuras magnéticas sin bioconjugar y activadas mediante la vía de la carbodiimida, sustrayendo estos valores para la obtención de una real concentración de mAb bioconjugado sobre estas nanoestructuras.

El procedimiento llevado a cabo para esta determinación proteica, está basado en el protocolo descrito por el proveedor[80]. Resumidamente, las concentraciones de BSA usadas para la recta de calibración fueron de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125 y 0 μg/mL. Tanto las concentraciones de la recta patrón como las de las muestras de interés se realizaron por triplicado. Para ello, se adicionaron 100 mL de cada concentración de proteína BSA en cada pocillo de una placa de ELISA de 96 pocillos. Los datos de absorbancia resultantes fueron graficados para la obtención de una curva estándar, de la cual se obtuvieron las concentraciones de anticuerpo monoclonal funcionalizados en cada nanomaterial magnético, utilizando la ecuación de la recta:

$$y = a + bx$$

La figura 2.36 muestra la curva estándar y la ecuación de la recta obtenida para las concentraciones ya mencionadas anteriormente para la proteína BSA con la que se estimó la concentración de mAb anclado a cada nanoestructura magnética (tabla 2.11). Los resultados obtenidos muestran una eficacia de enlace de más del 50 % para las nanoestructuras magnéticas mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2]@RITC y las compuestas por magnetita recubierta con PAA y con

SiO_2, independientemente del tipo de anticuerpo bioconjugado, con un notable rendimiento para las nanoestructuras magnéticas de tipo core@shell y para las mesoporosas de sílice con más de un 80 % de mAb (anti-Aβ o anti pTau B6) anclado en su superficie. Sin embargo, el rendimiento de anclaje de mAb sobre las nanoestructuras magnéticas Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ es bastante bajo (9 %), lo que indica que la superficie de estas MNPs es poco funcional por esta vía de bioconjugación usada.

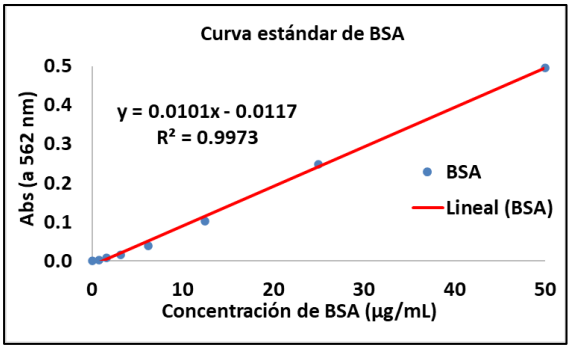


Figura 2.36: Curva estándar de BSA para la cuantificación del mAb.

Tabla 2.11 Resultados de la determinación de mAb por MNPs mediante BCA kit.

Muestra	Tipo mAb	Concentración mAb (µg)	Eficacia de enlace Mab-MNPs (%)
Fe_3O_4@PAA	Aß	33.5	67
Fe_3O_4@PAA	pTau	32.1	64
Fe_3O_4@$Al(OH)_3$	pTau	4.6	9
Fe_3O_4@SiO_2	pTau	42.7	85
Mesop.Si@Fe_3O_4	pTau	44.8	90

Por su parte, la determinación cualitativa del mAb inmovilizado sobre las MNPs se realizó mediante la técnica inmunoenzimática ELISA (sigla en inglés de "Enzyme Linked InmunoSorbent Assay"). Esta técnica se llevó a cabo con las nanoestructuras magnéticas que presentaron notables resultados de anclaje de mAb sobre su superficie mediante el Micro BCA Kit (Fe_3O_4@PAA, Fe_3O_4@SiO_2-RITC y mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2]@RITC). La técnica ELISA utilizada para esta determinación, fue de tipo Sándwich, ya que se considera que este tipo de ensayos es muy sensible y que, además, posee una gran especificidad para la detección de antígenos[81]. Como anticuerpo secundario (o de detección) se utilizó un anticuerpo de conejo anti IgG1-ratón conjugado a peroxidasa.

Tanto la placa ELISA sembrada con las proteínas Aβ o pTau, como el procedimiento para llevar a cabo la determinación de los mAb conjugados en las MNPs mediante esta técnica, fueron suministrados por el Doctor Adrián Posado del grupo de Investigación en Neurociencias Clínicas del Instituto de Investigación Sanitaria (LINC, Sergas). Las concentraciones utilizadas de cada mAb para realizar la recta de calibrado fueron de 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.025 0.01 y 0 ng/mL. Tanto las concentraciones de la recta patrón como las muestras de interés se realizaron por triplicado. Para ello, se adicionaron 100 mL de la conocida concentración de proteína en cada pocillo de una placa de ELISA de 96 pocillos. Los datos de absorbancia (medida a 450 nm), resultantes, fueron graficados para la obtención de una curva estándar, de

la cual se obtuvieron las concentraciones de anticuerpo monoclonal funcionalizados en cada nanomaterial magnético, utilizando la ecuación de la recta, ya mencionada anteriormente.

Tanto los resultados obtenidos de la cuantificación realizada por la técnica ELISA de cada mAb bioconjugado a las nanoestructuras magnéticas y sus respetivas curvas de calibración, se encuentran reflejados en la figura 2.37 y en la tabla 2.12. Los datos obtenidos en esta determinación por ELISA, muestran una disminución notable de anticuerpo que contiene cada nanoestructura magnética. Este hecho es debido a que la técnica ELISA cuantifica el anticuerpo inmovilizado específicamente a los oligómeros Aβ o pTau sembrados en la placa ELISA[82].

Las MNPs recubiertas con PAA, muestran una eficacia de enlace, mAb-MNPs, del 20 %, independiente del tipo de anticuerpo funcionalizado en su superficie. Por otra parte, una concentración bastante baja de mAb-pTau B6 (3 %) se encuentra en las nanoestructuras magnéticas de Fe_3O_4@$Al(OH)_3$, este valor ya era esperado al conocer la concentración de mAb mediante la determinación por BCA kit, lo mismo ocurre con las nanoestructuras magnéticas fluorescentes (mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2]@RITC y Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2), con una concentración de aproximadamente 40 % del anticuerpo total, orientado específicamente a los oligómeros Aβ o pTau.

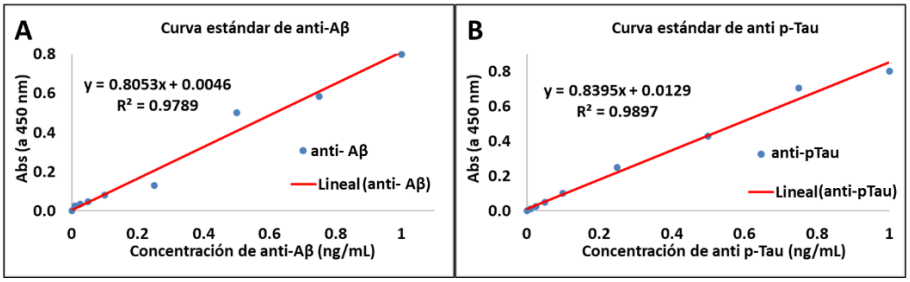


Figura 2.37: Curvas estándar de anti-Aβ (A) y anti pTau (B) para la cuantificación de los mAb.

Tabla 2.12 Resultados de la determinación de mAb por MNPs mediante ELISA.

Muestra	Tipo mAb	Concentración mAb (µg)	Eficacia de enlace mAb-MNPs (%)
Fe_3O_4@PAA	Aβ	10.10	20
Fe_3O_4@PAA	pTau	9.90	20
Fe_3O_4@$Al(OH)_3$	pTau	1.50	3
Fe_3O_4@SiO_2	pTau	20.94	42
Mesop.Si@Fe_3O_4	pTau	22.87	46

2.5 Conclusiones

En este capítulo se han obtenido diferentes nanoestructuras magnéticas multifuncionales mediante la optimización de técnicas de síntesis húmeda tales como la co-precipitación, la descomposición térmica, microemulsión, absorción iónica, vía de la carbodiimida, hidrólisis forzada, cristalización del precipitado $Fe(OH)_2$ o solvotermal, con el fin de controlar el tamaño, composición, morfología o cristalinidad para así modular sus propiedades fisicoquímicas, tales como el comportamiento magnético, para ajustarlas a la aplicación biomédica requerida.

De este modo, se obtuvieron nanopartículas de un solo núcleo magnético (Fe_3O_4, Fe_2C_5 o Mn_3O_4), con diferentes comportamientos magnéticos (superparamagnético, ferromagnético o paramagnético) hasta nanoestructuras más complejas compuestas por uno o varios núcleos magnéticos (core@shell, huecas, entre otras). Ambas funcionalizadas con una cubierta biocompatible, tales como moléculas, polímeros u óxidos inorgánicos (citrato, ácido oleico, ácido aminoláurico, ácido poliacrílico, hidróxido de aluminio o sílice) que permitieron integrar, de manera estable, compuestos con actividad teragnóstica, como moléculas o biopolímeros fluorescentes (FITC o RITC o PDA), agentes biológicos (aptámeros o anticuerpos), agentes de contraste positivos, o T_1, (MNPs de Mn_3O_4), o negativos (MNPs de Fe_3O_4) para imagen por MRI o radiotrazadores para imagen PET (^{18}F o ^{89}Zr).

Por otra parte, las técnicas de caracterización: a) fisicoquímicas como microscopía electrónica (SEM, TEM, STEM), dispersión de luz dinámica (DLS), potencial zeta, difracción de rayos X (XRD), espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía de fluorescencia, microscopía confocal, termogravimetría (TGA), espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS), magnetometría de muestra vibrante (VSM) o magnetometría SQUID, junto con las de b) determinación de agentes biológicos (BCA o ELISA), realizadas a cada nanoestructura magnética diseñada, han permitido identificar y confirmar la nanoestructura deseada, conocer su estabilidad coloidal en medio acuoso y, además, determinar de manera cuantitativa y/o cualitativa el agente biológico integrado.

Bibliografía

1. T. Shabatina, O. I. Vernaya, V. P. Shabatin & M. Melnikov. Magnetic Nanoparticles for Biomedical Purposes: Modern Trends and Prospects. Magnetochemistry, 2020, 6, 30.

2. D. F. Liu, C. Qian, Y. L. An, D. Chang, S. Ju & G. Teng. Magnetic resonance imaging of post-ischemic blood-brain barrier damage with PEGylated iron oxide nanoparticles. Nanoscale, 2014, 6, 15161–15167.

3. Y. Wu, Z. Lu, Y. Li, J. Yang & X. Zhang. Surface Modification of Iron Oxide-Based Magnetic Nanoparticles for Cerebral Theranostics: Application and Prospection. Nanomaterials 2020, 10, 1441.

4. M. Angelakeris. Magnetic nanoparticles: A multifunctional vehicle for modern 90hell90tructu. Bioch. Et Biophys. Acta, 2017, 1861, 1642–1651.

5. J. Gao, H. Gu & B. Xu. Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications. Acc. Chem. Res. 2009, 42, 8, 1097–1107.

6. S. Savliwala et al. Chapter 13 – Magnetic nanoparticles. In Micro and Nano Technologies, Nanoparticles for Biomedical Applications, Elsevier, 2020, 195–221.

7. M. A. Airo et al. Synthesis and characterization of indium monoselenide nanosheets: A proposed pseudo top-down mechanism. J. Crystal. Growth, 2014, 406, 1–7.

8. E. Luque-Michel, L. Lemaire & M. Blanco-Prieto. SPION and doxorubicin-loaded polymeric nanocarriers for glioblastoma shell structure. Drug Deliv. And Transl. Res. 2021, 11, 515–523.

9. Y. Piñeiro, M. A. González Gómez, L. de Castro Alves, A. Arnosa Prieto, P. García Acevedo, R. Seco Gudiña, J. Puig, C. Teijeiro, S. Yáñez Vilar & J. Rivas. Hybrid Nanostructured Magnetite Nanoparticles: From Bio-Detection and Theragnostics to Regenerative Medicine. Magnetochemistry, 2020, 6, 4.

10. L. Ganapathe, M. Mohamed, R.Yunus & D. Berhanuddin. Magnetite (Fe_3O_4) Nanoparticles in Biomedical Application: From Synthesis to Surface Functionalisation. Magnetochemistry 2020, 6, 68.

11. J. Chang & E. R. Waclawik. Colloidal semiconductor nanocrystals: controlled synthesis and surface chemistry in organic media. RSC Adv. 2014, 4, 23505.

12. Q. Li et al. Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe_3O_4 nanoparticles. Sci Rep. 2017, 7, 9894.

13. Y. A. Koksharov. Chapter 6. Magnetism of Nanoparticles: Effects of Size, Shape, and Interactions. Wiley-VCH, 2009, 197–254.

14. A. Kolhatkar, A. Jamison, D. Litvinov, R. Willson & T. Lee. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. Int. J. Mol. Sci. 2013, 14, 15977–16009.

15. J. Wallyn, N. Anton & T. F. Vandamme. Synthesis, Principles, and Properties of Magnetite Nanoparticles for In Vivo Imaging Applications-A Review. Pharmaceutics, 2019, 11, 601.

16. R.M. Massart. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media, IEEE Trans. Magn. 1981, 17, 1247–1248.

17. S. Sun et al., Monodisperse Mfe_2O_4 (M= Fe, Co, Mn) Nanoparticles. J. AM. CHEM. SOC. 2002, 124, 8204–8205.

18. S. Tong, C. Quinto, L. Zhang, P. Mohindra & G. Bao. Size-Dependent Heating of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. ACS Nano, 2017, 11, 6808−6816.

19. B. McDonagh, C. Staudinger, P. Normile, J. De Toro, S. Bandyopadhyay, W. Glomm & G. Singh. New insights into controlling the twin structure of magnetic iron oxide nanoparticles. Applied Materials Today, 2021, 24, 101084.

20. V. Lamer & R. Dinegar Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. J. Am. Chem. Soc. 1950, 72, 11, 4847–4854.

21. Z.Fereshteh & M. Salavati.Niasari. Effect of ligand on particle size and morphology of nanostructures synthesized by thermal decomposition of coordination compounds. Adv. In Col. And Int. Sci., 2017, 243, 86–104.

22. J. Park, J. Joo, S. Kwon, Y. Jang & T. Hyeon. Synthesis of Monodisperse Spherical Nanocrystals. Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 4630–4660.

23. B. Cushing, V. Kolesnichenko & C. O'Connor. Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. Chem. Rev. 2004, 104, 3893–3946.

24. M. Nakaya, M. Kanehara & T. Teranishi. One-Pot Synthesis of Large FePt Nanoparticles from Metal Salts and Their Thermal Stability. Langmuir 2006, 22, 3485–3487.

25. M. Nakaya, R. Nishida & A. Muramatsu. Size Control of Magnetite Nanoparticles in Excess Ligands as a Function of Reaction Temperature and Time. Molecules 2014, 19, 11395–11403.

26. M. A. González-Gómez, S. Belderbos, S. Yañez-Vilar, Y. Piñeiro, F. Cleeren, G. Bormans, M. Deroose, W. Gsell, U. Himmelreich & J. Rivas. Development of superparamagnetic nanoparticles coated with polyacrylic acid and aluminum hydroxide as an efficient contrast agent for multimodal imaging. Nanomaterials. 2019, 9, 1626.

27. M. Nasrollahzadeh et al. Chapter 6 – Plant-Mediated Green Synthesis of Nanostructures: Mechanisms, Characterization, and Applications. Interface Science and Technology, Elsevier, 2019, 28, 199–322.

28. W. Borchardt-Ott. Crystallography: An Introduction. Springer, 2012, 280.

29. K. Subir, B. Moskowitz & B.M. Moskowitz. Chapter 2: Ferrimagnetic Properties of Magnetite. Book: Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms, A New Biomagnetism. Plenum Press. New York and London, 1995.

30. J. Mürbe, A. Rechtenbach & J. Töpfer. Synthesis and physical characterization of magnetite nanoparticles for biomedical applications. Materials Chemistry and Physics. 2008, 110, 426-433.

31. S. García-Jimeno, E. Escribano, J. Queralt & J. Estelrich. External magnetic field-induced selective biodistribution of magnetoliposomes in mice. Nanoscale Res. Lett. 2012; 7, 452.

32. A. Rajan, M. Sharma & N. Sahu. Assessing magnetic and inductive thermal properties of various surfactants functionalised Fe_3O_4 nanoparticles for hyperthermia. Sci. Rep. 2020, 10, 15045.

33. Q. Dai, M. Lam, S. Swanson, R. Yu, D. Milliron, T. Topuria, P. Jubert & A. Nelson. Monodisperse Cobalt Ferrite Nanomagnets with Uniform Silica Coatings. Langmuir. 2010, 26, 17546–17551.

34. D. J. Dunlop. Superparamagnetic and single-domain threshold sizes in magnetite. Journal of Geophysical Research, 1973, 78, 1780–1793.

35. K. Subir, B. Moskowitz & B. Moskowitz. Chapter 2: Ferrimagnetic Properties of Magnetite. Book: Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms, A New Biomagnetism. Plenum Press. New York and London, 1995.

36. L. Ganapathe, M. Mohamed, R. Yunus & D. Berhanuddin. Magnetite (Fe3O4) Nanoparticles in Biomedical Application: From Synthesis to Surface Functionalisation. Magnetochemistry 2020, 6, 68.

37. G.F. Goya, T.S. Berquo & F.C. Fonseca. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. J. Appl. Phys. 2003, 94, 3520–3528.

38. J. Park et al. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. Nat. Mater. 2004, 3, 891–895.

39. M. F. Hansen & S. Mørup. Estimation of blocking temperatures from ZFC/FC curves. J. Magn. Magn. Mater. 1999, 203, 214–216.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

40. G. Salazar-Alvarez et al. Cubic versus Spherical Magnetic Nanoparticles: The Role of Surface Anisotropy. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 13234–13239.

41. T. Sugimoto & E. Matijevic. Formation of Uniform Spherical Magnetite Particles by Crystallization from Ferrous Hydroxide Gels. J. Colloid Interface Sci. 1980, 74, 227–245.

42. D. Kim, N. Lee, M. Park, B. Kim, K. An, & T. Hyeon. Synthesis of Uniform Ferrimagnetic Magnetite Nanocubes. J. AM. CHEM. SOC. 2009, 131, 454–455.

43. R. Nisticò, F. Cesano & F. Garello. Magnetic Materials and Systems: Domain Structure Visualization and Other Characterization Techniques for the Application in the Materials Science and Biomedicine. Inorganics 2020, 8, 1–59.

44. X. Lin, G. Ji, Y. Liu, Q. Huang, Z. Yang & Y. Du. Formation mechanism and magnetic properties of hollow Fe_3O_4 nanospheres synthesized without any surfactant. CrystEngComm. 2012, 14, 8658–8663.

45. S. Peng & S. Sun. Synthesis and Characterization of Monodisperse Hollow Fe_3O_4 Nanoparticles. Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 4155–415.

46. M. Rabiei et al. Comparing Methods for Calculating Nano Crystal Size of Natural Hydroxyapatite Using X-Ray Diffraction. Nanomaterials, 2020, 10, 1627.

47. T. A. Cowger et al. Casein-Coated Fe_5C_2 Nanoparticles with Superior r_2 Relaxivity for Liver-Specific Magnetic Resonance Imaging. Theranostics, 2015, 5, 1225–1232.

48. H. Cha, Y. Kim, C. Kim & Y. Kang. Synthesis and characteristics of NdFeB magnetic nanoparticles, IEEE Nanotechnology Materials and Devices Conference, 2006, 656–665.

49. G. Huang, J. Hu, H. Zhang, Z. Zhou, X. Chib & J. Gao. Highly magnetic iron carbide nanoparticles as effective T_2 contrast agents. Nanoscale, 2014, 6, 726–730.

50. C.S. Kuivila, J.B.Butt & P.C.Stair. Characterization of surface species on iron synthesis catalysts by X-ray photoelectron spectroscopy. 1988, 32, 99–121.

51. A.V. Shchukarev & D.V. Korolkov. XPS Study of Group IA Carbonates. CEJC, 2004, 2, 347–362.

52. C. Yang, H. Zhao, Y. Hou & D. Ma. Fe_5C_2 Nanoparticles: A Facile Bromide-Induced Synthesis and as an Active Phase for Fischer−Tropsch Synthesis. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 15814–15821.

53. A. P. Grosvenor, B. A. Kobe, M. C. Biesinger & N. S. McIntyre. Investigation of multiplet splitting of Fe 2p XPS spectra and bonding in iron compounds. Surf. Interface Anal. 2004, 36, 1564–1574.

54. W. Ge, W. Gao, J. Zhu & Y. Li. In situ synthesis of Hagg iron carbide (Fe_5C_2) nanoparticles with a high coercivity and saturation magnetization. Journal of Alloys and Compounds, 2019, 781, 1069–1073.

55. X. Cai et al. Manganese Oxide Nanoparticles as MRI Contrast Agents in Tumour Multimodal Imaging and Therapy. International Journal of Nanomedicine, 2019,14.

56. N. Zhao, W. Nie, X. Liu, S. Tian, Y. Zhang & X. Ji, Shape and Size Controlled Synthesis and Dependent Magnetic Properties of Nearly Monodisperse Mn_3O_4 Nanocrystals. Small, 2008, 4, 77–81.

57. B. Boucher, R. Buhl & M. Perrin. Journal of Physics and Chemistry of Solids. Proprietes et structure magnetique de Mn_3O_4. 1971, 32, 2429–2437.

58. J. Costa-Kramer, F. Briones, J. Fernández, A. Caballero, M. Villegas, M. Díaz, M. García & A. Hernando. Nanostructure and magnetic properties of the MnZnO system, a room temperature magnetic semiconductor. Nanotechnology, 2005, 16, 214–218.

59. N. Hoshyar, S. Gray, H. Han & G. Bao. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. Nanomedicine, 2016, 11, 673–692.

60. Y. Jun et al. Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilisation for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127, 5732–5733.

61. M. Ledda et al. Biocompatibility assessment of sub-5 nm silica-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in human stem cells and in mice for potential application in nanomedicine. Nanoscale, 2020, 12, 1759–1778.

62. H. Peng, Z. Yening & H. Zhongyu. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. Hum Vaccin Immunother. 2015, 11, 477–488

63. Y. Fang, W. Loc, W. Lu & J. Fang. Synthesis of In_2O_3@SiO_2 Core-Shell Nanoparticles with Enhanced Deeper Energy Level Emissions of In_2O_3. Langmuir, 2011, 27, 14091–14095.

64. W. Stober & A. Fink. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. J. Colloidal Interface Sci. 1968, 26, 62–69.

65. H.-S. Roh, G.-K. Choi., J.-S. An, C.-M. Cho, D.-H. Kim, I.-J. Park, T.-H. Noh, D.-W. Kim & K.-S. Hong, Size-controlled synthesis of monodispersed mesoporous a-Alumina spheres by a template-free forced hydrolysis method, Dalton Trans. 2011, 40, 6901.

66. K. Chitra & G. Annadurai. Fluorescent Silica Nanoparticles in the Detection and Control of the Growth of Pathogen. J. Nanotechnol. 2013, 1−7.

67. P. Fu, W. Lu, W. Lei, K. Wu, Y. Xu & J. Wu. Thermal Stability and Microstructure Characterization of $MgAl_2O_4$ Nanoparticles Synthesized by Reverse Microemulsion Method. Mater. Res. 2013, 16, 844–849.

68. Y. L. Wang, J. Bao, L. Wang, F. Zhang & Y.D. Li. One-Pot Synthesis and Bioapplication of Amine-Functionalized Magnetite Nanoparticles and Hollow Nanospheres. Chem. Eur. J. 2006, 12, 6341–6347.

69. J. M. Liñeira del Río, E. R. López, M. González Gómez, S. Yáñez Vilar, Y. Piñeiro, J. Rivas, D. E. P. Gonçalves, J. H. O. Seabra & J. Fernández. Tribological Behavior of Nanolubricants Based on Coated Magnetic Nanoparticles and Trimethylolpropane Trioleate Base Oil. Nanomaterials, 2020, 10, 683.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

70. R. Seco, S. Yáñez, M. A. González, Z. Vargas, M. de la Fuente, Y. Piñeiro Redondo, R. López & J. Rivas. Versatile mesoporous nanoparticles for cell applications. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2021, 21, 2824–2833.

71. S. Vasudevan, B. Kannan, J. Lakshmi, S. Mohanraj & G. Sozhan. Effects of alternating and direct current in electrocoagulation process on the removalof fluoride from water. J. Chem. Technol. Biotechnol. 2011, 86, 428–43.

72. Z. Lu, Y. Xu & S. Zhou. High saturation magnetization superparamagnetic Fe/Ni core/shell microparticles for chromium removal. RSC Adv. 2017, 7, 42363–42369.

73. N. Chekina et al. Fluorescent magnetic nanoparticles for biomedical applications. J. Mater. Chem. 2011,21, 7630–7639.

74. Z. Lin, S. Luo, D. Xu, S. Liu, N. Wu, W. Yao, X. Zhang, L. Zhenga, & X. Lin. Silica-polydopamine hybrids as light-induced oxidase mimics for colorimetric detection of pyrophosphate. Analyst, 2020,145, 424–433.

75. S. Wu, Z. Li, J. Han & S. Han. Dual colored mesoporous silica nanoparticles with pH activable rhodamine-lactam for ratiometric sensing of lysosomal acidity. Chem. Commun., 2011, 47, 11276–11278.

76. Z. Vargas-Osorio, A. Da Silva-Candal, Y. Piñeiro, R. Iglesias-Rey, T. Sobrino, F. Campos, J. Castillo & J. Rivas. Multifunctional Superparamagnetic Stiff Nanoreservoirs for Blood Brain Barrier Applications. Nanomaterials, 2019, 9, 449, 1–22.

77. A. Williams & I.T. Ibrahim. Carbodiimide chemistry: recent advances. Chem. Rev. 1981, 81, 589–636.

78. S. Puertas, P. Batalla, M. Moros, E. Polo, P. del Pino, J. Guisán, V. Grazú & J. M. de la Fuente. Taking Advantage of Unspecific Interactions to Produce Highly Active Magnetic Nanoparticle-Antibody Conjugates. ACS Nano, 2011, 5, 4521–4528.

79. S-Y. Lin & H-L. Chu. Fourier transform infrared spectroscopy used to evidence the prevention of β-sheet formation of amyloid β (1–40) peptide by a short amyloid fragment. Int. J. of Biol. Macromolecules, 2003, 32, 173–177.

80. User Guide: Micro BCA Protein Assay Kit. ThermoFisher Scientific..

81. W. Xia, T. Yang, G. Shankar, I.M. Smith, Y. Shen, D.M. Walsh & D.J. Selkoe, A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease. Arch. Neurol. 2009, 66, 190–199.

82. J. M. Berg, J. L. Tymoczko & L. Stryer. Section 4.3: Immunology Provides Important Techniques with Which to Investigate Proteins. Biochemistry. 5th edition. 2002, New York: W H Freeman.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. Aplicaciones

Los resultados presentados en el este capítulo, están relacionados con las siguientes publicaciones (los permisos de uso de las publicaciones se encuentran en el anexo III de esta Tesis Doctoral):

- M.A. González-Gómez, S. Belderbos, S. Yañez-Vilar, Y. Piñeiro, F. Cleeren, G. Bormans, M. Deroose, W. Gsell, U. Himmelreich & J. Rivas. Development of superparamagnetic nanoparticles coated with polyacrylic acid and aluminum hydroxide as an efficient contrast agent for multimodal imaging. Nanomaterials 2019, 9(11), 1626: p. 1-20. (IF: 4.324, Q2). https://doi.org/10.3390/nano9111626.
Mi contribución fue la investigación y desarrollo de los nanomateriales magnéticos.

- S. Belderbos, M.A. González-Gómez, F. Cleeren, J. Wolters, Y. Piñeiro, C.M. Deroose, A. Coosemans, W. Gsell, G. Bormans, J. Rivas & U. Himmelreich, Simultaneous in vivo PET/MRI using fluorine-18 labeled Fe3O4@Al(OH)3 nanoparticles: Comparison of nanoparticle and nanoparticle-labeled stem cell distribution. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag. Res. 2020, 10(1), 73: p.1-13. (IF: 2.733, Q2).
https://doi.org/10.1186/s13550-020-00655-9.
Mi contribución fue la investigación, desarrollo y análisis de las nanoestructuras magnéticas utilizadas.

3.1 Estudios preliminares de la interacción de nanoestructuras multifuncionales en medios de interés biológico

Dado que la interacción de MNPs con medios biológicos, ya sea para aplicaciones in vitro como in vivo, plantean problemas que reducen su eficacia como agentes teragnósticos o sondas transductoras (falta de estabilidad coloidal, agregación inespecífica, toxicidad, bajo contraste en MRI, ineficiencia del radiomarcaje o dando lugar a una respuesta magnética débil ante dispositivos magnéticos externos). En este capítulo se incluyen diferentes estudios preliminares de nanoestructuras magnéticas, tales como su estabilidad coloidal en soluciones dispersantes complejas o medios biológicos, su toxicidad in vitro, habilidad para cruzar barreras biológicas o su eficiencia tanto para contraste en MRI en phantoms o en el radiomarcaje con los radioisótopos ^{18}F o ^{89}Zr). El objetivo de esta sección es establecer los parámetros óptimos para el diseño de MNPs que permitan soslayar los principales problemas de las aplicaciones biomédicas (falta de estabilidad coloidal, toxicidad y bajo contraste tanto en MRI como en PET).

3.1.1 Estabilidad coloidal de nanoestructuras magnéticas en disolventes con composición biocompatibles

La estabilidad coloidal de una partícula viene determinada por la carga de su superficie externa y el medio en el que está embebida, entre los que se establece un potencial eléctrico, llamado potencial zeta o potencial electrocinético. La estabilidad coloidal de las MNPs desnudas o bioconjugadas es esencial para desarrollar diferentes procedimientos de estudio (ensayos de toxicidad in vitro, tests Elisa, estudios de transfección, magnetofección etc.). El disolvente de uso habitual para ensayos biológicos es por defecto el tampón fosfato salino

(conocido por sus siglas en inglés PBS), que pese a ser muy versátil por su respuesta inocua a nivel biológico, presenta desde el punto de vista fisicoquímico una desventaja importante: reduce considerablemente a la estabilidad coloidal de NPs en suspensión. Por ello, y dados los problemas de agregación observados en dispersiones de NPs con diferentes tipos de cubiertas (SiO_2, PAA, PDA, $Al(OH)_3$, entre otras) o bioconjugadas con moléculas biológicas (aptámeros, anticuerpos, etc.) se desarrollaron una serie de disolventes de carácter zwiteriónico o estabilizantes y de uso en el ámbito biológico. Se desarrollaron mezclas de diferentes composiciones combinando distintas concentraciones de betaina, HEPES, glucosa, PBS o agua de grado biológico, con en el fin de incrementar la estabilidad coloidal de diferentes nanoestructuras y evitar problemas de agregación.

a Determinación de la estabilidad coloidal de las nanoestructuras magnéticas de tipo core@shell en solución buffer betaina-glucosa

La principal finalidad de este estudio fue optimizar la estabilidad coloidal de NPs compuestas por Fe_3O_4@SiO_2 y bioconjugadas con aptámero $Rgen3K(KLVFF)_{16}$ dispersas en una mezcla de base acuosa. Para ello, se estudió su estabilidad mediante el análisis con DLS en mezclas de agentes estabilizantes, betaína y glucosa. Estos dos compuestos biocompatibles son comúnmente utilizados para reducir la tensión superficial, mediante la disminución de las fuerzas atractivas de Van der Waals entre las partículas, facilitando de esta forma una buena dispersión coloidal[1,2].

En primer lugar, se procedió a la evaluación de la estabilidad de las MNPs bioconjugadas resuspendidas en una disolución acuosa de betaína a diferentes concentraciones (figura 3.1). Para llevar a cabo este estudio, en un eppendorf se adicionan 100 µL de la disolución de betaína seleccionada a 50 µg de las nanoestructuras magnéticas bioconjugadas y se someten a sonicación durante dos minutos. A continuación, los eppendorf conteniendo las muestras se colocan en un soporte y pasadas dos horas, se valora visualmente el nivel de floculación.

Se aprecia (figura 3.1) que a medida que aumentamos la concentración de betaína el incremento de la estabilidad de las nanoestructuras magnéticas bioconjugadas mejora notablemente (imagen D)

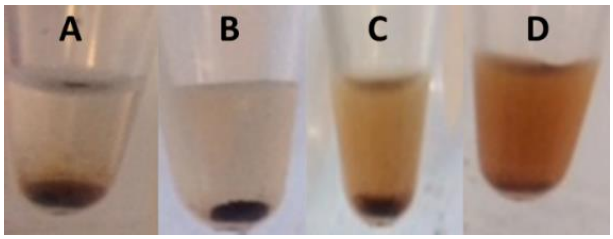


Figura 3.1: Fotografías tomadas dos horas después de resuspender las MNPs bioconjugadas en una disolución acuosa con diferentes concentraciones de betaína a: 0 (A), 1 (B), 10 (C) y 100 (D) $mg \cdot mL^{-1}$.

Una vez obtenida la concentración óptima de betaína en disolución, se realizó una mezcla de soluciones para mejorar la estabilidad coloidal de las MNPs bioconjugadas, añadiendo glucosa, a una concentración de 0.1 $mg \cdot mL^{-1}$.

En la figura 3.2 se muestran las imágenes de la comparativa de mezclas conteniendo diferentes composiciones con betaína y glucosa tras dos horas de preparación de la disolución.

En las fotografías, se puede observar que las nanoestructuras resuspendidas en la disolución acuosa que contiene betaína y glucosa (imagen C) poseen una mayor dispersión coloidal que las restantes disoluciones. Esto se debe a la formación de puentes de hidrógeno entre los anillos de la glucosa y el agente zwiteriónico con los grupos funcionales del aptámero, rodeando a toda la NP, evitando de esta forma la agregación y su posterior floculación[2].

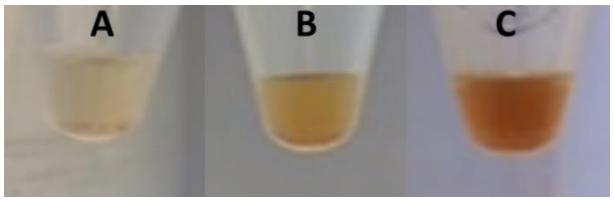


Figura 3.2: Fotografías tomadas dos horas después de resuspender las MNPs bioconjugadas en una disolución acuosa de: betaína a 100 mg·mL^{-1} (A), glucosa a 0.1 mg·mL^{-1} (B) y la mezcla de ambos agentes estabilizantes (C).

La estabilidad coloidal se estudió más detalladamente mediante DLS y la compilación de los tamaños obtenidos para diferentes NPs dispersas en agua o en mezclas betaína-glucosa se reportan en la tabla 3.1.

Los valores obtenidos de DLS de las nanoestructuras magnéticas, tanto desnudas como bioconjugadas resuspendidas en el buffer betaína-glucosa, indicaron poseer un grado de agregación más bajo, donde además el tamaño hidrodinámico, D_h, es semejante al tamaño obtenido mediante TEM. Además, el valor del potencial zeta, por debajo de −30 mV, garantiza estabilidad coloidal y ausencia de agregación, ya que este rango de valores negativos resulta de las fuerzas repulsivas entre NPs[3].

En el caso de las MNPs bioconjugadas, el potencial zeta es positivo (9.4 mV), debido a los grupos aminos presentes en el aptámero. Además, se aprecia un incremento en el valor de tamaño hidrodinámico de aproximadamente 200 nm debido al tamaño del aptámero anclado en la superficie de las MNPs, que además en un medio acuoso se hidrata y se encuentra en conformación más expandida. Se observa que la polidispersidad en la dispersión con mezcla de betaína con glucosa, es la mitad que la de la dispersión en agua. De hecho, el valor de PDI=0.3 para las partículas bioconjugadas disueltas en la mezcla, es un valor aceptable para aplicaciones in vivo[4].

Tabla 3.1 Valores promedios de los tamaños hidrodinámicos, potencial zeta y PDI de las MNPs con y sin funcionalizar con el aptámero en medio acuoso y buffer.

NP	D_h (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
$Fe_3O_4@SiO_{2\text{-agua}}$	58.9 ± 19.0	0.2	−36 ± 7
$Fe_3O_4@SiO_{2\text{-buffer}}$	46.2 ± 9.1	0.2	−33 ± 6
$Fe_3O_4@SiO_2$-$Rgen3(KLVFF)_{16\text{-agua}}$	979.5 ± 238.2	0.6	11 ± 5
$Fe_3O_4@SiO_2$-$Rgen3(KLVFF)_{16\text{-buffer}}$	252.2 ± 170.1	0.3	9 ± 7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

b Determinación de la estabilidad coloidal de las nanoestructuras magnéticas fluorescentes de tipo core@shell en mezclas biocompatibles complejas

Para mejorar la estabilidad coloidal de NPs de $Fe_3O_4@SiO_2$-RITC-SiO_2 bioconjugadas con el mAb pTau, se prepararon diferentes disoluciones acuosas, a pH fisiológico preparadas con

diferentes componentes adecuados para el uso en medios celulares y la preservación de la actividad biológica de los anticuerpos:

-Glucosa (0.1 $mg \cdot mL^{-1}$), utilizada como agente estabilizante de NPs en medios acuosos, disminuyendo las fuerzas de atracción entre ellas[2].

-L-glutamina (L-Glu, 0.1 $mg \cdot mL^{-1}$), simulando de manera superficial las condiciones biológicas, ya que es el aminoácido más abundante en el organismo[5].

-HEPES (50 mM), un buffer zwiteriónico comúnmente utilizado como agente estabilizante de NPs, ya que es capaz de superar las fuerzas atractivas de Van der Waals entre las partículas a través de fuerzas repulsivas electroestáticas y estéricas determinadas por los iones adsorbidos y los contraiones asociados[6].

-PBS (10 mM), tampón utilizado para simular las condiciones de concentración iónica existentes en condiciones biológicas[7].

Para llevar a cabo este estudio, en un eppendorf se adicionan 100 µL de la disolución acuosa seleccionada a 50 µg de las nanoestructuras magnéticas bioconjugadas y se somete a sonicación durante dos minutos. A continuación, los eppendorf son colocados en un soporte y pasadas 24 horas, se estima visualmente el nivel de floculación encontrado.

Como puede observarse en las fotografías tomadas tras el tiempo de espera (figura 3.3), se aprecia una mayor estabilidad coloidal en las nanoestructuras bioconjugadas redispersas en agua que contienen los agentes estabilizantes glucosa y L-Glu, en donde no se observa floculación. Sin embargo, para las restantes disoluciones acuosas que contienen HEPES o PBS, independiente de si tienen otro tipo de agentes estabilizantes, se aprecia la precipitación de los bioconjugados.

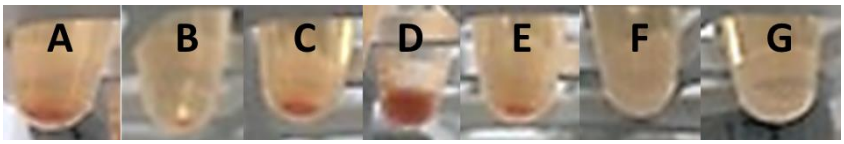


Figura 3.3: Fotografías tomadas 24 h después de resuspender las MNPs bioconjugadas en una disolución acuosa de: HEPES (A), HEPES-glucosa (B), HEPES-L-Glu (C), PBS (D), HEPES-glucosa-L-Glu (E), glucosa-L-Glu (F) y glucosa (G).

Mediante DLS se realizó un estudio detallado de la estabilidad en las diferentes mezclas, y los tamaños hidrodinámicos junto con el índice de polidispersidad, reportados en la tabla 3.2. Se observa que aquellas mezclas que contienen HEPES y PBS poseen los valores de PDI más elevados (PDI= 0.4-0.6), indicando una distribución muy polidispersa, con presencia de agregados[8]. Las restantes mezclas presentan unos valores de PDI de 0.2, valor relacionado a una buena dispersión coloidal.

Adicionalmente, se aprecia una disminución del valor del potencial zeta de las MNPs una vez bioconjugadas en comparación con las no bioconjugadas. Este hecho demuestra la presencia del mAb en la superficie de estas MNPs, ya que la estructura de las glucoproteínas presenta tanto grupos positivos ($-NH_2$) como negativos (-SH, -COOH) que modifican la carga superficial de las MNPs[9].

Tabla 3.2 Valores promedios de los tamaños hidrodinámicos, potencial zeta y PDI de las MNPs con y sin funcionalizar con el mAb pTau en medio acuoso y en disoluciones acuosas especiales.

NP		D_h (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
Fe_3O_4@SiO_2-RITC-$SiO_{2\text{-agua}}$	Control (sin mAb)	49.4 ± 17.1	0.2	-37 ± 5
Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2-mAb$_{\text{-agua}}$	Control (con mAb)	132.1 ± 49.4	0.2	-6 ± 5
Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2-mAb$_{\text{-HEPES+glucosa}}$	B	99.9 ± 61.9	0.4	-4 ± 2
Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2-mAb$_{\text{-glucosa}}$	G	90.2 ± 38.2	0.2	-6 ± 3
Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2-mAb$_{\text{-glucosa+L-Glu}}$	F	91.5 ± 39.3	0.2	-5 ± 4
Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2-mAb-$_{\text{HEPES+glucosa+L-Glu}}$	E	103.9 ± 73.6	0.4	-4 ± 5
Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2-mAb$_{\text{-HEPES+L-Glu}}$	C	150.6 ± 99.5	0.4	-5 ± 3
Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2-mAb$_{\text{-HEPES}}$	A	249.4 ± 70.1	0.4	-7 ± 3
Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2-mAb$_{\text{-PBS}}$	D	3189 ± 770	0.6	-2 ± 3

3.1.2 Estudios de la toxicidad in vitro

Una vez establecidas las condiciones fisicoquímicas óptimas para manejar nanoestructuras con estabilidad coloidal aceptable, se analizar su actividad biológica. La comprobación del nivel de citotoxicidad que presenta un nanomaterial es un factor limitante que condicionará su uso en aplicaciones biomédicas.

En general, la interacción célula-NPs promueve procesos de internalización celular de las NPs por endocitosis[10], bien sea mediada por un receptor (NPs bioconjugadas con anticuerpos monoclonales, por ejemplo) o inespecífica (tamaño hidrodinámico, cargas superficiales, polímeros flexibles, etc.).

En este apartado, se describen las pruebas de citotoxicidad realizadas exponiendo diferentes líneas celulares (células madre mesenquimales de ratón, mMSCs, y células de neurona cortical, Neurona), a las nanoestructuras detalladas en la tabla 3.3. El interés en escoger estas dos líneas celulares es porque:

- las células mMSCs, están presentes en todo el cuerpo humano y son relevantes para desarrollos en medicina regenerativa por su baja inmunogenicidad y la posibilidad de manejo genético[11,12];

- las neuronas, que por su elevada sensibilidad ante exposición a compuestos tóxicos son utilizadas habitualmente para evaluar los efectos de fármacos o tóxicos en el organismo[13,14].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3.3 Evaluación de la toxicidad de las MNPs con sus respectivas líneas celulares.

NP	Línea celular
Fe_3O_4@$Al(OH)_3$	mMSCs
Fe_3O_4@PAA	Neurona
Fe_3O_4@PAA-anti-pTau	Neurona
Fe_3O_4@$Al(OH)_3$-anti-pTau	Neurona

Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2-anti-pTau	Neurona
mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2]@RITC)-anti-pTau	Neurona

Los ensayos de toxicidad con células mMSCs fueron realizados en el laboratorio MoSAIC de la Universidad Católica de Lovaina con líneas celulares suministradas por su laboratorio de Biología y Embriología. Estas fueron cultivadas e incubadas en medio de cultivo DMEM-GlutaMax suplementado con 15 % de FBS y 1 % de penicilina-estreptavidina. Para el estudio de toxicidad, se utilizaron $1 \cdot 10^5$ células.

Por otra parte, los ensayos de toxicidad con neuronas fueron realizados en el grupo de Neurobiología Molecular del Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad de Salamanca (USAL). Se cultivaron a partir de ratones fetales C57BL/6 de 15.5 días de gestación; con un sembrado de $2.0 \cdot 10^5$ células$\cdot cm^{-2}$ en placas de plástico de 24 pocillos recubiertas con poli D-lisina (10 $\mu g \cdot mL^{-1}$) e incubadas en medio Neurobasal ™ suplementado con 2 mM de glutamina y B27 al 2 %.

Ambas líneas celulares, fueron mantenidas a 37ºC bajo atmósfera húmeda al 21 % O_2 y 5 % CO_2. A las 72 horas después del sembrado en placa, el medio de cultivo se reemplazó por medio de cultivo fresco. Las neuronas se utilizaron en el día 8-9 después de su congelación[15].

El análisis de la toxicidad con células mMSCs se realizó por viabilidad celular, mediante dos procedimientos:

1) por recuento de células vivas íntegras por exclusión del azul de tripano, después de incubar $1 \cdot 10^5$ células mMSCs con diferentes concentraciones de MNPs durante 12 h;

2) por un estudio de proliferación celular a largo plazo de las mMSCs marcadas con MNPs, que se realizó tras la incubación de las células con las MNPs con diferentes concentraciones durante 12 h, seguida de una incubación con medio fresco durante los 2 y 6 primeros días. La inhibición de la proliferación celular se utilizó como indicador de efectos potencialmente tóxicos, el tiempo de duplicación celular[16] (T_d) se determinó siguiendo la siguiente ecuación:

$$T_d = \frac{t\ x \ln(2)}{\ln(\frac{A}{A0})}$$

Dónde *t* es el tiempo de recuento de las dos poblaciones celulares, A es el número de células al final de la incubación, y A0 es el número inicial de células. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

El estudio de la toxicidad llevado a cabo con neuronas, se evaluó mediante tres procedimientos:

1) la actividad de la caspasa-3 se midió de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de ensayo fluorimétrico caspasa-3, Sigma-Aldrich). La actividad de las caspasa-3 se calculó a partir de la intensidad de la fluorescencia emitida (λ_{em}= 460 nm);

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2) la apoptosis neuronal se cuantificó mediante citometría de flujo, en donde éstas fueron separadas cuidadosamente de las placas mediante una disolución de la sal tetrasódica EDTA (1 mM) en PBS (pH 7.4) y posteriormente se tiñeron con anexina V y 7-amino-actinomicina D (7-AAD) en buffer HEPES (100 mM). Las neuronas teñidas con anexina V que fueron negativas en 7-AAD, también se consideraron apoptóticas[17];

3) el potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) se evaluó mediante el uso de un kit de ensayo MitoProbe DilC1 para citometría de flujo (con una línea láser de 488 nm), siguiendo las instrucciones del fabricante (ThermoFischer). Las neuronas se incubaron con la tinción fluorescente a 37 ºC durante 30 min. Los valores del potencial ΔΨm fueron expresados en porcentaje, usando carbonilcianuro-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona (CCCP, 10 µM) durante 15 min para definir el valor del 0 % [17];

4) el estrés oxidativo se evaluó por la producción mitocondrial del anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) usando un indicador-colorante fluorogénico que se dirige específicamente a las mitocondrias de las neuronas vivas (MitoSox, ThermoFischer). Las neuronas se incubaron con este indicador (2 µM) durante 30 min a 37 ºC. Seguido de un lavado con PBS (pH 7.4) y posterior separación de las neuronas de las placas mediante el uso de EDTA (1 mM). La fluorescencia del MitoSox se evaluó mediante citometría de flujo, utilizándose antimicina A (AA, 10 mM) como control positivo. Los resultados se expresan como generación relativa de especies reactivas de oxígeno (ROS) al control (0 $\mu g \cdot mL^{-1}$ de contenido de sólidos)[18].

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Las comparaciones entre los grupos se estudiaron mediante un ANOVA unidireccional con Bonferroni para comparar valores entre varios grupos. A partir de $p < 0.05$ se consideró significativo.

La localización y visualización de las nanoestructuras magnéticas fluorescentes, Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2-anti-pTau, en las neuronas se realizó mediante inmunocitoquímica por microscopía confocal. Para ello, las neuronas se fijaron en un portaobjetos de vidrio con paraformaldehido (4 % vol/vol en PBS) durante 30 min. Se procedió a hacer una tinción inmunológica usando un anticuerpo de ratón (anti-Map2), como marcador neuronal (con emisión en el verde) y con el marcador nuclear (DAPI, con emisión en el azul). El inmunomarcaje se detectó mediante el uso de un anticuerpo secundario de ratón con emisión en verde (anti-IgG-Cy2). Posteriormente los portaobjetos se lavaron y se les adicionó el reactivo antidecoloración SlowFade (Invitrogen) seguida de la exploración de la muestra por microscopía.

En células mMSCs, se muestran los porcentajes de viabilidad celular en la figura 3.4. En la gráfica A de esta figura, se aprecia que la viabilidad celular decae por debajo del 80 % a concentraciones superiores a los 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$, dicho valor es establecido como umbral para determinar si un determinado sistema resulta tóxico en una línea celular[19]. Por otra parte, en la gráfica B, se muestra la proliferación celular tras una exposición de 12 h con MNPs y posteriormente, a estas células se le renovó el medio (libre de MNPs), cultivándose un grupo hasta 2 días y el otro hasta 6 días, dando como resultado un crecimiento positivo en comparación con el control.

Ambos resultados demuestran la ausencia de efectos secundarios adversos de viabilidad celular a concentraciones altas, hasta 10 µg·mL^{-1}, presentando citotoxicidades más bajas que estudios previos realizados con otras MNPs[20,21].

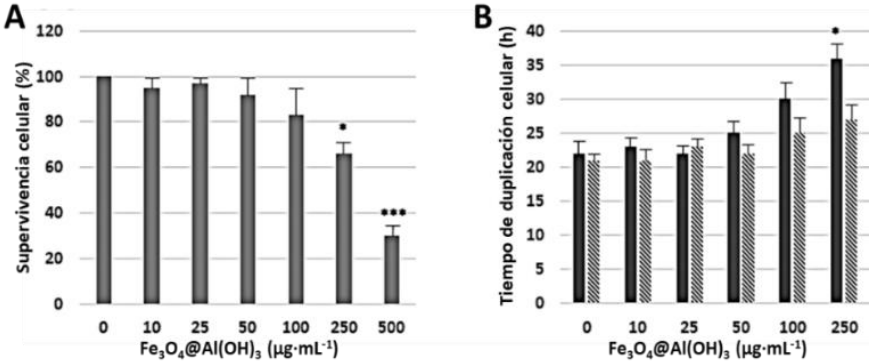


Figura 3.4: Viabilidad celular normalizada con las mMCs no marcadas con MNPs (control, 0 µg·mL^{-1}) (A), generación celular tras la incubación de las células con MNPs durante 2 días (barra sólida) y 6 días (barra a rayas) (B). * p <0.05 y *** p <0.001. Imagen adaptada de la ref. 65. Copyright (2021) con permiso de MDPI.

Asimismo, la activación de la proteína caspasa-3, que pertenece a la familia de las proteasas residuales (cisteína-aspartato), es un indicador de la iniciación de la fase de apoptosis celular[22,23]. Por este motivo, el uso de la proteína caspasa-3 es de gran interés en estudios de biocompatibilidad in vitro donde están involucradas MNPs, ya que son un indicativo de la apoptosis celular.

En la figura 3.5, se muestran los resultados de los ensayos de toxicidad en neuronas marcadas con diferentes concentraciones de NPs de Fe_3O_4@PAA y Fe_3O_4@$Al(OH)_3$, tras una incubación de 24 h. La activación de la caspasa-3 (utilizado como control positivo), se llevó a cabo por la incubación de las neuronas con proteína beta-amiloide (10 µM), ya que esta proteína, como se dijo anteriormente, inicia la apoptosis mitocondrial que conduce a la activación secuencial de las caspasas, incluida la caspasa-3[24].

La determinación de la actividad de caspasa-3 reveló que las MNPs de Fe_3O_4@PAA (gráfica A) no presentan citotoxicidad neuronal a concentraciones inferiores a 50 µg·mL^{-1}. Sin embargo, a concentraciones superiores hubo activación de caspasa-3. Esta toxicidad puede estar asociada por el recubrimiento con PAA, que a pesar de ser químicamente versátil como material de cubierta que facilita los procedimientos de bioconjugación, estudios previos demuestran que promueve la aceleración de la apoptosis celular de neutrófilos humanos a concentraciones altas[25].

Por otra parte, la actividad de la caspasa-3 por las MNPs de Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ (gráfica B), no se activó hasta concentraciones superiores a los 100 µg·mL^{-1}, que concuerda con la viabilidad celular para células mMSCs. En general, los resultados de biocompatibilidad obtenido para las NPs con cubierta de hidróxido de aluminio, corrobora el hecho de que su uso esté aprobado como adyuvante en administración de vacunas[26,27].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

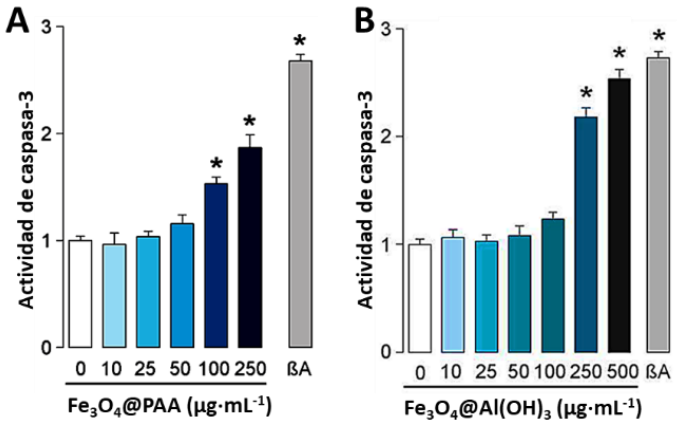


Figura 3.5: Toxicidad de las neuronas por determinación de la actividad de la caspasa-3 como marcador de la apoptosis celular marcadas con MNPs: Fe_3O_4@PAA (A) y Fe_3O_4@Al(OH)$_3$ (B) tras la incubación de las neuronas con MNPs durante 24 h. Comparadas con las neuronas sin marcar (control, 0 µg·mL^{-1}) y con neuronas tratadas con ß-amiloide (ßA, control positivo). * p <0.05.

Se evaluó también la citotoxicidad de las MNPs bioconjugadas, mediante la actividad de la caspasa-3, para valorar el efecto biológico de los anticuerpos. Los resultados obtenidos (figura 3.6), muestran que tanto el mAb anti-pTau como las MNPs bioconjugadas de Fe_3O_4@Al(OH)$_3$ no desencadenan actividad de la caspasa-3, que conlleve a una apoptosis de las neuronas, en ninguna de las concentraciones testadas durante 24 h.

Por otra parte, se observó una apoptosis neuronal a partir de concentraciones superiores a los 100 µg·mL^{-1} tanto en las MNPs de Fe_3O_4@PAA-anti-pTau, como en las de Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2-anti-pTau (gráficas B y D, respectivamente). Sin embargo, el aumento más visible de la actividad de la caspasa-3, se observó en los ensayos citotóxicos con las nanoestructuras mesoporosas de sílice bioconjugadas

Por último, si se comparan los resultados de citotoxicidad de las nanoestructuras magnéticas con diferentes tipos de sílice:

- amorfa (Fe_3O_4@SiO_2-RITC-anti-pTau);
- ordenada (mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2]@RITC-anti-pTau).

Se observa que las nanoestructuras mesoporosas de sílice bioconjugadas provocan apoptosis neuronal a concentraciones más bajas que las compuestas por sílice amorfa. Este hecho, se debe a factores como el tamaño, morfología o porosidad que afectan a la toxicidad en células[28].

Trabajos previos, han demostrado que las partículas de sílice mesoporosas, tienden a ser más citotóxicas que las que presentan sílice amorfa[29,30], pues poseen un mayor número de sitios activos para capturar moléculas de oxígeno y generar especies reactivas ROS[30-32], provocando de esta forma una apoptosis neuronal a concentraciones más bajas que las restantes nanoestructuras testadas.

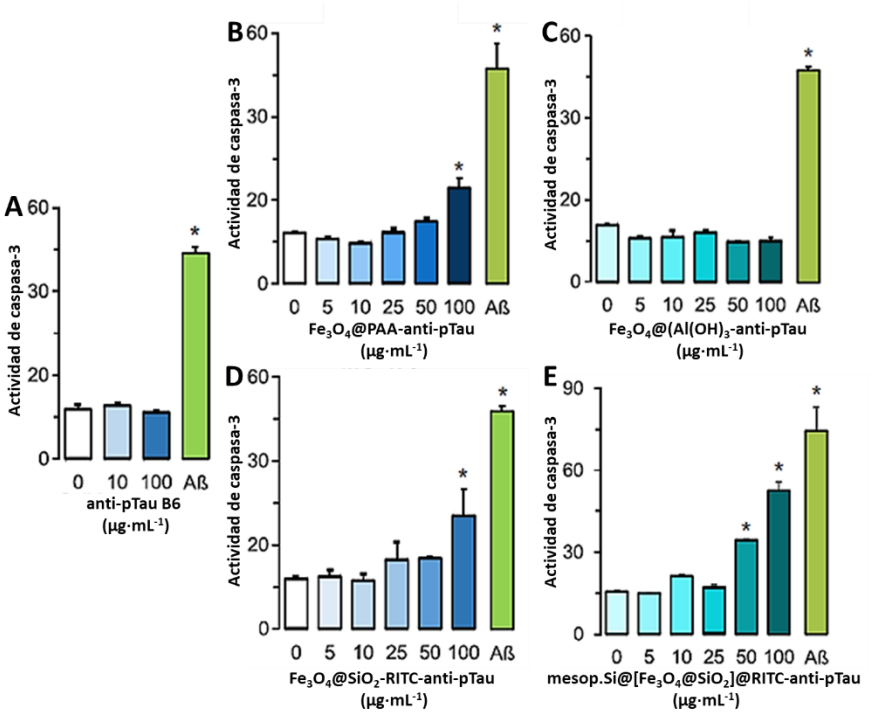


Figura 3.6: Toxicidad de las neuronas por determinación de la actividad de la caspasa-3 como marcador de la apoptosis celular marcadas con mAb (A) y con MNPs bioconjugadas con mAb: Fe_3O_4@PAA (B), Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ (C) y Fe_3O_4@SiO_2-RITC (D) y mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2]@RITC (E) tras la incubación de las neuronas con MNPs durante 24 h. Comparadas con las neuronas sin marcar (control, 0 µg·mL^{-1}) y con neuronas tratadas con ß-amiloide (ßA, control positivo). * p <0.05.

Una vez conocida la toxicidad celular, mediante la activación de la caspasa-3 producida por las diferentes nanoestructuras bioconjugadas, se seleccionaron las MNPS bioconjugadas de Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2, por su gran estabilidad coloidal para la realización de un estudio más exhaustivo de la citotoxicidad (figura 3.7).

Para ello, se escogieron dos tipos de marcadores de muerte celular (gráfica A): la anexina V, que se unirá a células en etapas tempranas de apoptosis y un compuesto químico fluorescente, 7-aminoactinomicina D (7-AAD), que solo será capaz de atravesar la membrana neuronal en etapas tardías de apoptosis o en procesos de necrosis[33].

De la misma manera, la mitocondria juega un papel central en diversas funciones celulares, las neuronas dependen de la fosforilación oxidativa mitocondrial para la mayoría de sus necesidades energéticas y, por lo tanto, tienen un riesgo particular de estrés oxidativo[34]. Factores como la disminución de la diferencia de voltaje a través de la membrana mitocondrial interna (conocido como potencial de membrana mitocondrial), está asociado a la apertura del poro de la permeabilidad mitocondrial (gráfica B), provocando un aumento en la producción de especies reactivas ROS (gráfica C). Todo esto, conlleva a un colapso de las funciones mitocondriales y, por lo tanto, contribuye a una apoptosis neuronal[35].

Todos los resultados demuestran que las MNPs probadas son seguras para las neuronas a concentraciones inferiores a 50 µg·mL^{-1}, ya que no se observa ningún aumento de los marcadores que indican una apoptosis neuronal. Además, en la imagen D (figura 3.7), las micrografías confocales muestran la inmunocitoquímica realizada y se observa que las MNPs

están principalmente localizadas de manera extracelular de las neuronas. Para las concentraciones más elevadas, este efecto es más notorio.

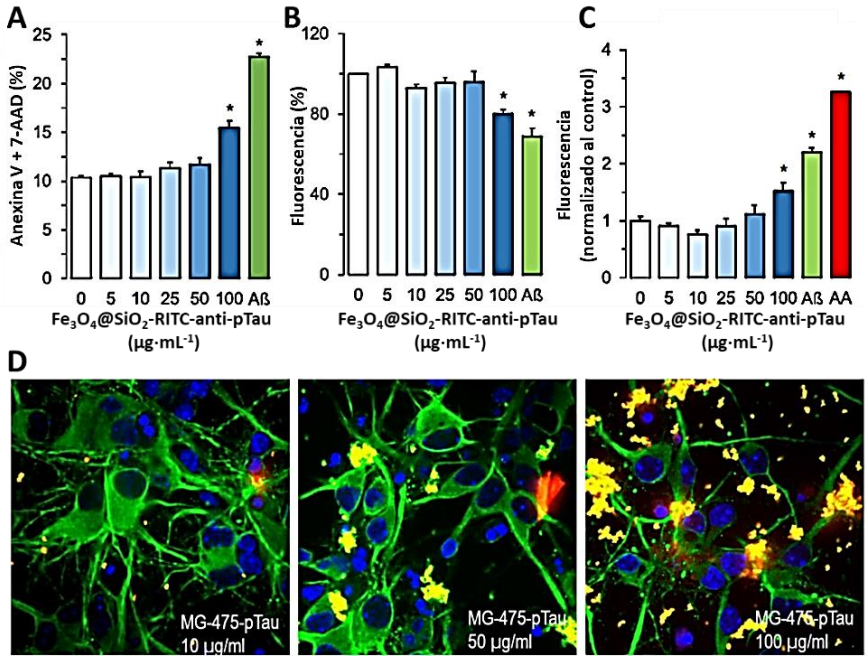


Figura 3.7: Toxicidad de las MNPs de Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2-anti-pTau en neuronas determinada por: apoptosis neuronal cuantificada mediante la expresión de la anexina V y 7-AAD (A), el potencial de membrana mitocondrial (B) y por la producción mitocondrial del anión superóxido (C); y el análisis por microscopía confocal de la localización de estas MNPs bioconjugadas en las neuronas en un rango de concentraciones de 10-100 µg·mL^{-1} de MNPs. * p <0.05.

3.1.3 Habilidad para cruzar barreras fisiológicas (in vitro BBB crossing)

Con el fin de valorar la habilidad de las MNPs bioconjugadas con el mAb anti-pTau para atravesar barreras fisiológicas (barrera hematoencefálica, siglas en inglés BBB) se diseñó un experimento in vitro.

El diseño de este experimento in vitro, tuvo como finalidad valorar la capacidad de las diferentes MNPs bioconjugadas de atravesar una barrera de células dobles, simulando de manera in vitro la estructura de la barrera hematoencefálica (BBB). Para ello, se probaron NPs de Fe_3O_4 con diversos tamaños y cubiertas, bioconjugadas con mAb anti-pTau (Fe_3O_4@PAA, Fe_3O_4@$Al(OH)_3$, Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2 y mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2]@RITC. Los reactivos necesarios para llevar a cabo este estudio, se encuentran en el anexo I de esta Tesis Doctoral.

Los ensayos y las líneas celulares de endotelio de cerebro humano (hCMEC/D3) utilizada para este estudio, fueron realizados en colaboración con la unidad neurovascular del Centro Médico de la Universidad de Ámsterdam (VUmc). Las células fueron utilizadas entre los pases (número de subcultivos) 28-30 y cultivadas en medio basal EGM-2 suplementado con: 0.025 % de rhEGF, 0.025 % de VEGF, 0.025 % de IGF, 0.1 % de rhFGF, 0.1 % de gentamicina, 0.1 % de ácido ascórbico, 0.04 % de hidrocortisona y 2.5 % de FBS. El cultivo de células hCMEC/D3 se realizó a 37ºC bajo atmósfera húmeda al 21 % O_2 y 5 % CO_2 hasta confluencia ($1 \cdot 10^5$ células·cm^{-2}) en frascos para cultivo celular recubiertos de colágeno.

Los análisis de la eficacia de cruce de la barrera de células en los estudios in vitro, se llevaron a cabo creando barreras de distintas densidades: a) barrera tenue con $1 \cdot 10^5$ células hCMEC/D3 (experimento 1) y b) barrera densa con $1.5 \cdot 10^5$ células hCMEC/D3 (experimento 2). Este análisis se evaluó por medio de los ensayos de migración celular por parte de las MNPs. Para ello, en un sistema poroso (transwell) recubierto de colágeno, con un tamaño de poro de 400 nm, las hCMEC/D3 fueron sembradas y tras 48 h de incubación, el medio de cultivo se reemplazó por medio basal EGM-2 sin suplementar con FBS. Todos los experimentos se llevaron a cabo tras 72 h de incubación.

Además, se testó la eficacia de cruce celular de anticuerpos solos, pTau fosforilado, acetilado Tau acetilado (acTau E11) y beta-amiloide (Aβ). Para ello, estos mAbs se diluyeron a una concentración de 1 $\mu g \cdot mL^{-1}$ en EGM-2 sin suplementar con FBS. Para el experimento 1 (barrera tenue), compuesta por $1 \cdot 10^5$ células hCMEC/D3, las MNPs bioconjugadas con anti-pTau B6 fueron: Fe_3O_4@PAA y Fe_3O_4@$Al(OH)_3$, a una concentración de 990 $ng \cdot mL^{-1}$ y 150 $ng \cdot mL^{-1}$, respectivamente, en EGM-2 sin FBS.

Por otra parte, en el experimento 2 (barrera densa), compuesta por $1.5 \cdot 10^5$ células hCMEC/D3, se utilizaron las siguientes MNPs fluorescentes bioconjugadas con anti-pTau: Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2 y mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2]@RITC, a una concentración de mAb de 2.09 $\mu g \cdot mL^{-1}$ y 2.29 $\mu g \cdot mL^{-1}$. Las concentraciones totales utilizadas de ambos nanomateriales fueron de 50 $\mu g \cdot mL^{-1}$.

A los estudios llevados a cabo con mAb y las MNPs, se les adicionó 1 $mg \cdot mL^{-1}$ de dextrano-FITC (70 kDa), un trazador de moléculas utilizado como biomarcador fluorescente, para evaluar los efectos potencialmente dañinos (macropinocitosis) para la integridad de la barrera celular.

En la figura 3.8, se muestra una representación gráfica de este ensayo, donde la imagen A representa al ensayo transwell tras 48h del sembrado de las células (que se encuentran entre el fluido sanguíneo y la simulación del tejido cerebral) y con medio celular EGM-2 sin FBS. La imagen B, representa la adición del mAb o las MNPs bioconjugadas en medio basal con la adición del biomarcador fluorescente (dextrano-FITC) a las 72 h del sembrado (tiempo cero del experimento). Finalmente, la imagen C simula la entrada de los mAb o MNPs bioconjugadas y, por consiguiente, la entrada simultánea de biomarcador fluorescente al tejido cerebral (t= 24 h).

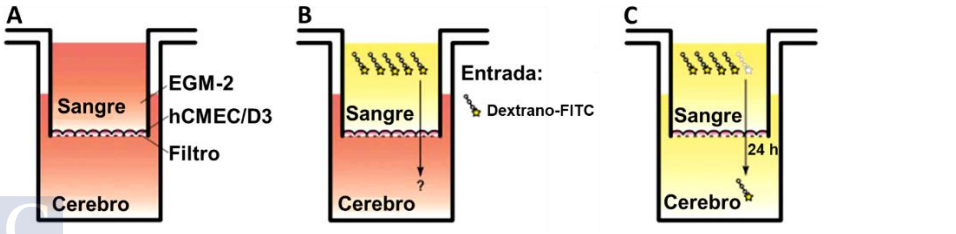


Figura 3.8: Representación esquemática del cruce de la barrera celular en una secuencia de fases presente en el ensayo transwell de la placa.

En cuanto a la preparación de las muestras, todas las MNPs (con o sin funcionalizar con el mAb anti-pTau), fueron almacenadas a 4 ºC para su uso posterior. Antes de comenzar los

experimentos con las MNPs, todas ellas fueron sonicadas durante 2 min. Para la cuantificación de mAb que contiene cada MNPs, se realizó un ensayo ELISA. Para ello, 50 µL de cada concentración conocida de las MNPs se adicionan a los pocillos de la placa ELISA, posteriormente se adicionan 50 µL del medio celular EGM-2 sin FBS, para conseguir un volumen final de 100 µL en cada pocillo. A continuación, la placa se incuba durante 1 h a 37 ºC. Tras realizar 3 lavados a la placa con PBS y 0.05 % de Tween 20 (solución de lavado), se adicionan una disolución que contiene 0.05 % en peso de Tween 20, 1 % en peso de PBS y el anticuerpo secundario (diluido 1:2000). Posteriormente, la placa se cubre con papel de aluminio y se incuba a 37 ºC durante 45 min. Terminada la incubación, la placa se lava 3 veces con la solución de lavado y se adicionan 100 µL de 1-STEM ULTRA TMB a temperatura ambiente y transcurrido 2 min, se adicionan 100 µL de HCl (1 N) para detener la reacción. De manera inmediata, la placa se introduce en un multilector de placa para medir la absorbancia a 450 nm.

La inmunoterapia ha mostrado un gran potencial como tratamiento para la enfermedad de Alzheimer, sin embargo, este tratamiento presenta relevantes desafíos a la hora de conseguir que el anticuerpo circulante en el flujo sanguíneo ingrese al cerebro para que sea efectivo. Para ello, se requiere que los mAb crucen la BBB[36]. De los tres mAb de tipo IgG probados en este estudio (anti-pTau B6, anti-acTau E11 y el anti-Aβ), el anti-pTau B6 destacó por poseer buenos niveles de cruce de la barrera celular compuesta por hCMEC/D3 (figura 3.9, gráfica A), a partir de las 4 h de incubación con los mAb en los ensayos transwell. Siendo de un 50 % el porcentaje ingresado al sistema que simula al tejido cerebral, superando a los restantes mAb que no superaron los 5 % de ingreso. Sin embargo, todos los mAb demostraron afectar levemente la integridad de la BBB transcurrido las 24 h de exposición de los mAb (gráfica B), siendo el mAb anti-acTau E11 el que más afectó dicha integridad, que, desde las 4 h de incubación, hubo un mayor incremento de fuga del trazador dextrano-FITC hacia el cerebro.

Por otra parte, estos resultados demostraron que el clon B6 del anti-pTau, posee una gran efectividad para cruzar la barrera, lo que resulta relevante para su uso clínico. Además, como sistema de estudio, este anticuerpo resulta muy útil para estudios fundamentales acerca de los mecanismos que influyen en la interacción entre los mAb y las vías extracelulares utilizadas como sistema de transporte de sangre a cerebro[37,38].

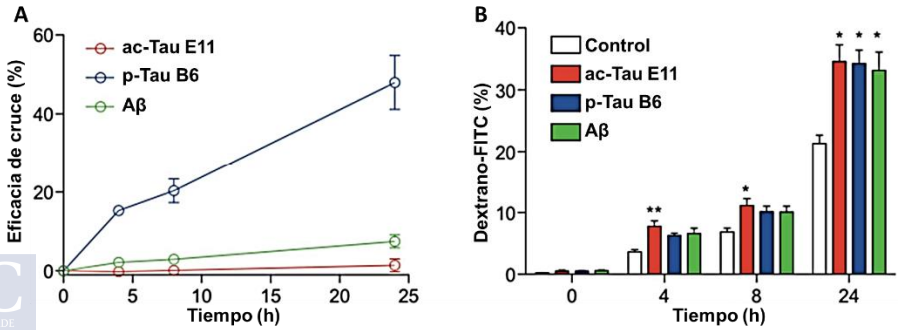


Figura 3.9: Representaciones gráficas de la determinación mediante ELISA de los mAbs que atravesaron la BBB ($1{\cdot}10^5$ células hCMEC/D3) (A) y su análisis mediante FITC del trazador de moléculas determinado por fluorescencia (B).

En la figura 3.10, se muestra el cruce in vitro de la barrera celular, compuesta por $1 \cdot 10^5$ células de hCMEC/D3, de MNPs bioconjugadas con el mAb anti-pTau y diferente composición (Fe_3O_4@PAA, Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ y Fe_3O_4@PEG-COOH) expuestas a un tiempo de incubación de hasta 24 h.

Los resultados demostraron que las MNPs funcionalizadas con PEG-COOH, atravesaron mejor esta simulación de BBB, con una eficacia final del 50 % de ingreso al fluido cerebral. Sin embargo, las restantes MNPs no lograron valores significativos de ingreso tras las 24 h de incubación, aunque la cuantificación, realizada por ELISA, del mAb ingresado, demostró que a las 4 h de incubación las MNPs de Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ exhibían mejor potencial de cruce de barrera celular de hCMEC/D3 que las restantes MNPs estudiadas. Este hecho puede atribuirse a la carga superficial que presentan estas MNPs, siendo la de Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ ligeramente positiva, esto provoca una interacción electroestática entre las MNPs funcionalizadas con el mAb y la parte luminal de las células humanas endoteliales que presentan una alta carga negativa superficial, induciendo a una endocitosis eficaz[39-41]. De igual modo, y debido a una repulsión electroestática entre la interacción NP-célula, se puede explicar que las cargas negativas procedentes de los grupos carboxílicos de las MNPs funcionalizadas con PAA y las células, inhibieron el cruce de barrera celular.

Por otra parte, estos resultados también demostraron que el recubrimiento superficial de las MNPs como el PEG, juega un papel importante a la hora de mejorar el cruce de BBB. En estudios previos[42], han corroborado que recubrimientos poliméricos flexibles como el PEG son importantes para mejorar la difusión de las NPs desde la sangre hasta el cerebro en BBB porosas.

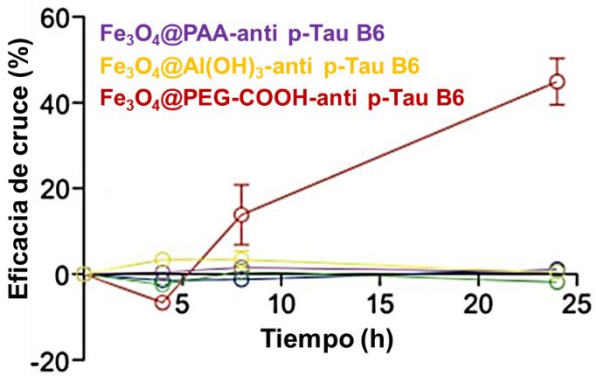


Figura 3.10: Representación gráfica de la determinación mediante ELISA del anticuerpo pTau B6 funcionalizado a las MNPs que atravesaron la BBB ($1 \cdot 10^5$ células hCMEC/D3).

Además de la carga superficial, otros factores, como el tamaño influyen en la difusión de las MNPs hacia el cerebro. Para valorar el efecto del tamaño, se procedió al estudio del cruce de una barrera celular en condiciones más estrictas (ensayo 2, barrera más densa con $1.5 \cdot 10^5$ células hCMEC/D3) y partículas bioconjugadas de diferentes tamaños, 20 nm y 200 nm, con el mAb anti-pTau (Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2 y mesop-Si@[Fe_3O_4@SiO_2]@RITC). Estas nanoestructuras magnéticas bioconjugadas, fueron comparadas con MNPs control (Fe_3O_4@PEG-COOH-RITC), bioconjugadas con el mismo mAb que las restantes MNPs.

En la figura 3.11, se muestran los resultados de cruce de la barrera celular de estas MNPs analizado por diferentes técnicas: mediante la determinación de mAb encontrado dentro del tejido cerebral (gráfica A); la determinación mediante la emisión del fluoróforo (λ_{em}= 583 nm) dentro del tejido cerebral (gráfica B) y el estado de la barrera por medio de la fuga del trazador fluorescente dextrano-FITC encontrado en el tejido cerebral (gráfica C).

En esta figura, se observa que de todas las nanoestructuras magnéticas bioconjugadas de Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2 y mesop-Si@[Fe_3O_4@SiO_2]@RITC demostraron ser más eficaces a la hora de ingresar a la parte de la simulación del cerebro, con un porcentaje de ingreso de alrededor del 25 y 18 %, respectivamente. Estos valores fueron observados a las 24 h de incubación mediante la determinación de mAb anclado en su superficie por la técnica ELISA.

Además, estos valores fueron comparados por la emisión de fluorescencia (RITC) que se presentaba en la zona del tejido cerebral, en donde los resultados demostraron que todas las MNPs funcionalizadas con dicho fluoróforo emitieron señal, corroborando que ambas MNPs cruzaron la barrera. Adicionalmente, la gráfica C, demostró que, de ambas nanoestructuras magnéticas bioconjugadas, las MNPs de Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2 fueron las que menos indujeron a un aumento significativo de fuga del trazador dextrano-FITC hacia el tejido cerebral, lo que indica un menor daño en la integridad fisiológica de la barrera celular.

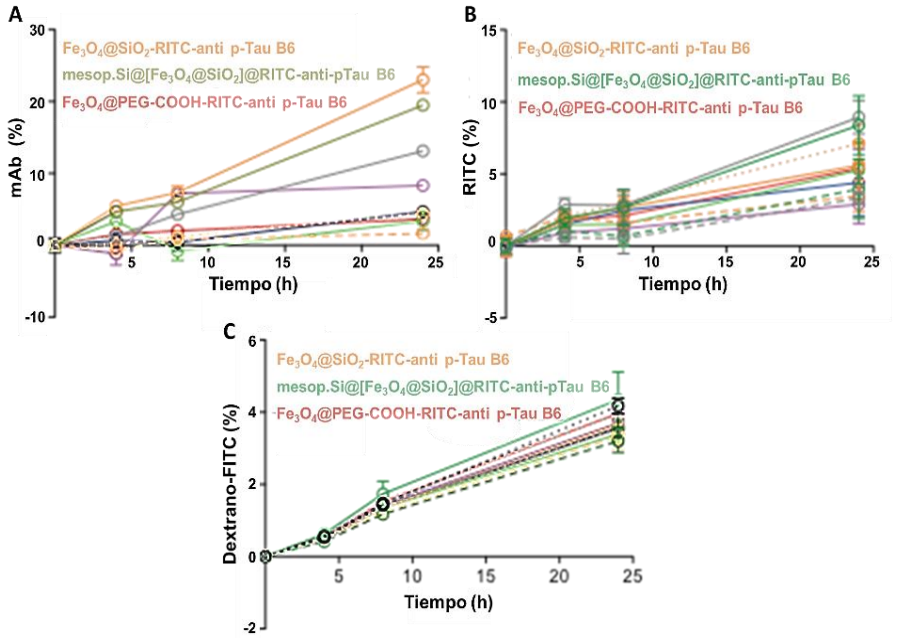


Figura 3.11: Representaciones gráficas de la determinación de las MNPs que cruzaron la BBB ($1.5 \cdot 10^5$ células hCMEC/D3) mediante: ELISA del anticuerpo pTau B6 funcionalizado a las MNPs (A), análisis del fluoróforo RITC presente en las MNPs (B) y el análisis del fluoróforo FITC del trazador de moléculas (C).

Tras los resultados obtenidos en este estudio in vitro, se apreció que las MNPs de Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2 bioconjugadas con el mAb dirigidas a los oligómeros pTau, mostraron una gran capacidad para atravesar la barrera BBB simulada in vitro, sin casi comprometer la integridad estructural de estas y con mayor tasa de ingreso que las MNPs control cubiertas con PEG y de uso preferente en aplicaciones biomédicas. Esto es debido en gran medida, a que estas MNPs de tipo core@shell de pequeño tamaño (D=20 nm) les permite una mejor difusión en las células humanas endoteliales que componen a la barrera celular. En tanto que los

nanomateriales recubiertos con cadenas largas de PEG, presentan un número elevado de interacciones adhesivas que podrían dificultarles el paso a la hora de atravesar unas barreras más densas, como la BBB en un paciente sano[43,44].

Por otra parte, todas las MNPs fluorescentes y bioconjugadas con el mAb anti-pTau (Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2, mesop-Si@[Fe_3O_4@SiO_2]@RITC y las Fe_3O_4@PEG-COOH-RITC) fueron capaces de interactuar con las células endoteliales de la barrera celular, apreciándose una mayor intensidad de emisión fluorescente en las de sílice mesoporosa. Este hecho, se puede atribuir a la cantidad de moléculas de fluoróforo adsorbido por los abundantes canales nanoporosos que poseen estas MNPs, en concordancia con resultados similares reportados en la literatura[45,46].

Dado el tamaño que poseen los anticuerpos monoclonales (alrededor de 150 KDa), estos se internalizan en las células mediante endocitosis. La estrategia seguida en esta Tesis fue funcionalizar las MNPs con el mAb como el anti-pTau y evaluar tanto el porcentaje de ingreso de estos nanosistemas al tejido cerebral, como la integridad de la simulación de BBB in vitro, una vez las MNPs bioconjugadas se difundieron por ella. Partiendo de que una disrupción irreversible de la BBB simulada provocada por una macropinocitosis, conduciría a un daño significativo del cerebro[47-49], estos resultados fueron analizados mediante la detección del trazador fluorescente dextrano-FITC utilizado para verificar fugas o disrupción de la permeabilidad de la barrera celular de manera permanente[50]. EL resultado del estudio revela que la integridad de la barrera se preserva tras el cruce de las MNPs, siendo las NPs Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2 las que menores disrupciones produjeron. Por otra parte, las nanoestructuras de sílice mesoporosas bioconjugadas, con un tamaño muy superior (80 nm frente a los 22 nm de las Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2) provocaron una disrupción del 4.1 % en la BBB simulada.

La eficacia de cruce de BBB simulada de MNPs bioconjugadas con mAb anti-pTau, es similar a la reportada con el uso de NPs de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) bioconjugadas con OX26, un anticuerpo específico con gran capacidad para permear la barrera[51]. En nuestro caso, el uso de las MNPs le confiere al nanosistema bioconjugado, una nanoherramienta adicional de detección y marcaje dentro del sistema a estudiar, mediante MRI o por la fluorescencia, incorporada mediante el RITC, que les otorgan utilidades como agentes de contraste de imagen multimodal.

3.1.4 Eficiencia del contraste en MRI de MNPs embebidas en phantoms

Para diseñar MNPs de interés como agente de contraste en imágenes de resonancia magnética, se hizo un estudio previo de la relajatividad en función del tamaño, la composición, y su estructura (NPs huecas o sólidas). Estas medidas se hicieron dentro del desarrollo de dos proyectos europeos (PANA (Call H2020-NMP-2015- two-stage, Grant N. 686009) y MADIA (732678-MADIA-H2020-ICT-2016)), dedicados a la detección de biomarcadores relevantes para el diagnóstico del síndrome de Alzheimer como son: las proteínas beta-Amiloide y los oligómeros Tau. No hay un estudio sistemático entorno a los parámetros elegidos, ya que previamente se habían seleccionado las NPs a estudiar en función de su utilidad biomédica.

En la tabla 3.4, se muestran todas las MNPs seleccionadas para este estudio, que fueron redispersadas en medio acuoso. En el caso de las nanoesferas de $Fe@Fe_3O_4$, al ser estables en medio orgánico por naturaleza, se transfirieron a medio acuoso mediante la funcionalización de su superficie con el polímero biocompatible PAA, mediante el método descrito en el capítulo 2, apartado 2.1.1-a de esta Tesis Doctoral.

Tabla 3.4 MNPs seleccionadas para el estudio de la eficiencia en MRI.

NP	Agente de contraste
$Mn_3O_4@PAA_{\text{-S-8 nm}}$	T_1
$Fe_3O_4@PAA_{\text{-COP-10nm}}$	T_2
$Fe3O4@Al(OH)_{3\text{-S-211nm}}$	T_2
$Fe@Fe_3O_4@PAA_{\text{-DT-12 nm}}$	T_2
$Fe_3O_4@PAA_{\text{hueca-DT-13 nm}}$	T_2
$Fe_3O_{4\text{hueca-S-130 nm}}$	T_2
$Fe_3O_{4\text{hueca-S- 551 nm}}$	T_2

Las medidas de relajatividad, se realizaron en colaboración con los Doctores: Manuel Bañobre, del Laboratorio Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL); Willy Gsell, del Centro Molecular de Imágenes de Pequeños Animales de la Universidad Católica de Lovaina, Bélgica (MOSAIC, KU Leuven) y por Carlos Caro del Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (BIONAND).

Todas las medidas de MRI de las MNPs, se realizaron en agar, utilizando diferentes equipos a una temperatura de 37 ºC. Las medidas de relajación de las MNPs realizadas en el INL ($Fe_3O_4@PAA$) y BIONAND (Fe_3O_4 huecas, grandes sin recubrir y las pequeñas recubiertas con PAA y $Fe@Fe_3O_4@PAA$), se llevaron a cabo en un equipo Bruker Minispec a un campo clínico de 1.5 T. Por otro lado, las MNPs de $Mn_3O_4@PAA$ fueron medidas en un Bruker BioSpec a un campo clínico de 7 T. Todos los parámetros relacionados con los mapas de los tiempos de relajación del protón (T_1 y T_2) se generaron utilizando el software Paravision, versión 6.0.1.

En cuanto a los resultados, la evaluación de las propiedades de relajación magnética se llevó a cabo midiendo T_1 y T_2 a diferentes concentraciones de hierro o manganeso y calculando los valores de los coeficientes de relajación longitudinales y transversales, r_1 y r_2, respectivamente.

En la figura 3.12 (imágenes A y C) se muestran, a modo de ejemplo, las gráficas de relajación transversal y longitudinal en función de la concentración de las MNPs de $Fe_3O_4@PAA$ y de $Mn_3O_4@PAA$, respectivamente. En ambas gráficas, se observa que los tiempos de relajación, tanto T_1 como T_2 disminuyen a medida que se incrementa la concentración de las MNPs. Este hecho se corrobora con las imágenes de los phantoms de agar obtenidos y cuya intensidad también es directamente proporcional a la concentración de las MNPs compuestas por magnetita (imagen B) o por hausmanita (imagen D), en donde no se encuentra efectos de saturación de concentración, demostrando su buena respuesta como agentes de contraste para T_2, en el caso de la magnetita, como agentes de contraste para T_1 en el caso de la hausmanita.

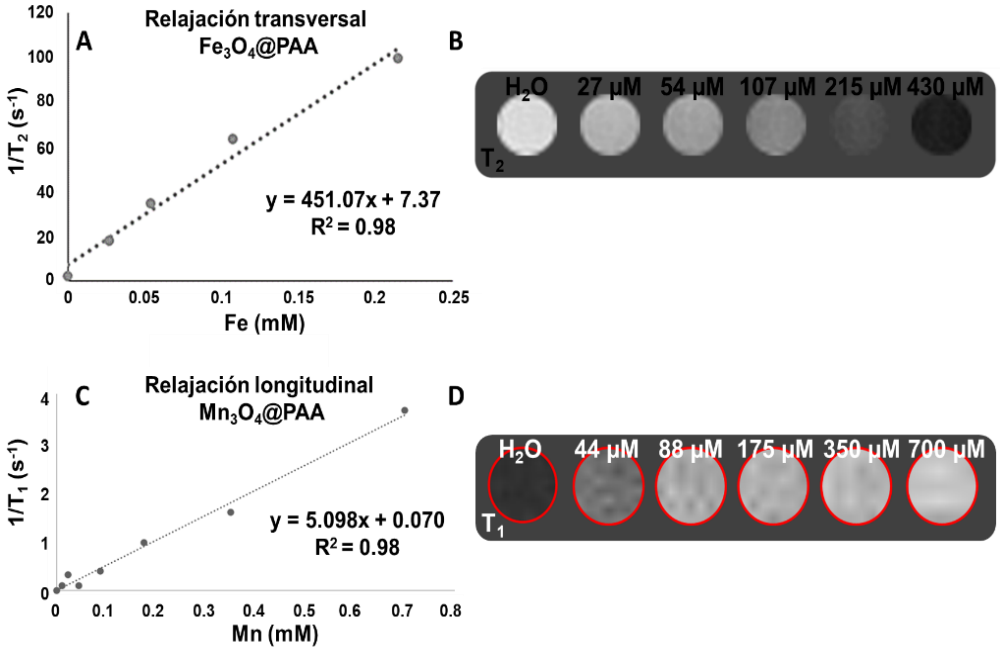


Figura 3.12: Representaciones gráficas de $1/T_2$ frente a concentración de Fe (A) y de $1/T_1$ frente a la concentración de Mn (C) e imágenes de los phantoms de agar a diferentes concentraciones de MNPs: T_2-Fe_3O_4@PAA (B) y T_1-Mn_3O_4@PAA (D).

A partir de las curvas de relajación de todas las nanoestructuras magnéticas estudiadas en este apartado, se obtuvieron sus valores de relajatividad (r_1 y r_2), reflejados en la tabla 3.5.

Tabla 3.5 Compilación de los diámetros determinados por TEM y DLS de las MNPs seleccionadas para el estudio y sus respectivas relajatividades.

NP	D_{TEM} (nm)	D_h (nm)	r_1 ($mM^{-1}\cdot s^{-1}$)	r_2 ($mM^{-1}\cdot s^{-1}$)	Contraste
Mn_3O_4@PAA	7.9	18.3	5.1	9.7	T_1
Fe_3O_4@PAA	10.3	46.7	8.5	451.1	T_2
Fe_3O_4@$Al(OH)_3$	210.8	281.6	0.2	468.8	T_2
Fe@Fe_3O_4@PAA	12.1	101.1	-	9.1	T_2
Fe_3O_4@PAA_{hueca}	12.7	33.8	1.7	35.6	T_2
Fe_3O_{4hueca}	130.4	421.5	-	5.6	T_2
Fe_3O_{4hueca}	551.1	956.0	-	16.0	T_2

En esta tabla, se muestran los coeficientes de relajación junto con sus valores de tamaño obtenidos por TEM y sus respectivos valores de diámetro hidrodinámico. Esta propiedad coloidal, junto con el comportamiento magnético que presenten las MNPs, son factores importantes al tener en cuenta para la obtención de los valores de relajación, r_1 y r_2[52,53]. De acuerdo con esto, si las MNPs muestran una gran diferencia de los valores promedios de los tamaños hidrodinámicos con los obtenidos por TEM, indican un estado de agregación notable, con tendencia a precipitar en medio acuoso, lo que empeora la respuesta como agente de contraste en MRI.

Este efecto fue perceptible en los resultados obtenidos de los valores r_1 y r_2 de las nanoesferas (core@shell y huecas con unos tamaños aproximados de 130 y 551 nm, respectivamente), cuya diferencia entre los valores de diámetro hidrodinámico y tamaño TEM se encuentran bastante alejados, lo que indica la formación de agregados. Este hecho imposibilitó la obtención de los valores T_1 para su posterior cálculo de su coeficiente de

relajatividad longitudinal o r_1, pues las medidas T_1 requieren de un mayor tiempo de adquisición que para las medidas de T_2[54,55], por lo que las NPs que no posean una buena estabilidad coloidal, terminarán por flocular. La agregación puede explicar los valores tan bajos obtenidos de r_2 para las nanoesferas huecas grandes, ya que estas presentan valores de magnetización de saturación altos (M_S aproximado de 85 emu/g_{Fe3O4}) lo que predice valores de r_2 altos[56].

Las restantes nanoestructuras, con tamaño hidrodinámicos y de TEM indican ausencia de agregación, buena estabilidad coloidal, lo que en conjunto con su buena magnetización se traduce en una buena respuesta como agentes de contraste en T_1 o T_2. Las NPs paramagnéticas de Mn_3O_4@PAA, exhibieron un valor relativamente alto de r_1 (5.1 $mM^{-1}\cdot s^{-1}$) y con un r_2 bajo (9.7 $mM^{-1}\cdot s^{-1}$), con una relación r_2/r_1 bastante bajo de 1.90, que confirma su uso potencial como agente de contraste positivo (T_1)[57], mostrando un valor superior a estudios realizados con nanopartículas SPM de magnetita de tamaños menores de 4 nm[58].

Asimismo, tanto para las nanoesferas de Fe_3O_4@PAA, Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ como para las huecas de pequeño tamaño, se obtuvieron valores de coeficiente de relajación transversal (r_2) de 451.1, 468.8 y 35.6 $mM^{-1}\cdot s^{-1}$, respectivamente, similares o superiores a los encontrados en otros trabajos publicados[59,60] o a los agentes de contraste en T_2 comerciales tales como Ferumoxtran-10, Resovist, Feridex o Endorem[57,61-64].

Dado que los valores de relajatividad de las NPs de magnetita y oxido de manganeso, permiten la obtención de imágenes con contraste en MRI, su integración en un material más complejo para el desarrollo de un agente multimodal es por tanto viable. Por ello, la siguiente fase de las pruebas preliminares será el estudio del radiomarcaje para imágenes PET.

3.1.5 Radiomarcaje de MNPs sin quelante. Estudio de la estabilidad y eficiencia del radiomarcaje.

La conjugación de MNPs con radioisótopos, comúnmente conocido como radiomarcaje, tiene como finalidad la obtención de una radiosonda magnética que pueda ser usada como herramienta de diagnóstico por imagen multimodal. Para ello, es importante que la nanoestructura radioetiquetada se mantenga estable a la exposición de diferentes medios biológicos, sin que pierda la integridad estructural y radioactividad.

Se realizaron ensayos de radiomarcaje de MNPs con dos radioisótopos, ^{18}F o ^{89}Zr, estudios de estabilidad in vitro y eficiencia del contraste en colaboración con el Prof. Uwe Himmelreich y la Doctora Sarah Belderbos del Centro Molecular de Imágenes de Pequeños Animales de la Universidad Católica de Lovaina, Bélgica (MoSAIC, KU Leuven) y reportado en diferentes publicaciones (M. A. González-Gómez, S. Belderbos, et al. Nanomaterials, 2019, 9(11), 1626)[65]. La radioactividad de los trazadores, se midió utilizando un contador gamma (modelo 2480 Wizard² Contador de Gamma Automático, 20 seconds protocol, PerkinElmer). Los reactivos necesarios para llevar a cabo este estudio, se encuentran en el anexo I de esta Tesis Doctoral.

Los dos radioisótopos seleccionados tienen tiempos de semivida muy diferentes ($t_{1/2}$ (^{18}F) = 109 min; $t_{1/2}$ (^{89}Zr) = 78.4 h) que permiten usos muy diferenciados. Para el análisis estructural de tejidos la ventana temporal de actividad del ^{18}F, mientras que el ^{89}Zr permite registros de casi una semana con lo que permite realizar estudios detallados de biodistribución.

El proceso de radioetiquetado comprende diferentes fases (figura 3.13) que permiten valorar la eficacia final del anclaje y la estabilidad de los radiotrazadores sobre las MNPs.

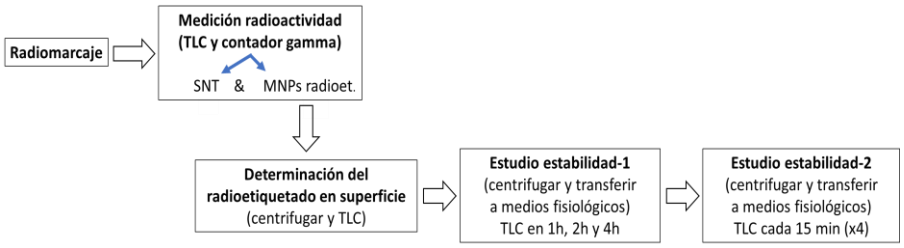


Figura 3.13: Representación esquemática de las diferentes etapas de un proceso de radiomarcaje de MNPs.

En la tabla 3.6 se compila las MNPs seleccionadas para el estudio de radiomarcaje y sus tamaños de terminados por TEM, junto con los radioisótopos utilizados en cada caso y sus correspondientes tiempos de semivida ($t_{1/2}$).

Tabla 3.6 MNPs seleccionadas para el estudio del radiomarcaje, tamaño determinado por TEM, radioisótopo utilizado y tiempo de semivida.

NP	D_{TEM}	Radioisótopo	$t_{1/2}$
Fe_3O_4@$Al(OH)_3$	211 nm	^{18}F	109 min
Fe_3O_4@$Al(OH)_3$	211 nm	^{89}Zr	78.4 h
mesop.Si@Fe_3O_4@PDA	78 nm	^{89}Zr	78.4 h

a Radiomarcaje con ^{18}F

Para llevar a cabo el radioetiquetado de MNPs, se preparan tres tubos eppendorf que contienen 500 µL de una disolución de las correspondientes MNPs (60 µg de Fe) y se adicionan 5, 10 ó 30 µl de ^{18}F (5, 10 y 30 MBq, respectivamente). A continuación, las mezclas se incuban a 25 ºC bajo agitación orbital durante 10 min. Posteriormente, las MNPs radioetiquetadas se separan magnéticamente del sobrenadante con la ayuda de un imán de neodimio y se procede al lavado sucesivo con 500 µL de agua Milli-Q, este proceso de lavado se repite hasta 3 veces. Finalmente, las ^{18}F-MNPs se resuspenden en el medio de elección (Agua Milli-Q, salino, PBS, medio celular, FBS o TryplE). La radioactividad de las MNPs radioetiquetadas y de sus respectivos sobrenadantes, se midieron mediante cromatografía de capa fina (TLC) y un contador gamma. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Posteriormente, se realizó un primero estudio de la estabilidad de adsorción de las MNPs radioetiquetadas (^{18}F-Fe_3O_4@$Al(OH)_3$), tras separar el sobrenadante de las ^{18}F-MNPs (11.85 µg Fe radiomarcado con 5 MBq de ^{18}F) mediante centrifugación (4000 rpm durante 20 min). Las ^{18}F-MNPs se resuspendieron en 500 µL en uno de los siguientes medios: agua Milli-Q, solución salina (NaCl al 0,9 %), PBS, TrypLE, medio celular (DMEM-GlutaMax suplementado con 15% de FBS y 1 % de penicilina-estreptavidina), 50 % de DMEM-GlutaMax y 50 % de FBS y FBS.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Posteriormente, las ^{18}F-MNPs se almacenaron a 37 °C y se tomaron muestras de 2 µL para TLC después de 30 minutos, 1h, 2h y 4h de su preparación.

Un segundo estudio de estabilidad, se llevó a cabo con tiempos de incubación menores y usando los mismos medios fisiológicos descritos anteriormente. Tras cada 15 min de incubación, las ^{18}F-MNPs se separaron del sobrenadante por centrifugación (4000 rpm a 20 min), y posteriormente se les adicionó medio fresco. Se tomaron muestras de 2 µL para TLC para cuatro intervalos continuos con tiempos de 15 min tras cada separación. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

La determinación del ^{18}F retenido sobre la superficie de las MNPs, fue realizado mediante la técnica cromatográfica TLC, en la que la fase móvil consistió en una disolución salina (NaCl, 0.9 %). Dicha fase móvil se hace ascender por capilaridad sobre la fase estacionaria (placa que contiene una alícuota de la muestra) en donde el ^{18}F libre (Na^{18}F), se desplazará por capilaridad con la fase móvil, separándose del ^{18}F anclado a las MNPs. Tras este proceso, se analizaron las muestras usando un contador gamma.

En la figura 3.14 (imagen A) se muestran los resultados obtenidos del estudio de adsorción de ^{18}F sobre NPs de Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ dispersas en agua Milli-Q, tras diferentes tiempos de incubación (2, 5 y 10 minutos). Estos resultados muestran que incluso para el tiempo de incubación más pequeño (2 min) la adsorción de ^{18}F, alcanza prácticamente el máximo, un 98.68% independientemente de la concentración de radiotrazador utilizado (5, MBq, 10 MBq, o 30 MBq). Además, se puede observar que la eficiencia del proceso de adsorción no cambió sustancialmente tras tiempos de incubación más largos. De hecho, tras 10 y 30 min de incubación, la adsorción de ^{18}F se mantiene en entorno al 98 % (98.72 % y 98.94 %) para las diferentes concentraciones de radiotrazador utilizados en los procesos de adsorción (5, MBq, 10 MBq, o 30MBq).

La adsorción de ^{18}F sobre las NPs de Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ es superior a datos reportados en la literatura que no excede el 90 % usando nanomateriales magnéticos radioetiquetados[67], en donde se utilizan mayores concentraciones de radiotrazador. De esta manera, hemos desarrollado una nanoestructura con mayor capacidad de adsorción utilizando menores cantidades de radiotrazador y menores tiempos, lo que supone una gran ventaja para reducir costes en los procesos de radioetiquetado.

Adicionalmente, la realización de la autorradiografía en los TLC realizada a los 10 minutos de exposición del radioetiquetado (imagen B, izquierda) corroboró los resultados obtenidos por el contador gamma, con un factor de retardo (R_f) de las MNPs radioetiquetadas nulo, indicando que todo el ^{18}F se encuentra anclado a las MNPs. Por otro lado, en la autorradiografía que solo contiene ^{18}F, se observa que este radiotrazador asciende con la fase móvil, formándose el compuesto Na^{18}F, con un R_f de 1, lo que indica que todo el ^{18}F se desplaza con la fase móvil (imagen B, derecha).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

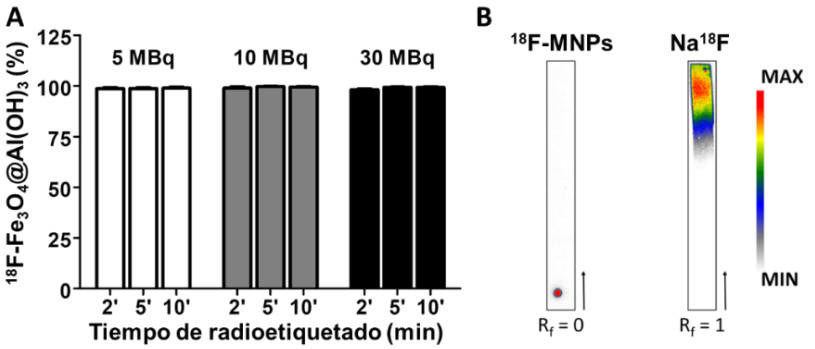


Figura 3.14: Representaciones gráficas del porcentaje de ^{18}F enlazado a las MNPs de concentración 60 μg de Fe hasta los 10 min de incubación a 25 ºC (A) y autorradiografías del ^{18}F enlazado con las MNPs (izq.) y el ^{18}F libre (der.). Imagen adaptada de la ref. 65. Copyright (2021) con permiso de MDPI

Dado que las ^{18}F-MNPs están destinadas para su uso como agente bimodal en aplicaciones celulares e in vivo, es relevante conocer la estabilidad del enlace entre el radiotrazador y la MNPs en diferentes medios fisiológicos relevantes para este estudio:

- agua Milli-Q;
- solución salina (0.9 %);
- PBS;
- medio de cultivo celular (DMEM-GlutaMax suplementado
- medio de cultivo con 15 % FBS y 1 % penicilina-estreptavidina);
- 50 % DMEM + 50 % FBS;
- TryplE.

Las MNPs radioetiquetadas fueron incubadas durante diferentes tiempos (0.5, 1, 2 y 4 h) en cada uno de los medios fisiológicos. El porcentaje de ^{18}F adsorbido a la superficie de las MNPs se determinó para tres réplicas de cada una de las condiciones experimentales. En la tabla 3.7. se muestran los resultados del estudio de estabilidad y en la figura 3.15 se representaron gráficamente estos resultados.

Tabla 3.7 Porcentaje de adsorción de ^{18}F-Fe$_3$O$_4$@Al(OH)$_3$ en diferentes medios fisiológicos*.

Medio	Tiempo de incubación a 37 ºC							
	0.5 h		1 h		2 h		4 h	
	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD
Agua	65.6	17.2	85.6	5.2	77.9	6.3	86.7	8.3
Salino, 0.9 %	69.5	2.6	66.8	12.9	78.5	12.7	76.9	12.4
PBS	57.4	5.6	53.8	12.7	38.5	2.1	40.1	5.0
Celular	40.4	7.9	46.9	7.4	38.3	8.9	28.9	1.7
Celular+FBS	36.8	3.3	58.5	14.8	40.3	3.2	40.4	5.2
FBS	35.7	1.8	46.3	8.1	32.5	3.3	34.4	10.3
TryplE	53.1	5.7	61.1	19.6	38.2	5.1	36.9	3.4

*Se midieron tres réplicas por condición.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

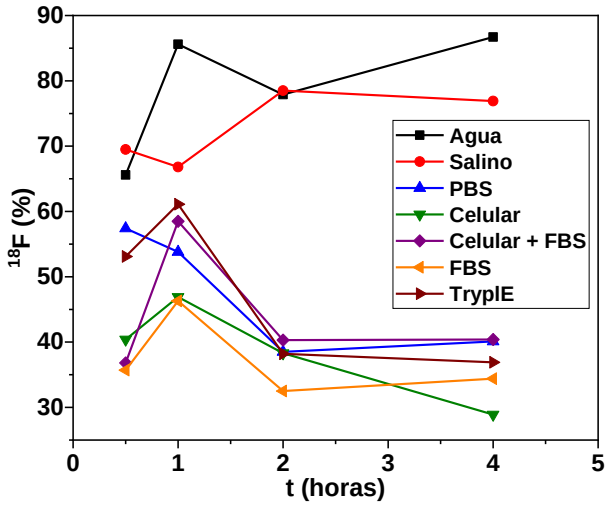


Figura 3.15: Representación gráfica del porcentaje de adsorción de las MNPs radioetiquetadas en diferentes medios fisiológicos.

Si bien el radiomarcaje fue relativamente estable en medios acuosos (agua Milli-Q y solución salina), se aprecia una disminución notable en la cantidad del radiotrazador adsorbido por las MNPs tras los 30 minutos de exposición en los restantes medios fisiológicos. Una posible justificación a esta pérdida de radiotrazador podría deberse a la influencia del pH, ligeramente más básico en PBS (pH = 7.4) en comparación con las disoluciones acuosas, pues a medida que el pH aumenta, se aprecia una disminución de la atracción electroestática entre la cubierta de $Al(OH)_3$, cargada positivamente, y los aniones ^{18}F, provocando así el desprendimiento del radioisótopo de la superficie de la partícula. A partir de las 2 h de incubación, el porcentaje de ^{18}F adsorbido se mantiene estable, en parte debido a que:

1) el proceso de adsorción/desorción del ^{18}F sobre las MNPs haya alcanzado un equilibrio, lo que resultaría en una pérdida más pronunciada si se resuspenden las MNPs radioetiquetadas en medio fresco;

2) o la carga de iones ^{18}F sobre las MNPs haya superado la capacidad de carga máxima, con lo cual, tras la perdida inicial de exceso de ^{18}F, el resto de iones permanezcan adsorbidos en el interior de la estructura.

Para comprender mejor el comportamiento en cuanto a la estabilidad de las ^{18}F-MNPs en estos medios, se llevó a cabo un segundo estudio de adsorción (tabla 3.8 y gráfica 3.16), en donde se usaron los mismos medios fisiológicos a tiempos de incubación más cortos (15 minutos) y en cuatro intervalos seguidos. Tras cada intervalo, el sobrenadante se retira de las MNPs radioetiquetadas por centrifugación y se adiciona medio fresco.

En estos resultados obtenidos, se observa que tras la resuspensión de las ^{18}F-MNPs en medio fresco para cada uno de los cuatro intervalos, solo una pequeña fracción del radiotrazador es liberado de la superficie de las MNPs. Además, la carga de iones ^{18}F sobre la superficie del nanomaterial se mantiene estable a partir del segundo intervalo, a excepción de las resuspendidas en medio celular

Tabla 3.8 Porcentaje de adsorción de ^{18}F-Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ después de la suspensión repetida de estas MNPs en medio fresco después de cada intervalo de incubación*.

Medio	Tiempo de incubación a 37 ºC							
	Intervalo 1		Intervalo 2		Intervalo 3		Intervalo 4	
	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD
Agua	96.4	0.5	97.3	0.5	95.3	2.8	97.6	1.0
Celular	91.5	5.5	70.4 **	11.6	80.2	4.6	76.2 *	16.4
Celular+FBS	89.1	3.6	79.0	10.4	75.6	7.1	75.8	5.7
FBS	92.1	0.4	79.5	6.8	81.3	2.5	79.6	2.4

*Se midieron tres réplicas por condición. En cada ciclo, las MNPs se resuspendieron en medio fresco, seguido de una exposición de 15 minutos.

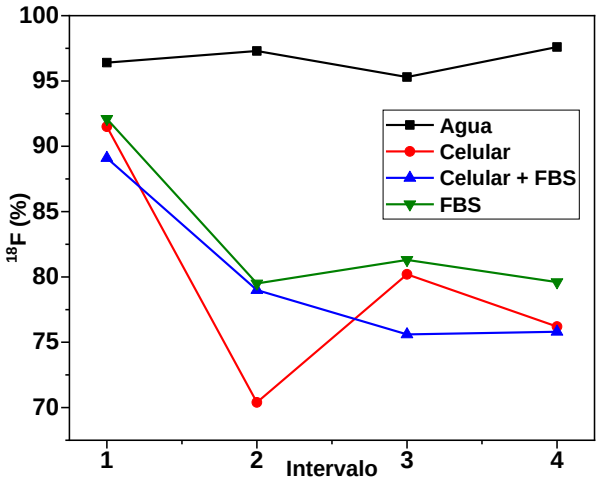


Figura 3.16: Representación gráfica del porcentaje de adsorción de las MNPs radioetiquetadas después de la suspensión repetida de estas MNPs en medio fresco tras cada intervalo de incubación.

b Radiomarcaje con ^{89}Zr

Tanto los ensayos de radiomarcaje de las MNPs (Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ y mesop.Si@Fe_3O_4@PDA) como el estudio de la estabilidad y eficiencia de éste, se llevó a cabo en laboratorios equipados con protección de la radiación ionizante, concretamente en el Centro Molecular de Imágenes de Pequeños Animales de la Universidad Católica de Lovaina, Bélgica (MoSAIC, KU Leuven), bajo la dirección del Prof. Uwe Himmelreich y la colaboración de los Doctores Frederik Cleeren y Sarah Belderbos. Los ensayos de radioactividad, se midieron utilizando un contador gamma (modelo 2480 Wizard² Contador de Gamma Automático, 20 seconds protocol, PerkinElmer).

El radioetiquetado de las MNPs con ^{89}Zr es un procedimiento químico cuyo objetivo es el anclaje eficiente y estable de los iones ^{89}Zr a la superficie de los nanomateriales. Para la obtención de estas ^{89}Zr-MNPs se siguió el procedimiento descrito por Chen[67], con algunas modificaciones. Para ello en un tubo eppendorf se adicionan 0.5 mL de HEPES, 27 µL de Na_2CO_3 (2M, para ajustar el pH a 7.5) y 1 mL de MNPs a una concentración de 2 mg·mL^{-1}. Después de mantener la mezcla en agitación durante 5 segundos, se adicionan 18 µL de oxalato de Zirconio-89 (18 MBq) y la mezcla se incuba a 75 ºC. Posteriormente, para la determinación de la eficiencia de enlace ^{89}Zr-MNPs, se realizaron incubaciones a diferentes tiempos (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 min) y se tomaron muestras para su posterior análisis mediante TLC y un contador gamma.

Posteriormente, se realizó el estudio de la radioestabilidad de las radiosondas magnéticas obtenidas, ^{89}Zr-MNPs, siguiendo el procedimiento descrito por Chen[69]. Para ello, en un tubo eppendorf se adicionan 200 µL de una alícuota de las ^{89}Zr-MNPs junto con 5 mM de DFO. La mezcla se incuba a 37 ºC durante 3 días. Durante este tiempo, se verificó la radioestabilidad de cada uno de los compuestos radioetiquetados obtenidos, ^{89}Zr-Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ y ^{89}Zr-mesop.Si@Fe_3O_4@PDA, a diferentes tiempos de estudio (0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48 y 72 h). Para cada tiempo de estudio, una alícuota de 10 µL de la mezcla se adiciona en 200 µL de HEPES para separar mediante centrifugación (10 min, 1000 rpm) el sobrenadante, que contiene el complejo ^{89}Zr-DFO, de las ^{89}Zr-MNPs precipitadas. La radioactividad que contenía el sobrenadante fue medida por TLC y un contador gamma. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Posteriormente, se realizó un estudio de la estabilidad de las MNPs radioetiquetadas en diferentes medios fisiológicos (Tryple, FBS, DMEM y una mezcla de DMEM+FBS en proporción 50:50), un proceso similar al descrito en la sección precedente. Para ello, 50 µL de la muestra radioetiquetada, ^{89}Zr-MNPs, se adicionan a 150 µL de HEPES. La mezcla se deja incubando a 37 ºC durante 3 días. Durante este tiempo, la radioestabilidad de las ^{89}Zr-MNPs resuspendidas en los diferentes medios biológicos, fue monitorizada y cuantificada a diferentes tiempos de estudio (0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48 y 72 h). Para cada tiempo de estudio, una alícuota de 10 µL de la mezcla se adiciona en 200 µL de HEPES y se separa mediante centrifugación (10 min, 1000 rpm). Una vez se tiene el sobrenadante separado de las MNPs radioetiquetadas, y que contiene el radiotrazador libre (^{89}Zr), se analiza mediante TLC y un contador gamma. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

En cuanto la determinación del radioetiquetado con ^{89}Zr retenido sobre la superficie de cada MNP, éste fue cuantificado por TLC, en donde la fase móvil consistió en una mezcla de buffer citrato (90 %, 20 mM, pH 5) con acetonitrilo (10 %). Dicha fase móvil se hace ascender por capilaridad sobre la fase estacionaria (placa que contiene una alícuota de la muestra) en donde el ^{89}Zr libre, se desplazará por capilaridad con la fase móvil, separándose del ^{89}Zr anclado a las MNPs. Estas TLC se analizaron posteriormente usando un contador gamma.

Los resultados de la cuantificación del radiotrazador retenido sobre las MNPs (figura 3.17) mostraron que, a partir de los 30 minutos de síntesis, el ^{89}Zr adsorbido por las MNPs se mantuvo estable durante 120 minutos. Además, se observa que las mesoporosas de sílice magnéticas consiguen adsorber casi la totalidad del ^{89}Zr, un 90 %, frente a las que tienen cubierta de $Al(OH)_3$, que solo captan un 30 % del radiotrazador. Esta diferencia tan acusada en la eficiencia del radiomarcaje entre ambas nanoestructuras puede deberse a las diferentes texturas y la topografía química de ambos materiales. Por un lado, las nanoestructuras de sílice mesoporosa presentan una estructura de canales ordenada con numerosos grupos silanoles ($Si\text{-}O^-$), que contribuyen a almacenar más radiotrazador que una estructura amorfa como es la cubierta de $Al(OH)_3$, donde solo hay grupos hidroxilos desprotonados ($Al\text{-}O^-$) para la adsorción iónica del ^{89}Zr[68,69].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

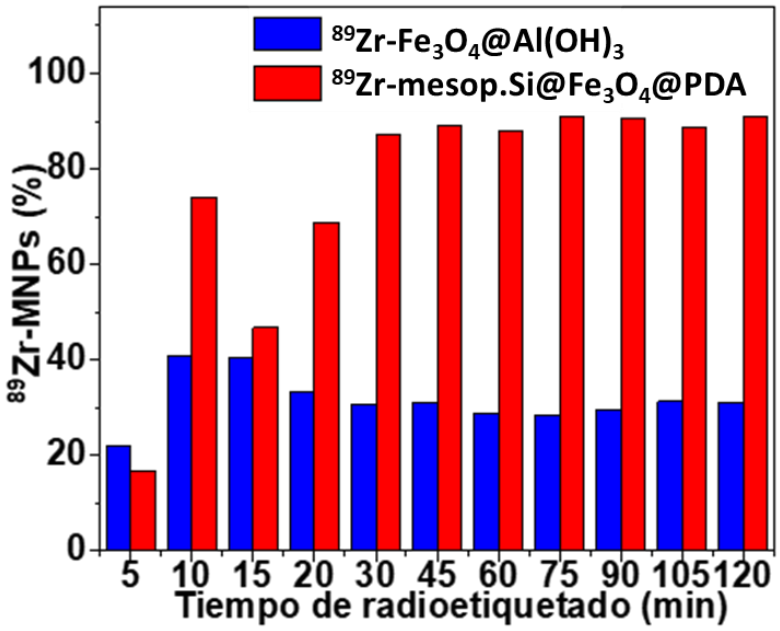


Figura 3.17: Representación gráfica del porcentaje de ^{89}Zr enlazado a las MNPs de concentración 2 mg·mL^{-1} hasta 2 h de incubación a 75 ºC.

Con el fin de evaluar la intensidad del anclaje del radioetiquetado, e expusieron las MNPs@^{89}Zr a DFO, un agente quelante que posee una gran afinidad química por iones de Zr^{+4} [70,71], capaces de formar complejo ^{89}Zr-DFO. Mediante este ensayo competitivo, se puede valorar la afinidad relativa de ambas especies MNPs y DFO, para la adsorción del ^{89}Zr tal y como muestra la figura 3.18. Se puede apreciar que las nanoestructuras magnéticas de Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ mantienen una buena afinidad por el radioisótopo ^{89}Zr, no disminuyendo del 60 % en los primeros tiempos de incubación. Sin embargo, las NPs con sílice mesoporosa presentan un decaimiento más notable del radioetiquetado en las primeras cuatro horas de incubación, indicando un proceso de desorción. Ambas nanoestructuras magnéticas, presentan un proceso de recuperación de absorción del radioetiquetado a partir de las 24 h de exposición con el quelante, verificado hasta las 72 h que dura el experimento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

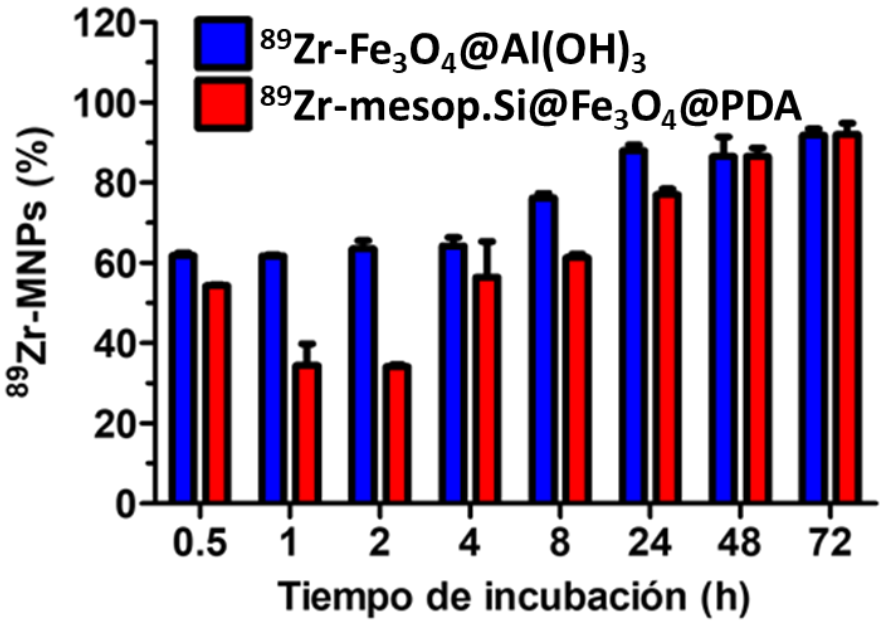


Figura 3.18: Representación gráfica del porcentaje de ^{89}Zr enlazado a las MNPs de concentración 2 mg·mL^{-1}, tras la exposición con el quelante a 37 ºC.

Asimismo, se estudió la estabilidad del radioetiquetado exponiendo las MNPs@^{89}Zr a diferentes medios de interés fisiológico, que reproducen algunas de las condiciones químicas del medio sanguíneo[72,73]:

- medio celular, compuesto por DMEM, suplementado con GlutaMax, complemento sustituto a la L-glutamina (ya que este aminoácido esencial presente en la mayoría de los medios de cultivos celulares, se degrada generando amoníaco y ácido pirrolidincarboxílico como subproductos, favoreciendo la toxicidad en células[74]);
- FBS y penicilina-estreptomicina;
- 50 % DMEM- GlutaMax con 50 % FBS;
- FBS y TryplE, un sustituto a la tripsina porcina y estable a temperatura ambiente.

En la figura 3.19 se muestran los resultados del ensayo de estabilidad del radioisótopo ^{89}Zr adsorbido por las nanoestructuras magnéticas Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ (imagen A) y por las mesoporosas de sílice, mesop.Si@Fe_3O_4@PDA (imagen B).

En la imagen A, se aprecia que las estructuras con $Al(OH)_3$, pierden el 40 % aproximadamente de ^{89}Zr a lo largo del tiempo de incubación, destacando una mejor estabilidad en medios celulares con o sin FBS a partir de las 24 horas de incubación. Por otra parte, estructuras con sílice mesoporosa, presentan mayor estabilidad en la adsorción del ^{89}Zr en los primeros tiempos de incubación de hasta 4 horas, pierden un 30 % de radioisótopo de la superficie del nanomaterial. Sin embargo, a partir de las 24 horas, la pérdida de ^{89}Zr es más intensa, llegando a bajar del 50 % y de manera pronunciada en medios con TryplE.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

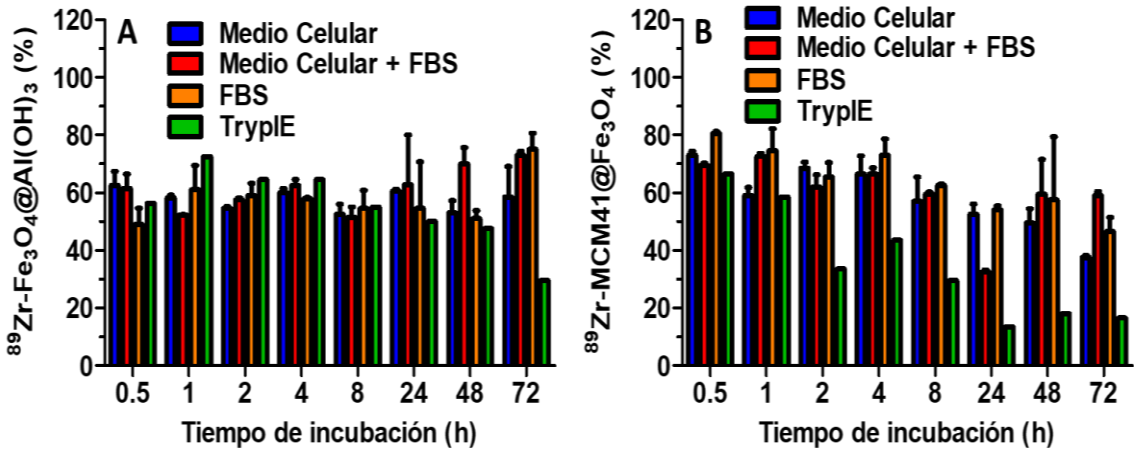


Figura 3.19: Representación gráfica de la estabilidad en medios biológicos de las MNPs a 37 ºC: ^{89}Zr-Fe_3O_4@Al(OH)$_3$ (A) y ^{89}Zr-mesop.Si@Fe_3O_4@PDA (B) tras 72h de incubación.

En general, los resultados demuestran que, sin la necesidad de introducir un quelante en las MNPs, se consiguió radioetiquetar ^{89}Zr de manera eficiente y estable tal y como corroboran: el ensayo competitivo realizado en presencia de DFO, quelante conocido por su alta afinidad por el ^{89}Zr como el DFO y el ensayo de exposición de las nanoestructuras radiomarcadas a diferentes medios fisiológicos. Todo esto hacen de estos nanomateriales magnéticos una herramienta útil para su uso como agentes de contraste en PET para aplicaciones in vitro e in vivo.

3.2 MNPs para la detección de biomarcadores

Uno de los mayores retos a los que se enfrenta la medicina actual es la identificación de biomarcadores de enfermedades en estadíos precoces que se encuentran presentes en el cuerpo a muy bajas. El diagnóstico temprano, es crucial para evitar un mal pronóstico en enfermedades graves (cáncer, enfermedades neurodegenerativas, etc.) y una mejor calidad del paciente.

Por este motivo, en este capítulo se abordarán el estudio de las MNPs bioconjugadas con un aptámero, fragmento de anticuerpo, desarrollado para ser altamente selectivo a las proteínas beta-amiloide (Aβ1-42, proteína indicadora de la enfermedad de Alzheimer[75]), las cuales se introdujeron en una cámara de agregación magnética con dicha proteína con el fin de preconcentrar este biomarcador sobre las MNPs. De manera específica se enriquece la muestra, se prescinde del resto de componentes biológicos presentes para facilitar su detección posterior mediante un kit ELISA y evitar falsos positivos.

Los reactivos necesarios para llevar a cabo este estudio, se encuentran descritos en el anexo I de esta Tesis Doctoral.

a Biodetección magnética (cámara de agregación)

Los estudios de biodetección magnética se llevaron a cabo mediante el uso de NPs de Fe_3O_4@SiO_2 bioconjugadas con aptámero Rgen3K(KLVFF)$_{16}$ selectivo para oligómeros Aβ 1-42 (biomarcador de AD) desarrollado en colaboración con el Prof. Matteo Santin y la Doctora Valeria Perugini del Centro de Medicina y Dispositivos Regenerativos de la Universidad de

Brighton, y separación magnética en un dispositivo desarrollado por el Prof. Alek Dediu y el Doctor Alessandro Surpi, del Grupo de Investigación de Nanoestructuras Magnéticas para Espintrónica y Nanomedicina del Consejo Nacional de Investigación de Italia (CNR-ISMN-Bolonia).

Las NPs bioconjugadas con aptámero se expusieron a diferentes concentraciones de oligómeros Aβ 1-42 en el interior del dispositivo magnético, capaz de preconcentrar las MNPs y desplazarlas a través de canal conteniendo dispersiones acuosas del biomarcador. Al final del proceso, el dispositivo separa magnéticamente las MNP bioconjugadas con el biomarcador inmovilizado en su superficie para ulterior análisis.

La determinación de la proteína Aβ 1-42 anclado a las MNPs bioconjugadas, se realizó mediante un analizador de inmunología automatizado (Lumipulse G600II, Fujirebio). Para esta determinación, el sistema utiliza un concepto de cartuchos de inmunoreacción para la medición cuantitativa de Aβ 1-42 procedente del fluido cerebroespinal. Para ello, se siguieron las instrucciones del fabricante, donde el volumen mínimo de muestra fue de 150 µL, con un límite de detección de 10 $pg \cdot mL^{-1}$ y el rango de calibración fue desde 62.5 a hasta los $3.4 \cdot 10^3$ $pg \cdot mL^{-1}$ (Aβ 1-42).

Los experimentos de inmovilización de biomarcadores sobre las MNPs bioconjugadas con aptámero, se realizaron utilizando una relación en volumen de Aβ:MNPs de aproximadamente 1:1, utilizando 10 µl de cada compuesto. Las concentraciones testadas de MNPs fueron de 2 $ng \cdot mL^{-1}$ y de 10 $\mu g \cdot mL^{-1}$ y de β-amiloide fue de $3.4 \cdot 10^3$ $pg \cdot mL^{-1}$. Todas las MNPs se resuspendieron en una disolución buffer, compuesta por betaína (100 $mg \cdot mL^{-1}$) y glucosa (0.1 $mg \cdot mL^{-1}$).

El dispositivo magnético, denominado cámara de agregación magnética, posee un conjunto de imanes móviles que crean un gradiente magnético elevado que permite localizar las MNPs sobre un punto de interés. Una vez localizadas las MNPs bioconjugadas en el inicio del canal, se desplazan a lo largo de toda la longitud del tubo donde se encuentra disuelto el biomarcador para favorecer su inmovilización.

El tubo contiene una mezcla de MNPs y el Aβ 1-42, con un volumen total de 20 µL. Una vez colocada la muestra en el capilar y después de 5 min de incubación, los imanes se mueven a lo largo del capilar, varias veces (9-10 “Runs”) y las MNPs con el biomarcador inmovilizado se separan magnéticamente del sobrenadante (7-8 µL) que se analiza mediante un equipo Lumipulse.

Para ello, se diluye el sobrenadante en agua (150 µL) y se determina la concentración de Aβ 1-42. Todas las muestras fueron comparadas con el Aβ 1-42 estándar (control, diluido a 10/150 ó 1/32, con concentración aproximada de 106 $pg \cdot mL^{-1}$). En la imagen 3.20 se muestra un esquema de este proceso de preconcentración.

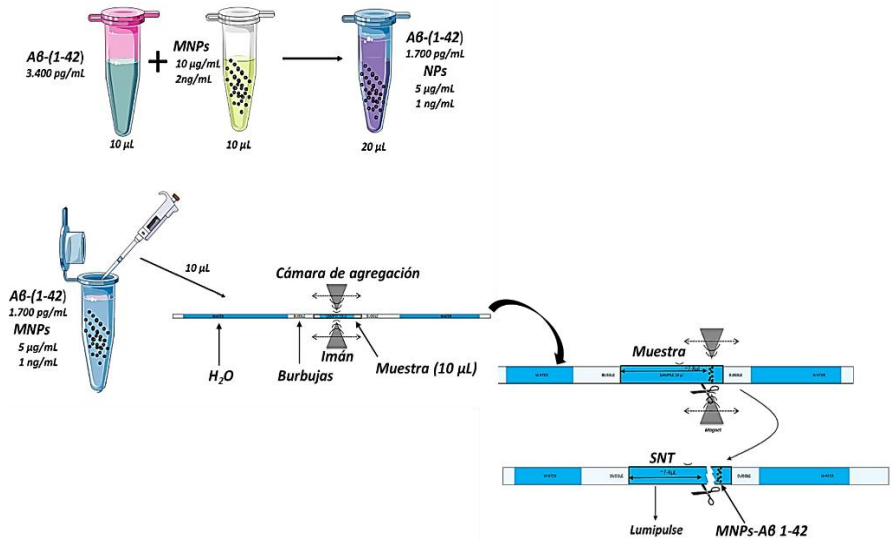


Figura 3.20: Esquema del proceso de preconcentración de Aβ1-42 por medio de una cámara de agregación magnética.

Se expusieron diferentes concentraciones y los resultados obtenidos tras la preconcentración del biomarcador mediante el uso de una cámara de agregación, se muestran en la tabla 3.9. Dichos resultados mostraron una mayor tasa de unión del péptido con las MNPs bioconjugadas con el aptámero, del 74 %, a la concentración de 5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ y usando 9 "Runs" que las restantes condiciones testadas. Adicionalmente, estos resultados se compararon con los obtenidos al utilizar estas mismas condiciones de estudio, pero con las MNPs sin funcionalizar con el aptámero, donde se observó una captura de oligómeros Aβ 1-42 sobre la superficie de las MNPs del 9 %, lo que confirma la especificidad del aptámero. Las condiciones del porcentaje de unión de Aβ 1-42 con las MNPs bioconjugadas con el aptámero, se muestran en la figura 3.21.

Tabla 3.9 Resultados de la determinación del péptido ß-amiloide enlazado a las MNPs: $Fe_3O_4@SiO_2$-Rgen3K$(KLVFF)_{16}$ (A) y $Fe_3O_4@SiO_2$ (B).

A	$Fe_3O_4@SiO_2$-Rgen3K$(KLVFF)_{16}$			
Runs	MNPs ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	Muestra (SNT, $pg \cdot mL^{-1}$)	Control ($pg \cdot mL^{-1}$)	MNPs-Aβ 1-42 (%)
1	5	71	104	32
9	5	30	116	74
9	$1 \cdot 10^{-3}$	40	92	57

B	$Fe_3O_4@SiO_2$			
Runs	MNPs ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	Muestra (SNT, $pg \cdot mL^{-1}$)	Control ($pg \cdot mL^{-1}$)	MNPs-Aβ 1-42 (%)
1	5	102	92	-11
9	5	111	122	9
9	$1 \cdot 10^{-3}$	62	100	38

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

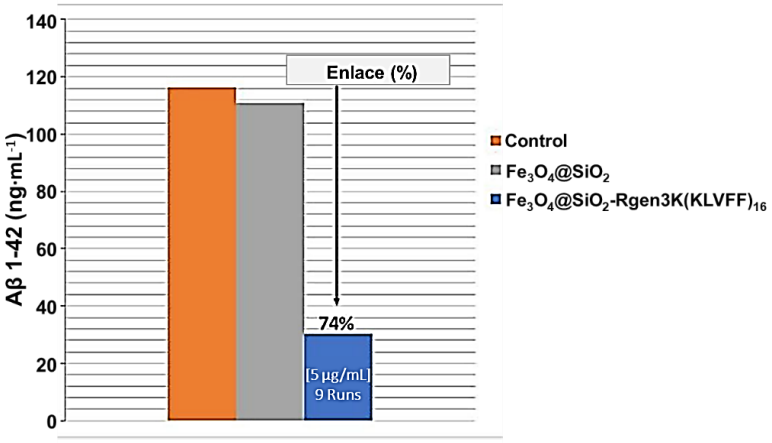


Figura 3.21: Representación gráfica de la concentración de Aß 1-42 anclado a 5 µg·mL^{-1} de las MNPs sin funcionalizar con el aptámero Rgen3K(KLVFF)$_{16}$ (barra gris) y funcionalizado con éste (barra azul) comparado con el control (ß-amiloide, barra naranja).

En base a los resultados obtenidos, se consiguió una eficacia de preconcentración de Aβ 1-42 de hasta 74 % sobre las MNPs bioconjugadas con el aptámero utilizando una cámara de agregación magnética, este tipo de biosensores son de gran interés a la hora de preconcentrar biomarcadores encontrados a muy bajas concentraciones, como los encontrados en estadíos tempranos de la enfermedad del Alzheimer u otras dolencias[76].

b MNPs para incrementar la sensibilidad de un Kit ELISA

Una vez se logró la preconcentración de Aβ 1-42 sobre las MNPs bioconjugadas, se procedió a la evaluación de la eficiencia de estas nanoestructuras como herramienta de mejora de la detección de este péptido mediante los kits ELISA.

Para llevar a cabo este estudio, las MNPs bioconjugadas con el aptámero se resuspendieron en una solución dispersante "Nanosperse" con el objetivo de reducir la agregación inespecífica de las MNPs. Las concentraciones, tanto de MNPs control como bioconjugadas, fueron de 5 µg·mL^{-1}. A continuación, estas MNPs se incubaron con 100 µl de Aβ 1-42 con 3 diferentes concentraciones (0.975, 125 y 500 pg·mL^{-1}) durante 1 hora a 4 ºC y bajo agitación orbital (100 rpm). Posteriormente, las MNPs bioconjugadas con el anticuerpo inmovilizado se separaron magnéticamente con la ayuda de un imán de neodimio y se lavaron con la solución Nanosperse. Este procedimiento se repitió hasta 3 veces y una vez finalizado dicho proceso de lavado, éstas se analizaron para determinar el Aβ 1-42 humano que captaron mediante un kit ELISA Quantikine® (R&D Systems). Las concentraciones utilizadas para la realización de la curva estándar del péptido Aβ 1-42 (7.8-500 pg·mL^{-1}) se utilizaron según las instrucciones del fabricante, con 3 diluciones adicionales con el fin de extender el rango inferior (0.9, 1.8 y 3.7 pg·mL^{-1}). La absorbancia se midió a 450 nm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para evaluar la sensibilidad de los ensayos ELISA (figura 3.22) se llevaron a cabo tres ensayos diferentes: a) curva estándar con péptido Aβ 1-42 libre, b) MNPs sin aptámero e incubadas en péptido Aβ 1-42, Fe_3O_4@SiO_2-Aβ 1-42 y c) MNPs bioconjugadas con aptámero y péptido inmovilizado sobre la superficie de Fe_3O_4@SiO_2-Rgen3K(KLVFF)$_{16}$-Aβ 1-42.

El procedimiento del ensayo ELISA tipo sándwich se realiza sobre unas placas donde previamente sea inmovilizado el péptido de interés, en nuestro un anticuerpo beta-amiloide. Sobre estas placas se añade la muestra a medir, que en nuestro caso fueron a) péptido libre, b) péptido asociado a MNPs, c) péptido inmovilizado sobre MNPs bioconjugadas con aptámero, en sus respectivos pocillos. Aquellas especies que tengan péptido se unirán al anticuerpo beta-amiloide inmovilizado sobre la placa ELISA. Para eliminar el material que no esté unido al anti-Aβ, se realizan tres lavados. A continuación, se agrega un segundo anticuerpo marcado con HRP (anticuerpo de detección) y se une al analito capturado. Finalmente, se adiciona TMB a los pocillos para la activación de un componente con color azul, debido a la oxidación con peróxido de hidrógeno, catalizado por el HRP que contiene el anticuerpo secundario. Esta reacción se detiene con la adición de una solución ácida (HCl), cambiando el color a amarillo instantáneamente y se mide la absorbancia a 450 nm. En la figura 3.22, se muestra a modo de ejemplo, una representación gráfica de este proceso de determinación de Aβ 1-42 mediante ELISA.

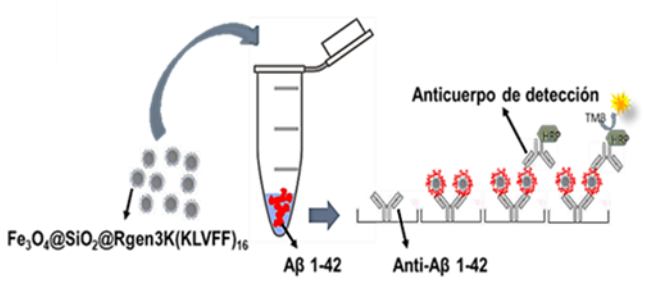


Figura 3.22: Representación esquemática de las MNPs funcionalizadas con el aptámero y su combinación con un kit ELISA disponible comercialmente para la determinación de beta-amiloide.

Los resultados del ensayo ELISA para la detección de péptido Aβ 1-42 libre (figura 3.23) muestra que, para las concentraciones más bajas estudiadas, 0.9 y 1.8 pg·mL^{-1}, (por debajo del rango recomendado por el fabricante 7.8 pg·mL^{-1} a 500 pg·mL^{-1}), las absorbancias registradas, 0.08 y 0.028 en unidades arbitrarias, son casi indetectables. Este límite de sensibilidad para Aβ 1-42 a concentraciones bajas, es insuficiente para diagnosticar procesos neurodegenerativos en pacientes con Alzheimer, ya que el péptido se encuentra en concentraciones muy bajas del orden de 20 pg·mL^{-1} [77,78].

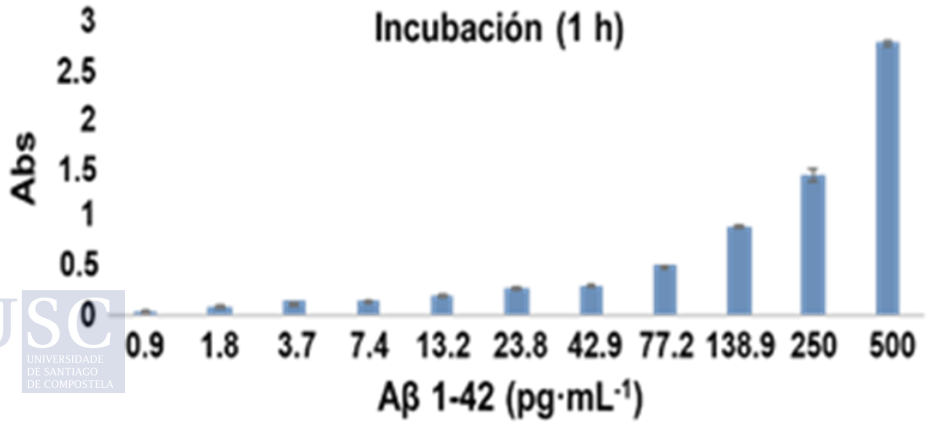


Figura 3.23: Curva estándar de detección de péptido Aβ 1-42 libre con las tres concentraciones adicionales fuera del rango recomendado por el fabricante.

Para valorar la posibilidad de mejora de sensibilidad del test ELISA, se realizaron dos ensayos en los que los péptidos se encontraban ligados a MNPs: ensayo-b) Fe_3O_4@SiO_2-Aβ 1-42 y ensayo-c) Fe_3O_4@SiO_2-Rgen3K$(KLVFF)_{16}$-Aβ 1-42.

Siguiendo los pasos del procedimiento ELISA tipo sándwich, tal y como se refleja en la figura 3.24, se puede observar que para las tres concentraciones estudiadas en ambos ensayos (b y c), la sensibilidad de detección es mayor para el caso de péptidos Aβ 1-42 inmovilizados mediante el uso de aptámero Rgen3K$(KLVFF)_{16}$ (barra naranja).

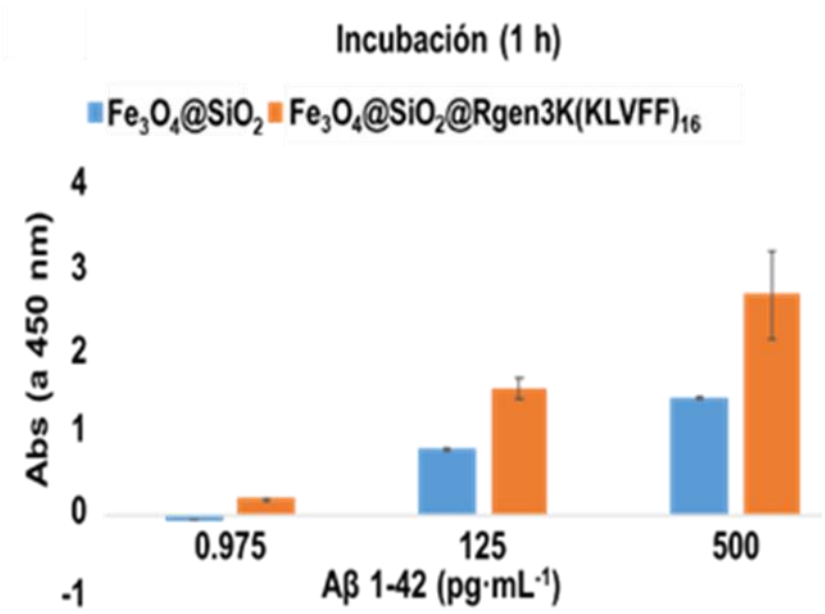


Figura 3.24: Resultados de la detección de Aß presentes en las MNPs sin funcionalizar (barra azul) o funcionalizadas con el péptido (barra naranja).

Lo más destacable del ensayo es que en general los valores de la absorbancia obtenidos utilizando péptidos anclados sobre MNPs (ensayos b y c) es que el valor de las absorbancias es superior a las absorbancias de pruebas con péptido libre (ensayo -a). Este hecho es más evidente en el rango de concentraciones más bajas, como se puede observar en la tabla 3.10, donde por ejemplo a concentraciones menores que 1 pg·mL^{-1}, el valor de la absorbancia para péptidos inmovilizados es similar al péptido libre a una concentración de 13.2 pg·mL^{-1} (14 veces superior, señaladas en color azul). Estos resultados indican que el kit ELISA permite aumentar la sensibilidad para rangos de concentración muy bajos, por debajo de 1 pg·mL^{-1} utilizando péptidos inmovilizados sobre MNPs con anticuerpos específicos, tal como el sistema de estudio utilizado, Fe_3O_4@SiO_2-Rgen3K$(KLVFF)_{16}$ -Aβ 1-42.

En el rango recomendado por el fabricante para realizar la curva estándar, se observa una adsorción no específica del beta-amiloide en las nanoestructuras magnéticas no bioconjugadas (señaladas en color rojo). Esta interferencia, puede ser debida a la interacción iónica entre los grupos silanoles presente en las MNPs con el exceso de péptido a concentraciones elevadas de 125 y 500 pg·mL^{-1}.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3.10 Comparativa de las absorbancias a diferentes concentraciones de los ensayos a), b) y c).

Concentración estándar (pg·mL^{-1})	Absorbancia (unidades arbitrarias)		
	Aß 1-42	Fe_3O_4@SiO_2-Aß 1-42	Fe_3O_4@SiO_2-Rgen3K$(KLVFF)_{16}$-Aß 1-42.
500 ensayos b) c)	2.779	1.426	2.676
250	1.427		
138.9	0.901		
125 ensayos b) c)	0.598	0.804	1.544
77.2	0.498		
42.9	0.304		
23.8	0.262		
13.2	0.194		
7.4	0.145		
3.7	0.128		
1.8	0.080		
0.975 ensayo b) c)	0.008	-0.065	0.192
0.9	0.028		

Dado que el rango de mayor interés se encuentra justamente por debajo de los 100 pg·mL^{-1}, donde el kit comercial deja de tener sensibilidad, el uso de NPs magnéticas bioconjugadas podría permitir incrementar sustancialmente la especificidad y sensibilidad para el análisis de muestras con una concentración muy baja de biomarcador. Además, puesto que el aptámero elegido tiene un tamaño mucho menor que el anticuerpo completo, presenta menos problemas de agregaciones inespecíficas y reduce de este modo los falsos positivos.

Esta prueba de concepto se puede trasladar al uso de diferentes aptámeros, y por tanto ser útil para la detección temprana de distintos tipos de enfermedades.

3.3 Nanoestructuras para terapias celulares

Las nuevas terapias en las que la nanotecnología puede aportar algo, incluyen no solamente la liberación controlada de fármacos o la muerte de células tumorales mediante hipertermia magnética, sino también la extracción de células propias para su diferenciación, crecimiento y autoimplante, como la terapia génica, que toma células del sistema inmune y las modifica para su posterior uso contra líneas tumorales (terapia carT[79]). La extracción de células de un medio biológico complejo, su selección y posterior cultivo o modificación por transfección, se pueden beneficiar del uso de NPs magnéticas bioconjugadas. El uso de anticuerpos anclados en las MNPs permite la selección de células específicas de un fluido biológico complejo (sangre, CSF, etc.), su extracción magnética y posterior cultivo. La magnetofección de células con genes o material biológico utilizando MNPs y un campo magnético atractivo aumenta enormemente la eficacia y rapidez del procedimiento, lo que mejora los procesos de producción biotecnológico.

Los estudios de transfección, fueron llevados a cabo en colaboración con el doctorando Román Seco de la Unidad de Nano-oncología, dirigido por el Dc. Rafael López, en el Grupo de Oncología Médica Translacional del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (Oncomet-IDIS). Todos los reactivos necesarios para llevar a cabo este estudio están compilados en el anexo I de esta Tesis Doctoral.

a Terapia génica

Las nanoestructuras utilizadas para llevar a cabo estos ensayos fueron nanoestructuras de sílice mesoporosa funcionalizadas con el polímero biocompatible fluorescente, polidopamina (PDA) con emisión en el rango del color azul, sobre las que se adsorbió un plásmido dopado con mcherry (fluorescente con emisión en el rango del color rojo) mediante incubación. Además, para analizar las ventajas de una transfección estimulada magnéticamente, respecto a las técnicas habituales de transfección pasiva, en uno de los ensayos se utilizaron NPs de sílice mesoporosa dopadas con NPs de magnetita. Ambos estudios se compararon con un ensayo de transfección pasiva de plásmido inducida con la ayuda de un kit comercial.

Los experimentos se llevaron a cabo con células epiteliales de cuello uterino, HeLa (ATCC® CCL-2™), incubadas en medio DMEM suplementado con 10 % de FBS y 1 % de penicilina-estreptomicina, a 37ºC y bajo atmósfera húmeda al 21 % O_2 y 5 % CO_2.

Los ensayos de transfección pasiva inducida se realizaron utilizando un kit comercial multiplicador (K2® transfection system, Biontex). Para ello, las células fueron sembradas a una densidad de $2 \cdot 10^5$ por pocillo en placas de 12 pocillos e incubadas durante 24 h para favorecer la fijación de estas sobre la superficie de cada pocillo. 2 horas antes de proceder con la transfección inducida, las células se trataron con el multiplicador K2® para evitar una respuesta inmune por parte de las células HeLa al ADN plasmídico ajeno. A continuación, las células se mezclaron con DMEM sin suplementar (100 µL), con el reactivo de transfección K2® (5 µL) y con 5 µL del ADN plasmídico (de concentración 1.2 µg· μL^{-1}). Tras 20 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla que contiene el ADN plasmídico, se inoculó gota a gota en cada pocillo y se incuban las células durante 16 h. Posteriormente, cada pocillo fue lavado con PBS y se renovó el medio de cada pocillo por medio de cultivo fresco.

Para los ensayos de transfección pasiva de plásmidos anclados a las NPs de sílice mesoporosa fluorescentes (mesop.Si@PDA), las células fueron sembradas a una densidad de $2 \cdot 10^5$ por pocillo, en placas de 12 pocillos e incubadas durante 24 h para favorecer la fijación de éstas sobre la superficie de cada pocillo. Por otra parte, se mezclaron DMEM sin suplementar (50 µL) con 5 µL del ADN plasmídico (de concentración 1.2 µg· μL^{-1}) y con 50 µg de mesop.Si@PDA. Tras 30 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla que contiene el ADN plasmídico funcionalizado con las cerámicas mesoporosas fluorescentes, se inoculó gota a gota en cada pocillo y se incubaron las células durante 16 h. Posteriormente, los pocillos fueron lavados con PBS y se renovó el medio de cada pocillo por medio de cultivo fresco.

Para la magnetofección de plásmidos anclados a las NPs de sílice mesoporosa magnéticas fluorescentes (mesop.Si@Fe_3O_4@PDA), $2 \cdot 10^5$ células por pocillo fueron sembradas en placas de 12 pocillos e incubadas durante 24 h. Por otra parte, el ADN plasmídico (5 µL) se mezcló con 50 µL de DMEM sin suplementar y con 50 µg de las mesop.Si@Fe_3O_4@PDA. Esta mezcla fue incubada durante 30 min. Posteriormente, la mezcla que contienen el ADN plasmídico con las NPs de sílice mesoporosa magnéticas fluorescentes, se inocularon a las células (gota a gota) y e incubaron durante 15 min con una placa magnética en la base de la placa de 12 pocillos.

Finalmente, los pocillos fueron lavados con PBS, seguido de la adición de medio de cultivo fresco.

Tanto las transfecciones como las magnetofecciones realizadas, fueron observadas bajo un microscopio confocal (Leica TCS SP8).

En la figura 3.25 se muestran las imágenes ópticas y fluorescentes del procedimiento de transfección pasiva tras 16 horas de incubación (micrografías A, C, E y G) y la magnetofección tras 15 minutos de incubación celular (micrografías B, D, F y H).

La comparativa de imágenes ópticas (figura 3.25 A y B) para ambos procesos, muestra que la magnetofección permite una internalización más eficiente de las NPs de sílice mesoporosa magnéticas que la transfección pasiva. La gran mayoría de las células magnetofectadas muestran un color oscuro como resultado de la internalización de las MNPs, mientras que las células transfectadas apenas se aprecia la presencia de MNPs.

Los espectros fluorescentes de ambas muestras, con emisión en el azul, aportado por el polímero fluorescentes PDA y con emisión en el rojo, aportado por el plásmido etiquetado con una proteína fluorescente (mcherry), permiten visualizar con mayor detalle el grado de internalización. Además, dado que la proteína mcherry fluorescente solo se expresa (emite fluorescencia) si el plásmido se internaliza en la célula[80], permite comprobar si el procedimiento es efectivo o si el plásmido se desprende de la superficie de la NP durante el proceso de internalización.

A mayores, en las figuras 3.25 C y D, se observa que la emisión de fluorescencia emitida por las NPs de mesop.Si@PDA en las células, es casi nula en la transfección pasiva, en comparación con la emisión encontrada en las mesop.Si@Fe_3O_4@PDA, en el proceso de magnetofección, donde la práctica totalidad de las células aparecen emitiendo en color azul. Además, las imágenes de fluorescencia roja (figura 3.25 E y F), que miden la presencia de ADN plasmídico en el interior celular, revelan que la magnetofección es mucho más eficiente en la internalización de material genético que la transfección pasiva. Hay que destacar que los plásmidos se encuentran simplemente adsorbidos a la superficie de las NPs y que, el efecto tractor del campo magnético no ha sido optimizado pudiendo ser demasiado intenso y provocar la desorción de los plásmidos durante la magnetofección, y que a pesar de ello la internalización es muy efectiva.

En las micrografías confocales superpuestas (figura 3.25 H y G) se puede observar la emisión fluorescente roja perteneciente al plásmido y la emisión azul de las NPs, lo que permite localizar a ambas especies en las células. Dado que al final de todos los procesos de transfección y magnetofección, las placas se lavan repetidas veces para eliminar el material excedente, es evidente que la emisión fluorescente proviene de materiales internalizados en las células.

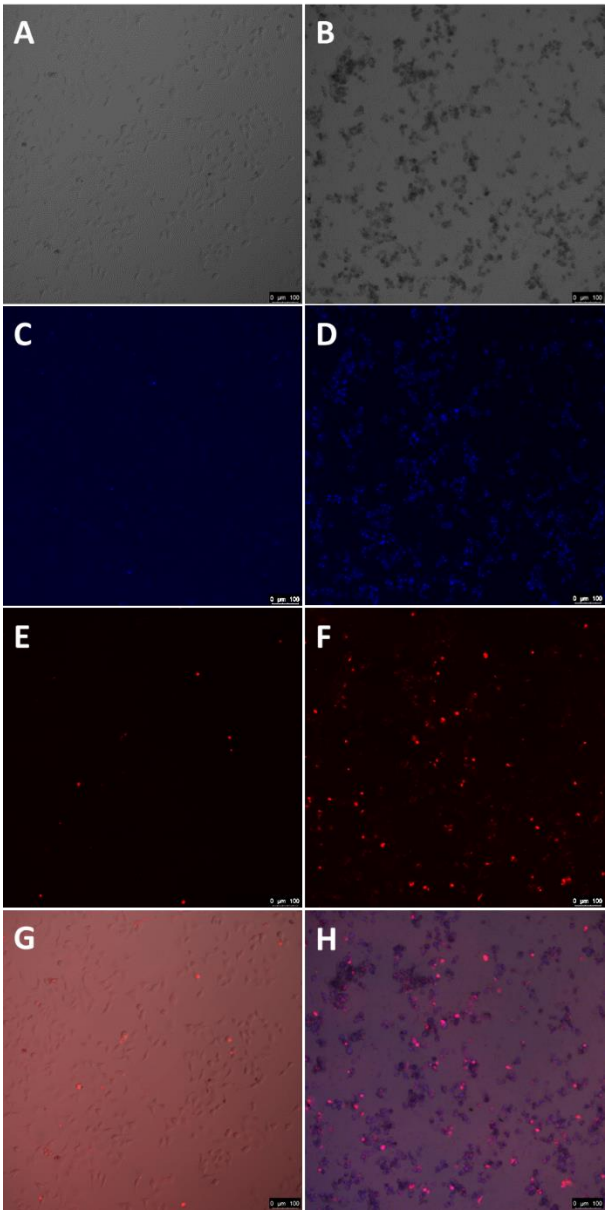


Figura 3.25: Comparación entre la transfección celular (A, C, E y G) y la magnetofección celular (B, D, F y H) de las imágenes ópticas (A y B) y fluorescentes con emisión de: la PDA (C y D); plásmido (E y F) y el solapamiento de los espectros de PDA y plásmido (G y H).

Para valorar la eficacia de los procesos de transfección y magnetofección de células HeLa, se comparó sus resultados con los obtenidos mediante proceso inducido con el kit comercial K2® transfection system, del fabricante Biontex. Este kit está basado en el dopaje de las células con liposomas catiónicos, junto con un multiplicador, inhibiendo la capacidad de las células de detectar ácidos nucleicos extraños y, de este modo, aumentar la eficiencia de la transfección[81,82].

En la figura 3.26 se muestran los resultados de la transfección celular del ADN plasmídico, inducida por este kit comercial (micrografía A) y magnetofectado con mesop.Si@Fe_3O_4@PDA-plásmido (micrografía B). Aunque ambos métodos presentan una alta expresión fluorescente proveniente del plásmido, en el caso de la magnetofección la respuesta es ligeramente más intensa.

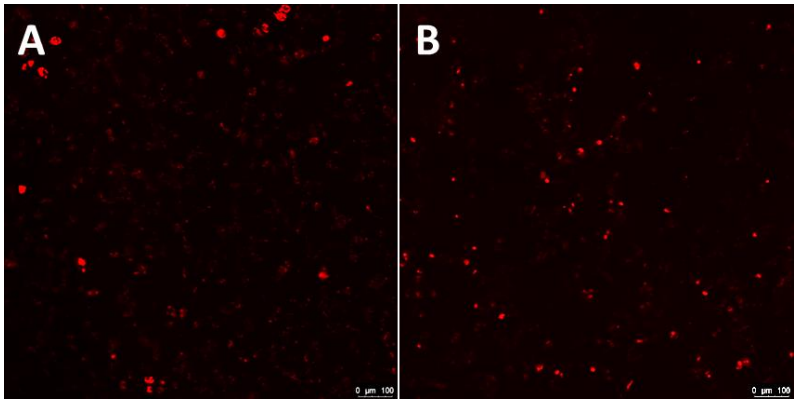


Figura 3.26: Comparación entre la transfección celular inducida por el kit comercial (A) frente a la magnetofección celular con mesop.Si@Fe_3O_4@PDA (B).

Estos resultados revelan la gran similitud de eficiencia de la magnetofección de las mesop.Si@Fe_3O_4@PDA en comparación con los kits comerciales usados para este fin y basados en compuestos orgánicos, que en su mayoría están formados por interacciones no covalentes, como los liposomas, usados como nanotransportadores por su biocompatibilidad y biodegradabilidad[83]. Sin embargo, las NP de sílice mesoporosas magnéticas presentan ventajes frente a los liposomas, tales como su alta capacidad de almacenamiento de moléculas, fármacos o proteínas en sus canales ordenados, junto con la incorporación de NPs superparamagnéticas, aprobadas para su comercialización como agentes de contraste en MRI, hacen de esta plataforma multimodal magnética un nanotransportador más rígido, con menores tiempos de transfección (15 min, en el caso de una magnetofección, frente a las 16 h que necesitaría una transfección pasiva) y sin la necesidad de usar reactivos como multiplicadores, que aumentan los costes en terapia clínica.

b Aislamiento magnético de células para su uso terapéutico

Además de la terapia génica, que busca internalizar material genético para modificar células, la extracción de material celular específico su cultivo y posterior autoimplante es una nueva forma de terapia muy útil en medicina regenerativa.

Para valorar la utilidad de diferentes MNPs para procesos de extracción magnética de células, se han utilizado nanoestructuras pequeñas, con un solo núcleo magnético (Fe_3O4@PDA, Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2 y Fe_5C_2@C-RITC) y nanoestructuras grandes multinúcleo (Fe_3O_4@CS y Fe_3O_4@SiO_2).

Los experimentos celulares se llevaron a cabo utilizando células epiteliales de cuello uterino, HeLa, éstas fueron incubadas en medio DMEM suplementado con 10 % de FBS y 1 % de penicilina-estreptomicina, a 37ºC bajo atmósfera húmeda al 21 % O_2 y 5 % CO_2.

Primero se procedió a internalizar, por transfección o por magnetofección, los distintos tipos de MNPs en células que fueron sembradas a una densidad de $1 \cdot 10^4$ por pocillo, en placas de 96 pocillos e incubadas durante 24 h para favorecer la fijación de estas sobre la superficie de cada pocillo. Tras las 24 h de incubación, las MNPs (100 $\mu g \cdot mL^{-1}$), se inocularon a las células HeLa, diluidas en medio suplementado para evitar efectos secundarios de citotoxicidad derivados de las MNPs. Dependiendo del tipo de captación celular utilizado, la incubación para

favorecer la internalización de las MNPs fue de 4 h (captación pasiva) o de 15 min (captación magnética por exposición a un imán permanente). Transcurrido este tiempo, se lavó cada pocillo con 200 µL de PBS, con el fin de retirar las MNPs no internalizadas en las células (este proceso de repitió hasta dos veces). Tras los lavados, se añadió medio suplementado fresco y las células marcadas con MNPs fueron observadas bajo un microscopio epifluorescente (Leica DMI 6000 B).

Las imágenes de microscopía óptica y confocal presentadas en la figura 3.27, muestran la internalización de MNPs pequeñas con un solo núcleo magnético, mediante transfección tras 4 h (micrografías B, C y D) y magnetofección tras 15 min de incubación (micrografías E, F y G). La eficiencia de la internalización, en ambos casos parece similar, aunque mediante las imágenes de fluorescencia (micrografía J), se puede distinguir que las MNPs de Fe_5C_2@C@SiO_2-RITC presentan una eficiencia mayor. Las MNPs de Fe_3O_4@PDA (micrografía H) presentan una eficiencia intermedia y las MNPs de Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2 (micrografía I) presentan menor grado de internalización.

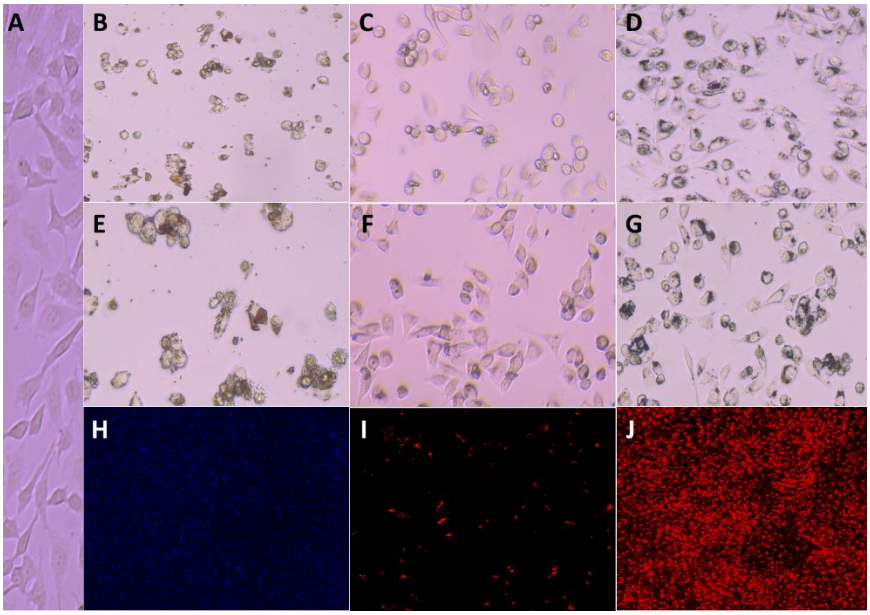


Figura 3.27: Comparación entre la transfección pasiva (micrografías B, C y D) y la transfección magnética (micrografías E, F, G, H, I y J) junto con sus imágenes de fluorescencia confocal de las mononúcleo MNPs: Fe_3O_4@PDA (B, E y H), Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2 (C, F e I) y Fe_5C_2@C@SiO_2-RITC (D, G y J), frente al control (A).

Los resultados obtenidos, muestran como las características fisicoquímicas que presentan cada MNPs, tales como el tamaño, morfología, funcionalización de la superficie y su carga superficial, afectan directamente a la captación celular[84,85]. En este caso, los tamaños y morfologías presentados por estas MNPs (Fe_3O_4@PDA, Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2 y Fe_5C_2@C-RITC) son similares, en el entorno de los 20 nm de diámetro y de morfología cuasi-esféricas. Sin embargo, se diferencian por la carga superficial y la funcionalización externa. Las células Hela, presentan una carga superficial ligeramente negativa, con un valor medio del potencial zeta de -19 mV a un pH de 7.4[86]. Esta membrana celular cargada negativamente facilita la internalización de MNPs con carga positiva, en comparación con la internalización de MNPs con cargas neutras o negativas, como se observó en estudios anteriores[87].

Por otra parte, la funcionalización de la superficie de las MNPs con grupos aminos (-NH_2) o grupos carboxilos (-COOH) son utilizados para aumentar la estabilidad y así modular la captación celular, frente a funcionalizaciones con grupos hidroxilos (-OH, presentes en los grupos silanoles)[88,89], este efecto puede explicar el hecho de que las Fe_5C_2@C-RITC, pese a presentar una carga negativa, la funcionalización de su superficie comprende desde grupos carboxílicos (aportados por la molécula RITC) y los grupos aminos (APTS), proporcionándoles una cierta ventaja a la hora de ser internalizadas por las células HeLa que las restantes MNPs testadas.

El mismo comportamiento fue observado en los estudios de internalización de las MNPs con multinúcleos magnéticos (figura 3.28), en donde las micrografías ópticas mostraron que las MNPs recubiertas con un aminopolisacárido como el quitosano (este biopolímero contiene en su superficie tanto grupos aminos como hidroxilos (micrografías B y D), presentó una mayor internalización que las recubiertas con sílice (C y E).

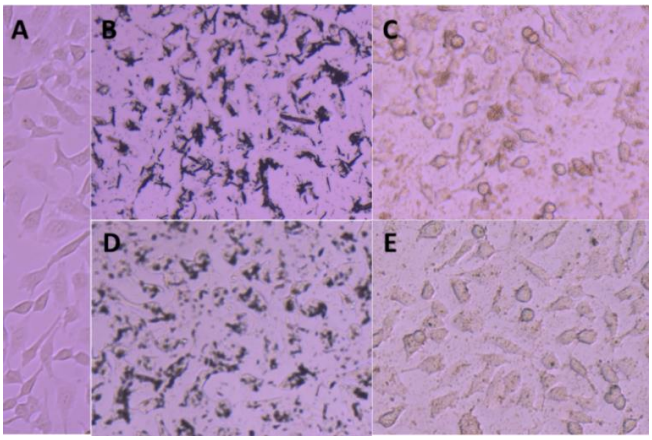


Figura 3.28: Comparación entre la captación pasiva (micrografías A y B) y la captación magnética (micrografías D y E) de las multinúcleo MNPs: Fe_3O_4@CS (B y D) y Fe_3O_4@SiO_2 (C y E), frente al control (A).

En base a estos resultados de captación celular, se observa que ambas internalizaciones de MNPs, ya sea por modo pasivo o magnético, ambas muestran grados de internalización similares, con la diferencia del tiempo de internalización, que fueron de 15 min a 4h, dependiendo de si la internalización de las MNPs se realizó mediante captación magnética o pasiva, respectivamente. En este caso, se demuestra que el tiempo es la principal ventaja que muestra una internalización magnética, ya que largos tiempos de incubación de varias proteínas o fármacos, conllevarían a una degradación de éstos[90,91].

3.4 Nanoestructuras para usos teragnósticos. Diagnóstico por imagen MRI/PET

Una vez que se estudió la respuesta in vitro de las MNPs como agentes de contraste negativo en MRI, el procedimiento y eficiencia del radiomarcaje con los radioisótopos ^{18}F y ^{89}Zr para imagen PET, se procedió a estudiar in vivo su utilidad como agentes teragnósticos, en donde se llevó a cabo un estudio comparativo de: a) administración intravenosa directa de MNPs radiomarcadas y b) administración de células mesenquimales transfectadas con ^{18}F-MNPs. Además de valorar la eficiencia del contraste para imágenes de MRI/PET en cada caso, se analizó la biodistribución y toxicidad in vivo y se procedió a un análisis histológico de todos los órganos de animal.

Este estudio se realizó en colaboración con el Prof. Uwe Himmerleich y la Doctora Sarah Belderbos del Centro Molecular de Imágenes de Pequeños Animales de la Universidad Católica de Lovaina, Bélgica (MOSAIC, KU Leuven). Los resultados de este estudio, se encuentran publicados en las revistas científicas: Nanomaterials-MDPI[65] y EJNMMI Research-Springer[92].

Tras analizar los resultados de los diferentes ensayos in vitro de contraste para T_2 en MRI, eficiencia y estabilidad del radiomarcaje, estabilidad coloidal y biocompatibilidad, se seleccionaron las NPs Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ radioetiquetadas con ^{18}F como el material que cumple con un mayor número de requisitos para su uso como agente multimodal MRI/PET in vivo.

Por otra parte, la línea celular seleccionada fueron las células madre mesenquimales de ratón (mMSCs), transducidas con un vector lentiviral que codifica la luciferasa y expresa una proteína fluorescente verde. Las mMSCs se mantuvieron en medio de cultivo DMEM-GlutaMax suplementado con 15 % de FBS y 1 % de penicilina-estreptavidina y cultivadas a 37ºC bajo atmósfera húmeda al 21 % O_2 y 5 % CO_2.

El radiomarcaje de ^{18}F en las NPs de Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ se realizó del modo descrito en la sección 3.1.5. y las células mMSCs se radiomarcaron mediante la internalización tras 1 h de estas mismas NPs radiomarcadas ^{18}F-Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ en solución salina.

Posteriormente, se retiró la solución salina de las células con el fin de separar las MNPs no internalizadas. Tras repetir una vez más la separación de las células con solución salina fresca, a estas se le adicionaron 0.5 mL de TryplE y se incubaron durante 5 min aproximadamente, para separar las células de la superficie de la placa. Posteriormente, se procedió al recuento total de las células mediante una cámara de recuento celular Neubauer y se determinó la concentración total de Fe, mediante espectrometría de masas de plasma (ICP-OES).

Los experimentos con animales fueron llevados a cabo por la Doctora Sarah Belderbos y aprobados por el Comité de Ética de KU Leuven (ECD nº 259/ 2015) y se llevaron a cabo de acuerdo con la normativa belga (Real Decreto de 29 de mayo de 2013), flamenca (Decisión del Gobierno flamenco para adaptar el Real Decreto de 29 mayo de 2013 y 17 de febrero de 2017) y europea (Directiva 2010/63/UE) sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos. Para este estudio, se utilizaron ratones de cepa C57Bl/6 de seis a ocho semanas de edad, alojados en jaulas ventiladas individualmente con acceso “ad libitum” a alimentos y agua. Éstos fueron asignados al azar a los diferentes grupos de experimentos.

Todas las imágenes, procedimientos de muestreo de sangre e inyecciones intravenosas, se realizaron bajo anestesia con 2 a 3 % de isoflurano (IsoVET, 100 mg/g, Eurovet, Piramal Critical Care, West Drayton, UK) al 100% de O_2.

Los ratones utilizados en este experimento se distribuyeron de la siguiente manera:

- para los ensayos con MNPs, a una concentración de 1.7 mM de Fe, con y sin radioetiquetar, fueron de n = 8 y n = 7, respectivamente;

- para los ensayos con células etiquetadas con MNPs o con ^{18}F-MNPs, fueron n = 7 y n = 7;

- y para los grupos controles, con solución salina o con ^{18}F, fueron n = 14 y n= 3, respectivamente.

Finalizado el estudio, se sacrificaron todos los animales por inyección intraperitoneal de 100 µL de un barbitúrico (Dolethal®; Vetoquinol, Northamptonshire, UK).

En cuanto el estudio en PET, el valor estandarizado de captación (SUV) fue obtenido mediante la aplicación de la siguiente ecuación:

$$SUV = \frac{Cuentas\ por\ minuto\ (CPM)\ en\ órgano}{Peso\ del\ órgano\ (g)} \Big/ \frac{CPM\ en\ cuerpo}{Peso\ del\ animal\ (g)}$$

Para llevar a cabo los ensayos in vivo, se prepararon dos lotes de MNPs (con una concentración de 1.70 mM de Fe), con diferente radioetiquetado de ^{18}F: a) 3 MBq y b) 10 MBq durante 10 minutos bajo agitación orbital y a temperatura ambiente. Posteriormente las ^{18}F-MNPs resultantes, se separaron mediante centrifugación (4000 rpm durante 20 min) y se resuspendieron en solución salina.

Las MNPs radioetiquetadas con a) 3 MBq, se introdujeron a los ratones mediante inyección intravenosa por la vena de la cola, las etiquetadas con b)10 MBq, se utilizaron para el etiquetado en mMSCs. Después del radioetiquetado de las mMSCs, se resuspendieron las $1 \cdot 10^5$ células en solución salina y se procedió a su administración a los ratones via inyección intravenosa.

Para los ensayos de biodistribución, tanto de las ^{18}F-MNPs como de células radiomarcadas, se tomaron 100 µL de cada muestra (con 0.91 MBq para las MNPs, o con 0.23 MBq para las mMSCs) y se inyectaron tras 1 min del inicio de la medida de MRI/PET (1 h de escáner en PET y 20 min en MRI mejorada por contraste dinámico, DCE-MRI). Para los grupos de control, se utilizaron 100 µL de solución salina o 1.15 MBq de ^{18}F. El DCE-MRI fue realizado después del ajuste de homogeneidad del campo local. Además, las imágenes MRI anatómicas en 3D de T_2 y su correspondiente mapa que cubre gran parte del hígado y pulmón, se realizaron antes y después de la inyección de las MNPs o células radiomarcadas con MNPs.

Tras la realización de las imágenes en MRI/PET, la camilla del ratón se desplazó a un escáner de tomografía computarizada (CT) para animales pequeños (SkyScan 1278, Bruker CT, Kontich, Bélgica) para la realización de un CT de cuerpo entero.

Las imágenes duales MRI/PET se obtuvieron de manera simultánea utilizando un escáner MRI de animales pequeños Bruker BioSpec 70/30 equipado con un bloque detector de PET con fotomultiplicador de silicio. Todos los estudios in vitro tienen un campo de visión de 60 x 60 mm y contienen 5 cortes de 1 mm de espesor con un espacio de 1 mm entre los cortes. Los estudios in vivo se realizaron mediante exploración PET estática de una hora con otra exploración simultánea de MRI-3D anatómico ponderado en T_2. El campo de visión utilizado fue de 35 mm x 80 mm x 30 mm y tiempo de adquisición de 13 min y 30 s.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalmente, los análisis estadísticos se realizaron mediante un software dedicado, GraphPad Prism versión 8.0.2. Las comparaciones entre grupos, tanto los tomados a diferentes tiempos de captación o entre diferentes grupos experimentales y órganos, se estudiaron utilizando un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con corrección de Bonferroni para

comparaciones múltiples o mediante un ANOVA bidireccional con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, respectivamente. Los datos se representaron como media ± desviación estándar.

En la figura 3.29 se muestran los resultados de la biodistribución in vivo realizada mediante un escáner simultáneo MRI/PET tras 1 h de adquisición, una vez los diferentes grupos de ratones fueron inyectados, respectivamente con a) Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ radioetiquetadas con ^{18}F y b) células etiquetadas con ^{18}F-MNPs. Ambos experimentos, fueron comparados con la imagen T_2 MRI de cuerpo del ratón, tras la inyección de una solución salina (0.9 % NaCl). En esta imagen, se puede visualizar la diferencia de contraste obtenida por los átomos de H, que producen una señal (hipo/hiperintensa), en función del tejido en el que estén ubicados[93].

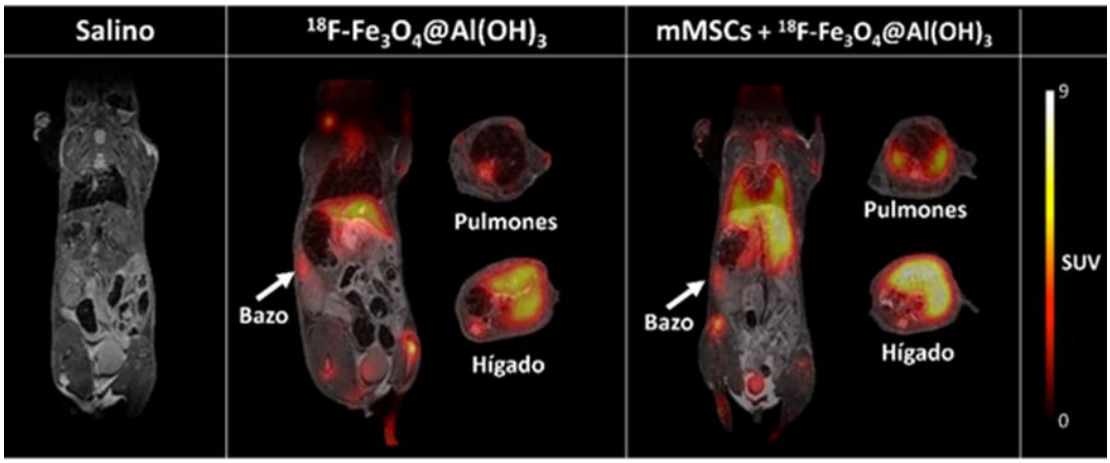


Figura 3.29: Biodistribución in vivo de las 18F-MNPs y de las mMSCs etiquetadas con ^{18}F-MNPs inyectadas intravenosamente en ratones. Imagen híbrida MRI/PET adquiridas simultáneamente tras la inyección de disolución salina, las ^{18}F-MNPs y las células etiquetadas con ^{18}F-MNPs en el bazo, hígado, pulmones y cuerpo. Imagen adaptada de la ref. 92. Copyright (2021) con permiso de MDPI.

Por otra parte, en las imágenes superpuestas MRI/PET donde se utilizaron las ^{18}F-MNPs, se aprecia que la captación mayoritaria de en el caso a) de inyección directa de MNPs radiomarcadas, estas se ubican principalmente en el hígado. Sin embargo, en el caso b) de administración de células radiomarcadas, en las mismas imágenes MRI/PET, se aprecia que la acumulación mayoritaria además de en hígado, aparece localizada en los pulmones. Este hallazgo es relevante pues los pulmones no son un órgano habitual donde acaben los materiales drenados del torrente sanguíneo, tales como hígado y riñones[92]. Por ello, mediante el uso de células mMSCs se podría usar en soluciones biomédicas para la captación pulmonar, tanto para terapias como diagnóstico. Adicionalmente, se observó una captación relativamente alta en el bazo en ambas poblaciones, sin embargo, la diferencia entre ambos grupos experimentales no fue significativo ($p = 0.8798$).

Este hecho se corroboró al realizar la relación $SUV_{hígado/pulmón}$ para los grupos inyectados con ^{18}F-MNPs y mMSCs radioetiquetadas, cuyos valores de 4 y 1.2, respectivamente (figura 3.30, imagen A) demuestran una mayor acumulación de las mMSCs radioetiquetadas en los pulmones.

Para confirmar estos resultados de captación obtenidos de los datos in vivo, los ratones de ambos grupos experimentales, fueron sacrificados y los órganos fueron aislados para un

recuento gamma posterior. Estos resultados ex vivo (figura 3.30 imagen B), corroboraron los datos obtenidos in vivo, mostrando una mayor captación tanto en el hígado como en los pulmones, aunque no fue significativo p = 0.0687 y p < 0.0001, respectivamente, la absorción de ambos grupos en el bazo, fue similar al encontrado en los datos in vivo (p = 0,7595), confirmando de este modo la baja acumulación, tanto de las ^{18}F-MNPs como de las células radioetiquetadas con ^{18}F-MNPs, en el hígado. Esta diferencia en la cuantificación de captación entre los datos in vivo y ex vivo (un factor 2 a 3.7 en cuanto al valor absoluto e la relación SUV), fue debido a que los valores SUV de PET (in vivo) se calcularon por volumen de órgano. En la biodistribución ex vivo, los valores SUV del contador gamma, se determinaron por peso de órgano, por lo que la densidad de los órganos, en especial la de los pulmones, juega un papel importante en la divergencia de estos valores entre in vivo y ex vivo. Sin embargo, en publicaciones relacionadas con el estudio in vivo, afirman que el efecto atenuador de los fotones también contribuye a la observación de estas diferencias[94,95].

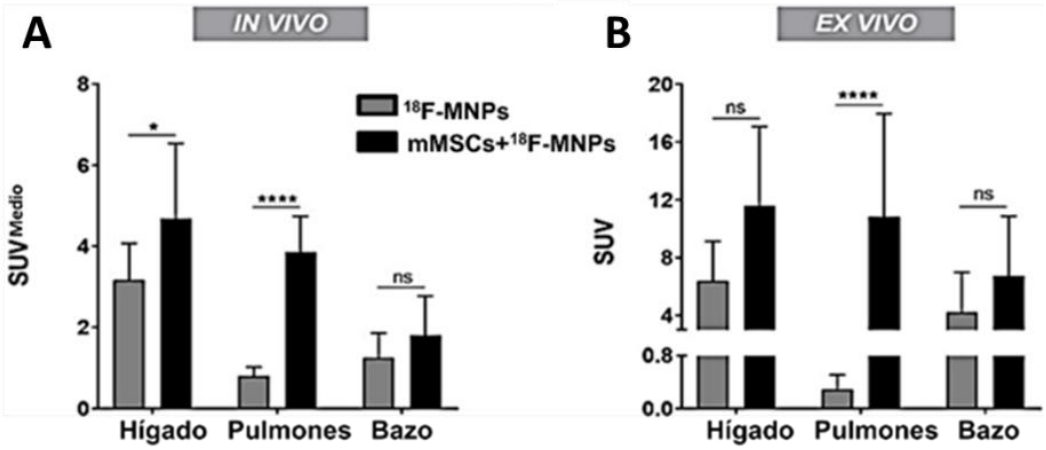


Figura 3.30: Cuantificación de los valores SUV del bazo, hígado y pulmones tanto in vivo (A) como ex vivo (B). Las estadísticas indicadas se basan en ANOVA bidireccional entre los diferentes grupos con Bonferroni para comparaciones múltiples (* p <0.05, **** p <0.0001, ns, no significativo). Imagen adaptada de la ref. 92. Copyright (2021) con permiso de MDPI.

Además, cabe destacar la aparición de una señal de menor intensidad en diversas partes del ratón (vejiga, pelvis, etc.) que se relacionan con una leve disociación del radiotrazador de las MNPs. Este mismo efecto fue observado también en los ensayos de estabilidad in vitro en diferentes medios fisiológicos de las ^{18}F-MNPs.

En cuanto la estabilidad de captación en el hígado y pulmones (figura 3.31 imagen A y B, respectivamente), durante la primera hora de exposición con las ^{18}F-MNPs y células radiomarcadas, fue realizado por un estudio de captación dinámica obtenido mediante un escáner PET de 28 cortes (20 fotogramas de 1 min, para que coincidan con las medidas con DCE-MRI, y 8 fotogramas de 5 min para los posteriores puntos de tiempo). En ambas imágenes, se observa que el hígado capta ambos sistemas, a)^{18}F-MNPs y b) células radioetiquetadas, de forma inmediata, mientras que los pulmones captan preferentemente las mMSCs radioetiquetadas. La captación en los órganos de ambos sistemas a) y b), se mantuvo estable durante el tiempo de adquisición (1 h).

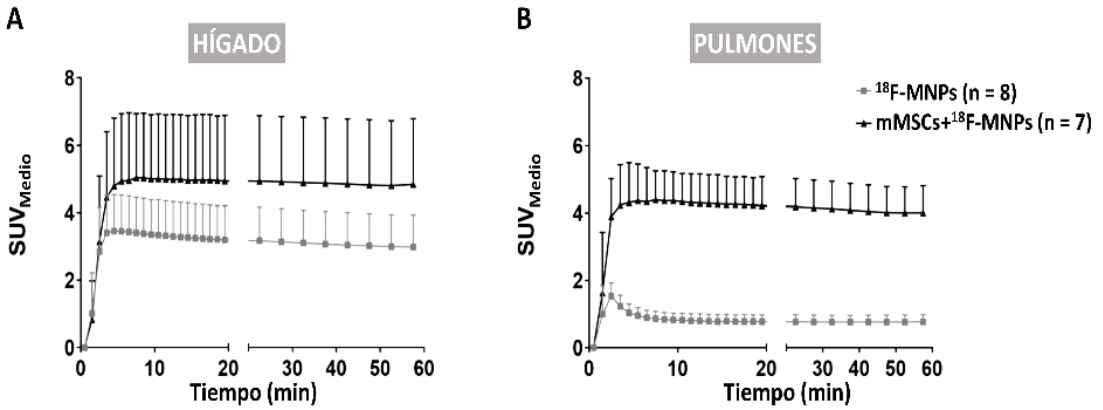


Figura 3.31: Captación dinámica de las Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ etiquetadas con ^{18}F (A) y de las células radiomarcadas con éstas ^{18}F-MNPs en hígado y pulmones. Imagen adaptada de la ref. 92. Copyright (2021) con permiso de MDPI.

Para confirmar los resultados anteriores de biodistribución y captación obtenidos por las imágenes híbridas de MRI/PET, se emplearon MNPs sin radioetiquetar, siendo estas internalizadas en las células para su estudio en MRI hasta un tiempo prolongado de post-inyección de 7 días (figura 3.32).

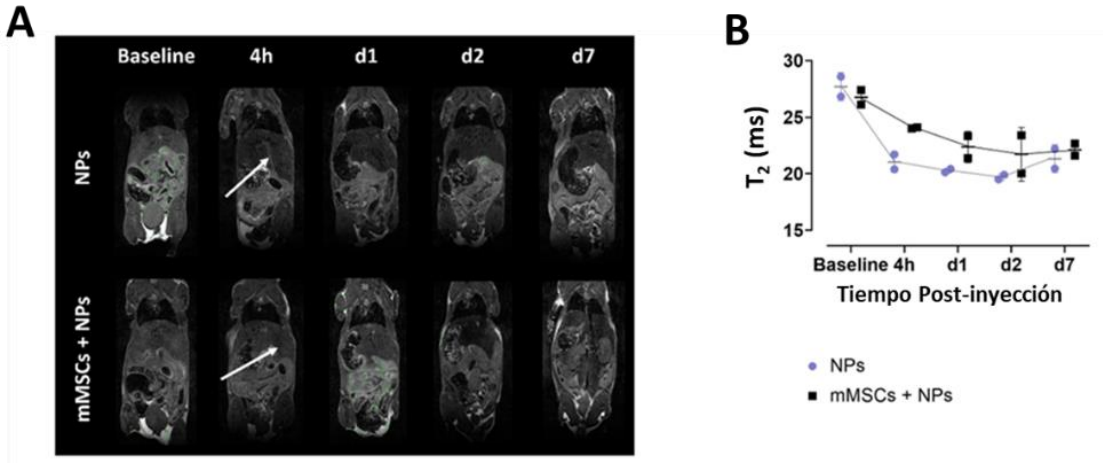


Figura 3.32: Resultados de la biodistribución a largo plazo de la captación dinámica de las Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ y células etiquetadas con éstas MNPs en el hígado, tras un periodo de 7 días, mediante imagen anatómica en 3D ponderada en MRI-T_2 (A) y gráfica del tiempo de relajación transversal frente al tiempo de post-inyección. Imagen adaptada de la ref. 92. Copyright (2021) con permiso de MDPI.

Los resultados revelaron que las MNPs libres se acumulan en el hígado principalmente, donde se observó una señal hipointensa que indica la presencia de las Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ (señalizado por una flecha blanca en la imagen A), manteniéndose en este órgano durante 7 días al menos. Tras las 4 h de la inyección de las MNPs, se observó la disminución de los valores de T_2 (imagen B) y de la señal hipointensa del hígado, demostrando su captación. Tras 7 días, se observó un aumento de los valores de T_2, lo que indica su eliminación del hígado.

Por otra parte, después de la inyección de MNPs internalizadas en las células, el contraste hipointenso del órgano y, por lo tanto, la captación de NP fue menos pronunciada. Esto se confirmó por una disminución menor en los valores de T2 del hígado.

Además, la biodistribución de las MNPs y de las MNPs internalizadas en las células se estudiaron mediante imagen de bioluminiscencia (BLI) hasta un tiempo prolongado de post-inyección de 7 días, figura 3.33.

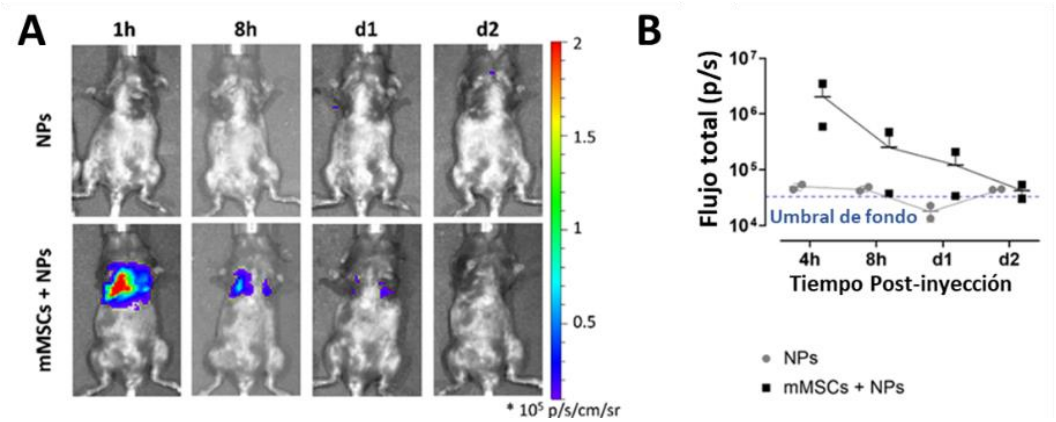


Figura 3.33: Resultados de la biodistribución a largo plazo de la captación dinámica de las Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ y células etiquetadas con éstas MNPs en pulmones tras un periodo de 7 días, mediante imagen de bioluminiscencia y mapeo en T_2 (A) y gráfica del flujo total frente al tiempo de post-inyección en (B). Imagen adaptada de la ref. 92. Copyright (2021) con permiso de MDPI.

Los resultados demostraron que las ^{18}F-MNPs internalizadas en las células y captadas por los pulmones, son retenidas solamente durante 24 h (imagen A, donde se observa bioluminiscencia provocada después de la inyección de D-luciferina), no observándose señal en otro órgano al igual que las MNPs no internalizadas en células. Este hecho, fue confirmado mediante una cuantificación del flujo total (imagen B). Sin embargo, en todos los experimentos, se observó una disminución repentina de la señal en los pulmones después de ocho horas con una disminución de la señal de fondo dentro de las 48 h tras la inyección. Esto indica la muerte celular de las mMSCs, lo que provoca la liberación de las MNPs y que posteriormente fueron fagocitadas por el sistema reticuloendotelial[96].

Posteriormente, se procedió a analizar en que parte del animal se acumula el ^{18}F que se libera de las MNPs radiotrazadas. Para ello, se realizó un escaneado híbrido por tomografía computarizada (CT) y PET de la estructura ósea de los ratones. Como referencia a este análisis y para tener un dato comparativo de donde se bioacumula ^{18}F libre, se realizó un escaneado híbrido MRI/PET de los ratones (n = 3) después de una inyección de [^{18}F]NaF, utilizado como control. Los resultados de la captación del radioisótopo, mediante la inyección de [^{18}F] NaF (figura 3.34) mostraron que la mayor captación del ^{18}F libre se localiza en la zona ósea de los ratones. Sin embargo, se apreció una notable disminución de captación en el hígado o pulmones, así como un aumento del radiotrazador en la vejiga y riñones, a diferencia de los grupos experimentales en donde se usaron las MNPs o las células con MNPs, ambas radioetiquetadas (ver figura 3.29).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

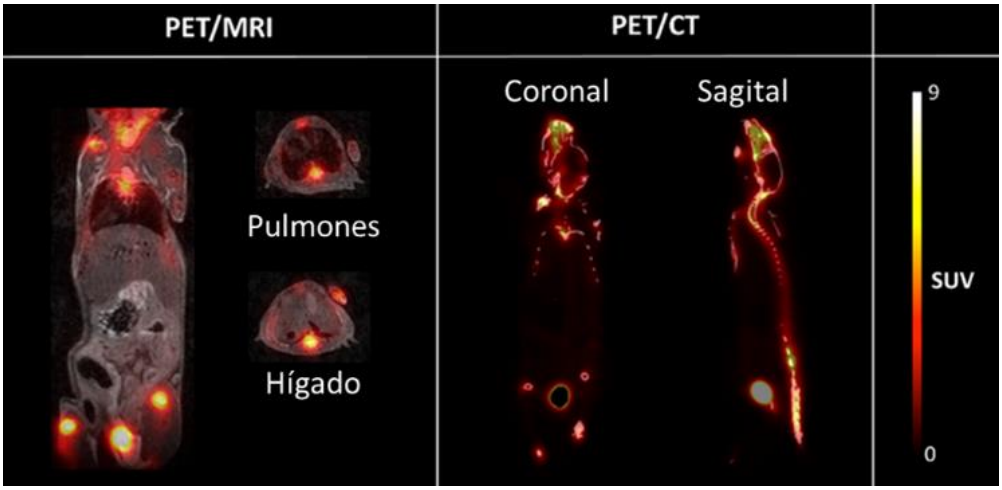


Figura 3.34: Imágenes híbridas PET/MRI y PET/CT tras la inyección de [^{18}F]NaF. Imagen adaptada de la ref. 92. Copyright (2021) con permiso de MDPI.

Por otra parte, en la imagen A de la figura 3.35, se muestra la cuantificación de esta biodistribución, localizada en hígado, pulmón y mayoritariamente en huesos, dando lugar a una relación $SUV_{hígado/hueso}$ de 0.15 y $SUV_{pulmones/hueso}$, de 0.26, cuyos valores obtenidos fueron bajos.

Adicionalmente, la captación dinámica de la señal en los huesos indica una captación relativamente rápida y estable del radiotrazador en el esqueleto después de la inyección, estabilizándose tras los 25 min posteriores a la inyección (figura 3.35, imagen B). Todos estos resultados ponen en manifiesto la baja acumulación del radioisótopo en los órganos como hígado o pulmones, captándose principalmente en los huesos.

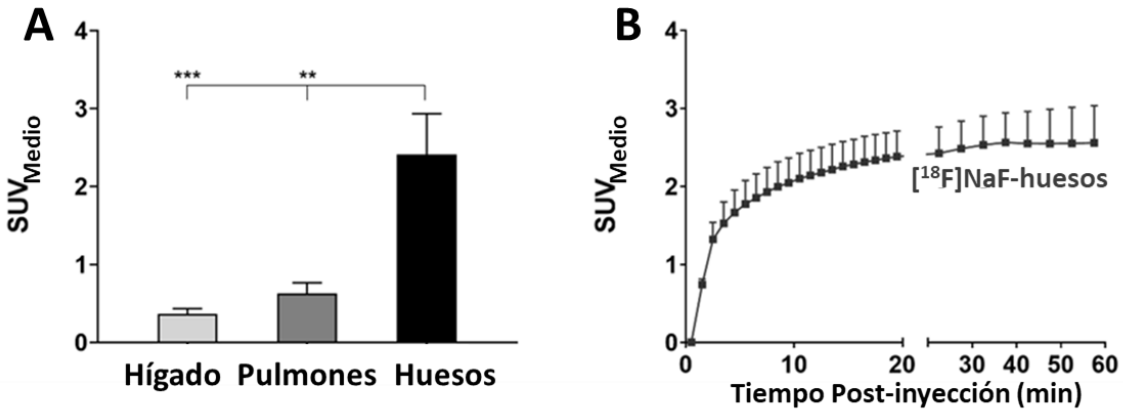


Figura 3.35: Biodistribución en hígado, pulmones y huesos (A), donde el SUV_{Medio} se obtuvo por ANOVA unidireccional de comparaciones múltiples de Bonferroni (** p = 0.0014 y *** p = 0.006) y la captación dinámica del ^{18}F en huesos (B). Imagen adaptada de la ref. 92. Copyright (2021) con permiso de MDPI.

Del mismo modo que en el estudio anterior en el que se evaluó la captación del radioisótopo no anclado a las MNPs, se llevó a cabo la visualización de ambos sistemas, a) ^{18}F-MNPs y b) células radioetiquetadas por medio de la superposición de las imágenes híbridas PET/MRI con las de CT (figura 3.36).

Los resultados revelan cierta captación del radiotrazador en el esqueleto de los ratones después de la inyección de ambas muestras (imagen A), donde:

- las relaciones de los valores de captación estandarizados del hígado frente a huesos ($SUV_{hígado/hueso}$) fueron para a) de $SUV_{hígado/hueso}$ =1.85 y b) $SUV_{hígado/hueso}$ =2.35,

- y el $SUV_{pulmón/hueso}$ para b), fue de 2.58.

Estos valores revelan una cierta disociación del radioisótopo en ambos casos, con un mayor desprendimiento ^{18}F de las MNPs radiomarcadas, que es absorbido por la estructura ósea (imagen B), y de menor liberación de ^{18}F por las células radiomarcadas que, por tanto, son sistemas de radiomarcaje más estables.

Por otra parte, tras observar en las imágenes PET/CT una acumulación adicional de ^{18}F en vejiga y riñones, más pronunciado al inyectar [^{18}F]NaF libre, se procedió al estudio de la secreción del radiotrazador a través de la vejiga y riñones tanto para el caso a) ^{18}F-MNPs como b) células radiomarcadas (figura 3.36, imagen C).

Los resultados indican que para el caso de MNPs y células radiomarcadas, la captación en vejiga y riñones es insignificante comparado con el caso de administración de ^{18}F libre, que se capta intensamente en la vejiga, en tanto que no hay diferencias significativas en la captación renal para los tres grupos experimentales.

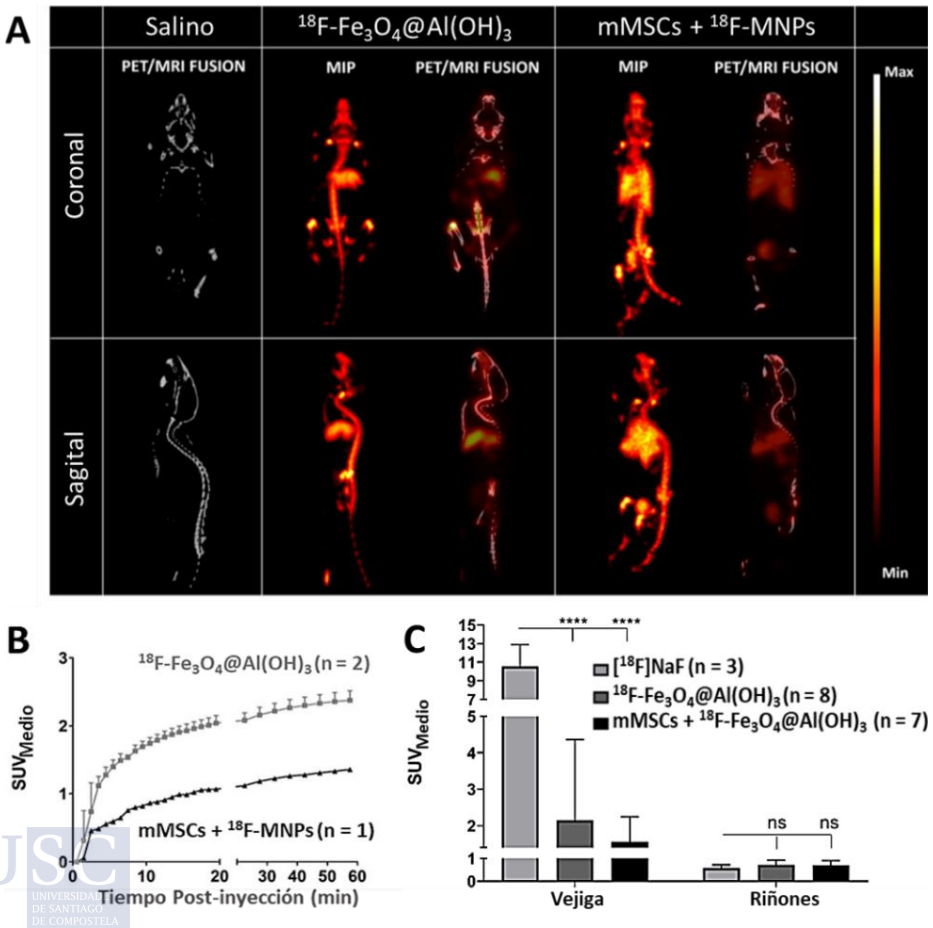


Figura 3.36: Captación ósea observada a través de imágenes híbridas PET/MRI superpuestas con la exploración de la estructura ósea obtenidas por CT de las ^{18}F-MNPs y células etiquetadas con éstas ^{18}F-MNPs con sus respectivas proyecciones de máxima intensidad (MIP) (A) junto con su cuantificación correspondiente realizada por captación dinámica en huesos (B) y la biodistribución en vejiga y riñones del control, [^{18}F]NaF, ^{18}F-MNPs y células etiquetadas por éstas ^{18}F-MNPs (C). Imagen adaptada de la ref. 92. Copyright (2021) con permiso de MDPI.

Todo ello indica que la vectorización preferente de las ^{18}F-MNPs al hígado, o las células mMSCs radiomarcadas con ^{18}F-MNPs, a los pulmones como diana preferente permiten utilizar a estos sistemas como agentes teragnósticos para diferentes órganos. En especial el uso de mMSCs radiomarcadas resultan de interés para realizar una detección, diagnóstico dirigido o terapia pulmonar (desde COVID, cáncer, enfermedades respiratorias, etc.).

Por último, se realizó un estudio de la toxicidad sistémica tras la administración intravenosa de ^{18}F-MNPs o células radioetiquetadas, valorando diferentes aspectos de respuesta inmune en ratones inmunodeprimidos, siguiendo estudios previos sobre la respuesta del sistema inmunológico (reacciones inflamatorias o alérgicas y posterior activación de otros sistemas) tras la interacción con las MNPs[97,98].

En la figura 3.37 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de leucocitos (glóbulos blancos, linfocitos, monocitos y granulocitos) en sangre, tras inyectar a ratones, MNPs radiomarcadas y células marcadas, después de 1 y 7 días de su exposición. Los resultados demostraron que la cantidad de leucocitos en sangre no se vio alterada en ningún grupo experimental en comparación con el control (solución salina), indicando una buena biocompatibilidad sistémica en ambos casos, a diferencia de otros estudios publicados en los que se analiza la respuesta de esta misma línea celular con MNPs[99-101].

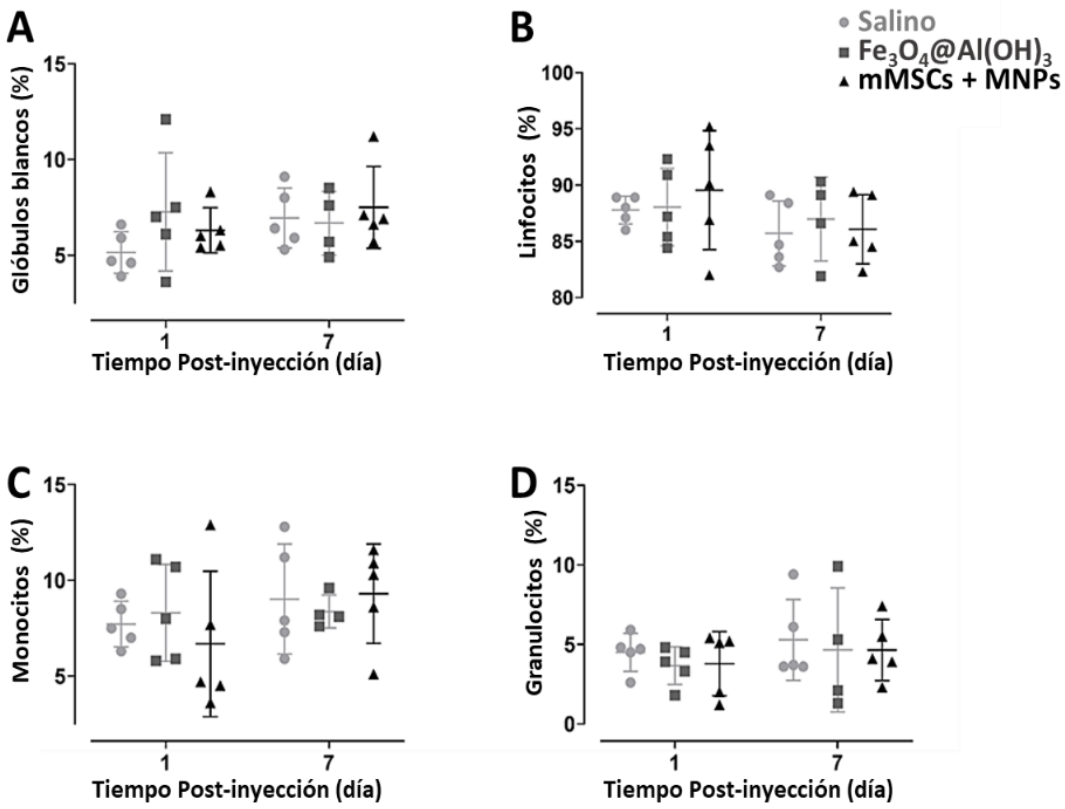


Figura 3.37: Estudio de leucocitosis tras la inyección de las MNPs de Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ o las mMSCs marcadas con estas MNPs comparadas con la inyección de solución salina (control) a los ratones en glóbulos blancos (A), linfocitos (B), monocitos (C) y granulocitos (D). n = 5/grupo. Imagen adaptada de la ref. 92. Copyright (2021) con permiso de MDPI.

La reciente aparición en clínica de nuevas técnicas multimodales como son los escáneres de resonancia magnética equipados con PET, ha generado un futuro prometedor en el diagnóstico

por imagen de patologías, pudiendo éstas ser detectadas a estadíos muy precoces. Es por ello que los agentes de contraste utilizados para estas técnicas deben optimizarse para obtener el mejor rendimiento y biocompatibilidad, para así posibilitar el éxito en el tratamiento en pacientes a diagnosticar.

En este estudio se ha diseñado un nanomaterial magnético, Fe_3O_4@$Al(OH)_3$, con un radiomarcaje rápido y eficaz para la obtención de imágenes simultáneas PET/MRI, para aplicaciones de marcaje o rastreo celular in vivo. Comparando los resultados obtenidos con otros trabajos previos, en los que usan similares estrategias[66,102], en los que usan unas concentraciones de hasta 60 µg de hierro y 37 MBq de actividad del radiotrazador, la nanoestructura magnética diseñada en esta Tesis, permite utilizar concentraciones mucho más bajas (11.85 µg de Fe y menos de 1 MBq de ^{18}F), permitiendo, incluso, obtener similares o mejores señales en T_2-MRI y PET.

Otras estrategias[103-105], sugieren la introducción de NPs o quelante, al que posteriormente se inyecta el radiotrazador y por enlace covalente se forma el complejo radiomarcado en el interior del organismo. Sin embargo, esta metodología produce una biodistribución no selectiva del radioisótopo como se observó en nuestro estudio de la biodistribución al inyectar una solución de $Na^{18}F$ en ratones, en donde se observó una mayor captación por parte de los huesos, provocando un bajo rendimiento en la formación del quelante-radioisótopo, disminuyendo así la sensibilidad del agente de contraste.

3.5 Conclusiones

En el presente capítulo se han desarrollado diferentes disoluciones acuosas dispersantes, usando agentes zwiteriónicos tales como la betaína o HEPES; agentes estabilizantes como glucosa o L-glutamina o PBS, que han demostrado ser útiles a la hora de conocer y mejorar la estabilidad coloidal de las nanoestructuras magnéticas multifuncionales para aplicaciones biomédicas in vitro o in vivo, presentando la mayoría de ellas valores de PDI de 0.2, valor relacionado a una buena dispersión coloidal.

Por otra parte, se ha estudiado la citotoxicidad in vitro de las MNPs, tanto desnudas como bioconjugadas con el mAb anti-pTau, por medio de dos líneas celulares (mMSCs y neuronas). En general, no mostraron apoptosis celular a concentraciones de alrededor de 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$, dependiendo de las nanoestructuras magnéticas testadas, corroborando su uso en el diagnóstico clínico.

Además, la simulación in vitro de una BBB, creada mediante el uso de diferentes espesores de células endoteliales de cerebro humano (hCMEC/D3), indicó que las nanoestructuras magnéticas fluorescentes compuestas por Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2 y mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2], ambas funcionalizadas con el mAb dirigido contra la proteína Tau fosforilado, atravesaron la barrera celular sin comprometer la integridad estructural de ésta, destacando las MNPs de Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2 por obtener una mayor eficiencia de cruce de barrera en comparación con NPs de Fe_3O_4 recubiertas con PEG, polímero conocido por mejorar la difusión de las NPs en el cruce de BBB.

Se estudiaron las propiedades relajométricas para evaluar la respuesta como agentes de contraste en T_1 y T_2, midiendo la relajatividad de tipo transversal o r_2, en MNPs compuestas

por magnetita, y de tipo longitudinal o r_1, en NPs paramagnéticas de hausmanita. Destacando como agente de contraste en T_2 las NPs superparamagnéticas de Fe_3O_4@$Al(OH)_3$, cuyo valor de r_2 obtenido supera los 450 $mM^{-1}\cdot s^{-1}$, demostrando poseer una mejor respuesta en T_2 que algunos de los agentes de contraste usados actualmente en clínica. Del mismo modo, las MNPs de Mn_3O_4@PAA, también alcanzaron valores de r_1 aceptables y comparables con algunos de los agentes de contraste usados en T_1.

Adicionalmente, se logró el radiomarcaje, mediante la inserción de radioisótopos (^{18}F y el ^{89}Zr) en la superficie de las nanoestructuras magnéticas (Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ y mesop.Si@Fe_3O_4@PDA) obteniéndose rendimientos de radiomarcaje eficientes. Además, la estabilidad de ambas nanoestructuras magnéticas radioetiquetadas se estudió en diferentes medios biológicos, donde se demostró que ambas nanoestructuras presentaban una buena estabilidad estructural, no observándose una desorción tan marcada del radioisótopo de la superficie.

Se ha conseguido, mediante un método optimizado, la funcionalización de un aptámero a la superficie de las MNPs de un solo núcleo (Fe_3O_4@SiO_2-Rgen3K$(KLVFF)_{16}$). Esta unión estratégica, ha demostrado una alta selectividad que tiene este aptámero por el péptido Aβ 1-42, pudiendo preconcentrar, mediante una cámara de agregación, gran parte de este péptido en la superficie de la MNP bioconjugada. El diseño de esta nanoherramienta magnética selectiva a este péptido, permite un aumento considerable de la sensibilidad de los kits comerciales ELISA para la detección de este biomarcador, presentando menos problemas de agregaciones inespecíficas que utilizando mAb y reduciendo, de este modo, los falsos positivos a la hora de detectar este indicador de la enfermedad del Alzheimer en concentraciones casi indetectables en estadíos tempranos de dicha enfermedad.

Se ha logrado la manipulación de la expresión génica en las células HeLa por medio de una magnetofección de ADN plasmídico anclado a un nanotransportador compuesto por las nanoestructuras de sílice mesoporosa magnéticas fluorescentes, mesop.Si@Fe_3O_4@PDA. Esta magnetofección, se comparó con un kit comercial de transfección inducida, obteniéndose resultados similares mediante la visualización fluorescente del plásmido mcherry expresado dentro de las células. Sin embargo, el uso de estas nanoestructuras magnéticas presentó la ventaja de disminuir el tiempo de incubación a solo 15 min, frente a las 16 h que necesita el uso del kit comercial para una transfección inducida, lo que se traduce a una reducción de costes y a la prevención de una desnaturalización del material biológico, que conlleva el uso de la transfección inducida.

Se estudió la internalización de diferentes nanoestructuras magnéticas, compuestas por un solo núcleo como por varios, cuyas superficies fueron funcionalizadas con materiales orgánicos, compuestos por carbono o pequeñas moléculas (APTS, RITC), biopolímeros (polidopamina, quitosano) u óxidos inorgánicos (sílice), en células HeLa. Esta internalización celular se realizó por dos mecanismos diferentes, destacando entre ellos, la internalización inducida magnéticamente en la que, con tan solo 15 min de incubación, se ha conseguido resultados similares o mejores que usando una internalización convencional (4 h), reduciendo tiempos de incubación que podrían propiciar estrés celular. Adicionalmente, se ha encontrado una alta afinidad de estas células HeLa a la hora de internalizar a las MNPs compuestas por Fe_5C_2@C-RITC, esta selectividad fue corroborada a mayores mediante una detección fluorescente, donde

también se observó que un gran número de MNPs de MCM41@Fe_3O_4@PDA lograban internalizarse en estas células.

Por último, una vez estudiada la respuesta in vitro de las NPs de magnetita recubiertas con $Al(OH)_3$ como agentes de contraste en MRI y PET, se procedió a la evaluación in vivo del potencial de las MNPs radioetiquetadas (Fe_3O_4@$Al(OH)_3$-^{18}F) como nanosondas magnéticas para imágenes multimodales en MRI/PET. Demostrando poseer una buena respuesta como agentes de contraste en T_2, así como una buena retención del radioisótopo cuando se internalizan dentro de las células mMSCs. Además, la adquisición simultánea de imágenes MRI/PET permitió la exitosa visualización de las ^{18}F-MNPs y de las células radioetiquetadas con estas ^{18}F-MNPs, obteniéndose un estudio de su biodistribución. Observándose que las células transfectadas con ^{18}F-MNPs se acumulan principalmente en los pulmones, lo que sería de especial interés para realizar una detección, diagnóstico dirigido o terapia pulmonar (desde COVID, cáncer o enfermedades respiratorias, entre otros).

Bibliografía

1. V. P. Chavda & D. Shah. Chapter 25 - Self-emulsifying delivery systems: one step ahead in improving solubility of poorly soluble drugs. Nanostructures for Cancer Therapy-Micro and Nano Technologies, 2017, 653–718.

2. A. M. Alkilany et al. Colloidal Stability of Citrate and Mercaptoacetic Acid Capped Gold Nanoparticles upon Lyophilization: Effect of Capping Ligand Attachment and Type of Cryoprotectants. Langmuir, 2014, 30, 46, 13799–13808.

3. E. Joseph & G. Singhvi. Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: A potential nanocarrier. Nanomater. Drug Deliv. Ther. 2019, 91–116.

4. M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani & M. R. Mozafari. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. Pharmaceutics, 2018, 10, 57.

5. M. Zielińska-Górska et al. Graphene oxide nanofilm and the addition of L-glutamine can promote development of embryonic muscle cells. J Nanobiotechnol. 2020, 18, 76.

6. W. Xi & A. Haes. Elucidation of HEPES Affinity to and Structure on Gold Nanostars. J. Am. Chem. Soc. 2019, 141, 9, 4034–4042.

7. Tomáš Suchý et al. Various Simulated Body Fluids Lead to Significant Differences in Collagen Tissue Engineering Scaffolds. Materials, 2021, 14, 4388.

8. H. Ardani et al. Enhancement of the stability of silver nanoparticles synthesized using aqueous extract of Diospyros discolor Willd. leaves using polyvinyl alcohol. Mater. Sci. Eng. 2017, 188, 012056.

9. Q. Yu, Q Wang, B. Li, Q. Lin & Y. Duan. Technological Development of Antibody Immobilization for Optical Immunoassays: Progress and Prospects. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2015, 45, 62–75.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10. C. C. Berry. Possible exploitation of magnetic nanoparticle–cell interaction for biomedical applications. J. Mater. Chem. 2005, 15, 543–547.

11. A. Caplan. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. J Cell Physiol. 2007, 213, 341–347.

12. E. Eggenhofer et al. The life and fate of mesenchymal stem cells. Front Immunol. 2014, 19, 148.

13. M. Flueraru, S. Remmick, W.G. Willmore, M. Poulter, T. Durst, M. Charron & J. Wright. Cytotoxicity and Cytoprotective Activity of Naphthalenediols in Rat Cortical Neurons. Chem Res Toxicol. 2006, 19, 1221–1227.

14. A.M. Belle, H.A. Enright, A. Sales et al. Evaluation of in vitro neuronal platforms as surrogates for in vivo whole brain systems. Sci Rep. 2018, 8, 10820.

15. M. Delgado-Esteban, I. García-Higuera, C. Maestre, S. Moreno & A. Almeida A. APC/C-Cdh1 coordinates neurogenesis and cortical size during development. Nat Commun. 2013, 4, 2879.

16. A. Ketkar-Atre, T. Struys, J.S. Soenen, I. Lambrichts, C.M. Verfaillie, M. de Cuyper & U. Himmelreich, Variability in contrast agent uptake by different but similar stem cell types. Intl. J. Nanomed. 2013, 8, 4577–4591.

17. J. Gomez-Sanchez, M. Delgado-Esteban, I. Rodriguez-Hernandez, T. Sobrino, N. Perez de la Ossa, S. Reverte, P. Bolaños, R. Gonzalez-Sarmiento, J. Castillo & A. Almeida. The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. J Exp Med. 2011, 208, 429–437.

18. M. Veas-Pérez de Tudela, M. Delgado-Esteban, C. Maestre, V. Bobo-Jiménez, D. Jiménez-Blasco, R. Vecino, J. Bolaños & A. Almeida. Regulation of Bcl-xL-ATP Synthase Interaction by Mitochondrial Cyclin B1-Cyclin-Dependent Kinase-1 Determines Neuronal Survival. J Neurosci. 2015, 35, 9287–9301.

19. J. López-García, M. Lehocký, P. Humpolíček, P. Sáha. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. J Funct Biomater. 2014, 8, 43–57.

20. B. Domac et al. Effects of PEGylated Fe–Fe3O4 core-shell nanoparticles on NIH3T3 and A549 cell lines. Heliyon, 6, 2020, e03124.

21. M. Ebadi et al. Synthesis and Cytotoxicity Study of Magnetite Nanoparticles Coated with Polyethylene Glycol and Sorafenib–Zinc/Aluminium Layered Double Hydroxide. Polymers 2020, 12, 2716.

22. A. Parrish, C. Freel & S. Kornbluth. Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013, 5, a008672.

23. L. Lossi, C. Castagna & A. Merighi. Caspase-3 Mediated Cell Death in the Normal Development of the Mammalian Cerebellum. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3999.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

24. K. Ivins, P. Thornton, T. Rohn & C. Cotman. Neuronal apoptosis induced by beta-amyloid is mediated by caspase-8. Neurobiol. Dis. 1999, 6, 440–449.

25. D. Couto et al. Interaction of polyacrylic acid coated and non-coated iron oxide nanoparticles with human neutrophils. Toxicology Letters. 2014, 225, 57–65.

26. P. Marrack, A. McKee & M. Munks. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. Nat. Rev. Immunol. 2009, 9, 287–293.

27. H. Peng, z. Yening & H. Zhongyu. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. Hum. Vaccin. Immunother. 2015, 11, 477–488.

28. A. Ducray, A. Stojiljkovic, A. Möller, M. Stoffel, H. Widmer, M. Frenz & M. Mevissen. Uptake of silica nanoparticles in the brain and effects on neuronal differentiation using different in vitro models. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 2017, 13, 1195–1204.

29. L. Tang & J. Cheng. Nonporous silica nanoparticles for nanomedicine application. Nanotoday, 2013, 8, 290–312.

30. A. Di Pasqua, K. Sharma, Y. Shi, B. Toms, W. Ouellette, J. Dabrowiak & T. Asef. Cytotoxicity of mesoporous silica nanomaterials. Journal of Inorganic Biochemistry, 2008, 102, 1416–1423.

31. X. Dong, Z. Wu, X. Li, L. Xiao, M. Yang, Y. Li, J. Duan & Z. Sun. The Size-dependent Cytotoxicity of Amorphous Silica Nanoparticles: A Systematic Review of in vitro Studies. Int J Nanomedicine, 2020, 15, 9089–9113.

32. P. Ariano, P. Zamburlin, A. Gilardino et al. Interaction of spherical silica nanoparticles with neuronal cells: size-dependent toxicity and perturbation of calcium homeostasis. Small, 2011, 7, 766–774.

33. I. Schmid, W Krall, C. Uittenbogaart, J. Braun & J. Giorgi. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. Cytometry, 1992, 13, 204–208.

34. F. Bock & S. Tait. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2020, 21, 85–100.

35. N. B. Madungwe et al. Mitochondrial inner membrane protein (mitofilin) knockdown induces cell death by apoptosis via an AIF-PARP-dependent mechanism and cell cycle arrest. Am J Physiol Cell Physiol. 2018, 315, C28–C43.

36. B. Kevadiya, B. Ottemann, M. Thomas, I. Mukadam, S. Nigam, J. McMillan, S. Gorantla, T. Bronich, B. Edagwa & H. Gendelman. Neurotheranostics as personalized medicines. Advanced Drug Delivery Reviews, 2019, 148, 252–289.

37. W. Banks, B. Terrell, SA. Farr, SM. Robinson, N. Nonaka & JE. Morley. Transport of amyloid β protein antibody across the blood-brain barrier in an animal model of Alzheimer's disease. Peptides, 2002, 23, 2223–2226.

38. W. Banks. From blood–brain barrier to blood–brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. Nat. Rev. Drug. Discov. 2016, 15, 275–292.

39. C. Saraiva, C. Praça, R. Ferreira, T. Santos, L. Ferreira & L. Bernardino. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. J. Controlled Release, 2016, 235, 34–47.

40. E. Allard, C. Passirani & J. Benoit. Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors. Biomaterials, 2009, 30, 2302–2318.

41. E. Sykova & C. Nicholson. Diffusion in brain extracellular space. Physiol. Rev. 2008, 88, 1277–1340.

42. E. A. Nance et al. A Dense Poly(ethylene glycol) Coating Improves Penetration of Large Polymeric Nanoparticles within Brain Tissue. Sci Transl Med. 2012, 4, 149.

43. J.-M. Rabanel, J. Faivre, S. Tehrani F, A. Lalloz, P. Hildgen & X. Banquy, Effect of polymer architecture on the structural and biophysical properties of PEG-PLA nanoparticles, ACS Appl. Mater. Interfaces, 2015, 7, 10374–10385.

44. V. Shalgunov, D. Zaytseva-Zotova, A. Zintchenko, T. Levada, Y. Shilov, D. Andreyev, D. Dzhumashev, E. Metelkin, A. Urusova, O. Demin, K. McDonnell, G. Troiano, S. Zale & E. Safarova, Comprehensive study of the drug delivery properties of poly(l-lactide)-poly(ethylene glycol) nanoparticles in rats and tumorbearing mice, J. Control. Release, 2017, 261, 31–42.

45. A. Mehmood, H. Ghafar, S. Yaqoob, U. Gohar & B. Ahmad. Mesoporous Silica Nanoparticles: A Review. J Develop Drugs, 2017, 6, 2.

46. G. Jha, S. Roy, P. Sahu, S. Banerjee, N. Anoop, A. Rahaman & M. Sarkar, Free-radical sensing by using naphthalimide based mesoporous silica (MCM-41) nanoparticles: A combined fluorescence and cellular imaging study. Chemical Physics Letters, 2018, 692, 324–332.

47. M. Blanchette & D. Fortin. Blood-Brain Barrier Disruption in the Treatment of Brain Tumors. In the Blood-Brain and Other Neural Barriers: Reviews and Protocols; Nag, S., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2011, 447–463.

48. I. Posadas, S. Monteagudo & V. Ceña. Nanoparticles for brain-specific drug and genetic material delivery, imaging and diagnosis. Nanomedicine (Lond). 2016, 7, 833–849.

49. S. Lombardo, M. Schneider, A. Türeli & N. Türeli. Beilstein J. Nanotechnol. 2020, 11, 866–883.

50. J. Yeon, D. Na, K. Choi, K. et al. Reliable permeability assay system in a microfluidic device mimicking cerebral vasculatures. Biomed Microdevices, 2012, 14, 1141–1148.

51. J. Loureiro, B. Gomes, G. Fricker, M. Coelho, S. Rocha & M. Pereira. Cellular Uptake of PLGA Nanoparticles Targeted with AntiAmyloid and Anti-Transferrin Receptor Antibodies for Alzheimer's Disease Treatment." Colloids and Surfaces B, 2016, 145, 8–13.

52. A. G. Roca, S. Veintemillas-Verdaguer, M. Port, C. Robic, C. J. Serna & M. P. Morales. Effect of Nanoparticle and Aggregate Size on the Relaxometric Properties of MR Contrast Agents Based on High Quality Magnetite Nanoparticles. J. Phys. Chem. B, 2009, 113, 7033–7039.

53. C. Granqvist & R.A. Buhrman, Ultrafine metal particles. Journal of Applied Physics, 1976, 47, 2200–2219.

54. Z. P. Liang & P. C. Lauterbur. Principles of Magnetic Resonance Imaging. New York, IEEE Press, 2000, 217–231.

55. F. Franconi, F. Seguin, C. B. Sonier, A. L. Pape & S. Akoka. T1 Mapping from Spin Echo and Stimulated Echoes. Med. Phys. 1995, 22, 1763–1769.

56. Nina Kostevšek. A Review on the Optimal Design of Magnetic Nanoparticle-Based T2 MRI Contrast Agents. Magnetochemistry, 2020, 6, 11.

57. N. Lee & T. Hyeon. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. Chem. Soc. Rev. 2012, 41, 2575–2589.

58. B. H. Kim et al. Large-Scale Synthesis of Uniform and Extremely Small-Sized Iron Oxide Nanoparticles for High-Resolution T1 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 12624–12631.

59. T. Shen, R. Weissleder, M. Papisov, A. Bogdanov & T. J. Brady, Magn. Reson. Med. 1993, 29, 599.

60. T. Ahmad, H. Bae, Y. Iqbal, I. Rhee, S. Hong, Y. Chang, J. Lee, D. Sohn. Chitosan-coated nickel-ferrite nanoparticles as contrast agents in magnetic resonance imaging. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2015, 381, 151–157.

61. Y. Xiang & J. Wang. Superparamagnetic iron oxide-based MRI contrast agents: Current status of clinical application. Quant Imaging Med. Surg. 2011, 1, 35–40.

62. Y.-X. J. Wang. Superparamagnetic iron oxide-based MRI contrast agents: current status of clinical application. Quant Imaging Med. Surg. 2011, 1, 35–40.

63. S. Richard, M. Boucher, Y. Lalatonne, S. Mériaux & M. Motte. Iron oxide nanoparticle surface decorated with cRGD peptides for magnetic resonance imaging of brain tumors. Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 2017, 1861, 1515–1520.

64. H. Yue et al. New Class of Efficient T2 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent: Carbon-Coated Paramagnetic Dysprosium Oxide Nanoparticles. Pharmaceuticals, 2020, 13, 312.

65. M.A. González-Gómez, S. Belderbos, S. Yañez-Vilar, Y. Piñeiro, F. Cleeren, G. Bormans, M. Deroose, W. Gsell, U. Himmelreich & J. Rivas. Development of superparamagnetic nanoparticles coated with polyacrylic acid and aluminum hydroxide as an efficient contrast agent for multimodal imaging. Nanomaterials, 2019, 9, 1626.

66. X. Cui et al. Aluminum hydroxide stabilised MnFe2O4 and Fe3O4 nanoparticles as dual-modality contrasts agent for MRI and PET imaging. Biomaterials, 2014, 35, 5840–5846.

67. V. W. Pike. PET Radiotracers: crossing the blood-brain barrier and surviving metabolism. Trends Pharmacol. Sci. 2009, 30, 431–440.

68. F. Chen, S. Goel, H.F. Valdovinos, H. Luo, R. Hernandez, T.E. Barnhart & W. Cai. In vivo integrity and biological fate of chelator-free zirconium-89-labeled mesoporous silica nanoparticles. ACS Nano, 2015, 9, 7950–7959.

69. L.T. Zhuravlev, The Surface Chemistry of Amorphous Silica. Zhuravlev Model. Colloids Surf. A, 2000, 173, 1–38.

70. J. Rosenqvist, P. Persson, S. Sjöberg, Protonation and charging of nanosized gibbsite (α-Al(OH)3) particles in aqueous suspension, Langmuir, 2002, 18, 4598–4604.

71. F. C. J. van de Watering et al. Zirconium-89 Labeled Antibodies: A New Tool for Molecular Imaging in Cancer Patients. BioMed Res. Int. 2014, 203601.

72. R. Raavé, G. Sandker, P. Adumeau, et al. Direct comparison of the in vitro and in vivo stability of DFO, DFO* and DFOcyclo* for 89Zr-immunoPET. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2019, 46, 1966–1977.

73. S. Heeneman, N. E. Deutz & W. A. Buurman. The concentrations of glutamine and ammonia in commercially available cell culture media. J. Immunol. Methods, 1993, 166, 85–9.

74. A. Pardo Montero. Diseño y caracterización de sistemas nanoestructurados magnéticos con potenciales aplicaciones en biomedicina y eliminación de contaminantes. Tesis doctoral. 2018, http://hdl.handle.net/10347/18265.

75. M. R. C. Marques, R. Loebenberg & M. Almukainz. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. Dissolution Technol. 2011, 18, 15–28.

76. A. Kumar, A. Singh & E. Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. Pharmacol. Reports, 2015, 67, 195–203.

77. S. Burg Cohen, M. Margulis, S. Roth & A. Danielli. Magnetically aggregated biosensors for sensitive detection of biomarkers at low concentrations. Appl. Phys. Lett. 2019, 115, 103702.

78. M. Pesaresi et al. Plasma levels of beta-amyloid (1–42) in Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment. Neurobiology of Aging, 2006, 27, 904–905.

79. K. Wilczynska & N. Waszkiewicz. Diagnostic Utility of Selected Serum Dementia Biomarkers: Amyloid β-40, Amyloid β-42, Tau Protein, and YKL-40: A Review. J. Clin. Med. 2020, 9, 3452.

80. X. Wang, F. Meng, Y.-T. Yen, R. Li & B. Liu. Nanotechnology-Based CAR-T Strategies for Improving Efficacy and Safety of Tumor Immunotherapy. Adv. Funct. Mater. 2021, 31, 2004713.

81. A. Vacas et al. Construction of Two mCherry Plasmids (pXG-mCherry) for Transgenic Leishmania: Valuable Tools for Future Molecular Analysis. Journal of Parasitology Research, 2017, 11, 1964531.

82. M. Bosnjak, U. Kamensek, G. Sersa, D. Stolfa, J. Lavrencak & M. Cemaza. Inhibition of the innate immune receptors for foreign DNA sensing improves transfection efficiency of gene electrotransfer in melanoma B16F10 cells. J Membr Biol. 2018, 251, 179–185.

83. V. Morales-Garcia et al. The high-risk HPV E6 proteins modify the activity of theeIF4E protein via the MEK/ERK and AKT/PKB pathways. FEBS Open Bio. 2020, 10, 2541–2552.

84. P. Ramos-Cabrer & F. Campos. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets. Int J Nanomedicine. 2013, 8, 951–960.

85. P. Foroozandeh & A. Aziz. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. Nanoscale Res. Lett. 2018, 13, 339.

86. Y. Qiu et al. Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. Biomaterials, 2010, 31, 7606–7619.

87. O. Bondar, D. Saifullina, I. Shakhmaeva, I. Mavlyutova, & T. Abdullin. Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers. Acta Naturae, 2012, 4, 78–81.

88. F. Marano, S. Hussain, F. Rodrigues-Lima, A. Baeza-Squiban & S. Boland. Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. Arch. Toxicol. 2011, 85, 733–741.

89. F. Alexis, E. Pridgen, L. Molnar & O. Farokhzad. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. Mol Pharm. 2008, 5, 505–515.

90. C. Graf et al. Surface Functionalization of Silica Nanoparticles Supports Colloidal Stability in Physiological Media and Facilitates Internalization in Cells. Langmuir. 2012, 28, 7598−7613.

91. M. Sajib, E. Albers, M. Langeland & I. Undeland. Understanding the effect of temperature and time on protein degree of hydrolysis and lipid oxidation during ensilaging of herring (Clupea harengus) filleting co-products. Sci. Rep. 2020, 10, 9590.

92. S. Belderbos, M.A. González-Gómez, F. Cleeren, J. Wolters, Y. Piñeiro, C.M. Deroose, A. Coosemans, W. Gsell, G. Bormans, J. Rivas & U. Himmelreich, Simultaneous in vivo PET/MRI using fluorine-18 labeled Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ nanoparticles: Comparison of nanoparticle and nanoparticle-labeled stem cell distribution. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag. Res. 2020, 10, 73.

93. E. J Blink. “Basic MRI Physics”, http://www.mri-physics.net/.

94. U. Elsasser-Beile, et al. PET imaging of prostate cancer xenografts with a highly specific antibody against the prostate-specific membrane antigen. J Nucl Med. 2009, 50, 606–611.

95. A-M. Rolle et al. Immuno PET/MR imaging allows specific detection of aspergillus fumigatus lung infection in vivo. Proc Natl Acad Sci. 2016, 113, E1026–E1033.

96. S. Nie. Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. Nanomedicine (Lond). 2010, 5, 523–528.

97. E. Park, S. Oh, Y. Kim, C. Yoon, B. Lee, S. Kim, et al. Distribution and immunotoxicity by intravenous injection of iron nanoparticles in a murine model. J Appl Toxicol. 2016, 36, 414–23.

98. H. Li, T. Huang, Y. Wang, B. Pan, L. Zhang, Q. Zhang & Q. Niu. Toxicity of alumina nanoparticles in the immune system of mice. Nanomedicine, 2020, 15, 927–994.

99. E. Eggenhofer, F. Luk, M. Dahlke & M. Hoogduijn. The life and fate of mesenchymal stem cells. Front Immunol. 2014, 5, 148.

100. E. Park et al. Biodistribution and toxicity of spherical aluminum oxide nanoparticles. J Appl Toxicol. 2016, 36, 424–33.

101. B. Manshian, S. Munck, P. Agostinis, U. Himmelreich & S. Soenen. High content analysis at single cell level identifies different cellular responses dependent on nanomaterial concentrations. Sci Rep. 2015, 5, 13890.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

102. E. Keliher et al. 89 Zr labeled dextran nanoparticles allow in vivo macrophage imaging. Bioconjug. Chem. 2011, 22, 2383–2389.

103. F. Cleeren, J. Lecina, M. Ahamed et al. Al^{18}F-labeling of heat-sensitive biomolecules for positron emission tomography imaging. Theranostics, 2017, 7, 2924–2939.

104. D. Thonon, D. Goblet, E. Goukens, G. Kaisin, J. Paris, J. Aerts J et al. Fully automated preparation and conjugation of N-succinimidyl 4- [18F] fluorobenzoate ([^{18}F]SFB) with RGD peptide using a GE FASTlabTM synthesizer. Mol. Imaging Biol. 2011, 13, 1088–1095.

105. D. Olberg, J. Arukwe, D. Grace, O. Hjelstuen, M. Solbakken, G. Kindberg, et al. One step radiosynthesis of 6-[18F]fluoronicotinic acid 2,3,5,6- tetrafluorophenyl ester ([^{18}F]F-Py-TFP): a new prosthetic group for efficient labeling of biomolecules with fluorine-18. J. Med. Chem. 2010, 53, 1732–1740.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. Conclusiones generales

- Se han logrado establecer las condiciones sintéticas adecuadas para la obtención de nanoestructuras magnéticas multifuncionales diseñadas para aplicaciones biomédicas, tanto in vitro como in vivo. Un ejemplo de esto, es la obtención de las nanoesferas magnéticas superparamagnéticas de Fe_3O_4 o ferromagnéticas de tipo core@shell Fe_5C_2@C, ambas desarrolladas por el método de descomposición térmica. Estas MNPs destacan por poseer un tamaño pequeño y una alta respuesta magnética.

- Se consiguió transferir a medios acuosos todos los nanomateriales magnéticos estables en medio orgánico o hidrofóbicos, presentando en general, una buena estabilidad coloidal, requerimiento indispensable para emplearse en diversas aplicaciones biomédicas.

- Se ha logrado embeber a las MNPs desarrolladas en esta Tesis con recubrimientos biocompatibles y que permitieron integrar de manera estable diversos materiales con actividad teragnóstica para diversas aplicaciones biomédicas.

- Se han desarrollado diferentes disoluciones acuosas dispersantes para mejorar la estabilidad coloidal de las MNPs.

- Se ha logrado cruzar una simulación de la BBB in vitro de las nanoestructuras magnéticas funcionalizadas con el mAb dirigido contra la proteína Tau fosforilado, Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2-anti- pTau y mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2]-anti-pTau, destacando entre ellas, las core@shell bioconjugadas por una mejor eficacia de cruce y un menor daño en la integridad fisiológica de la barrera celular.

- Se han desarrollado NPs superparamagnéticas de magnetita recubiertas con hidróxido de aluminio, que destacan por su alta relajatividad transversal, convirtiéndolas en potenciales candidatas como agentes de contraste en T_2.

- En general, las MNPs testadas no mostraron apoptosis celular a concentraciones de alrededor de 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$, corroborando su uso en el diagnóstico clínico.

- Se han desarrollado la funcionalización de MNPs core@shell con un aptámero selectivo al péptido Aβ 1-42, Fe_3O_4@SiO_2-Rgen3K$(KLVFF)_{16}$, que demostraron aumentar la sensibilidad de los kits comerciales ELISA para la detección de este biomarcador, incluso a concentraciones muy bajas.

- Se ha logrado insertar radioisótopos ^{18}F y el ^{89}Zr en la superficie de las nanoestructuras magnéticas (Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ y mesop.Si@Fe_3O_4@PDA) obteniéndose rendimientos de radiomarcaje eficientes y estables estructuralmente.

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Se ha logrado la manipulación de la expresión génica en las células HeLa por medio de una magnetofección de ADN plasmídico anclado a un nanotransportador compuesto por las nanoestructuras mesop.Si@Fe_3O_4@PDA. Obteniéndose resultados similares a un kit comercial de transfección inducida.

- Se ha logrado la manipulación de la expresión génica en las células HeLa por medio de una magnetofección de ADN plasmídico anclado a un nanotransportador compuesto por las nanoestructuras mesoporosas de sílice fluorescentes, mesop.Si@Fe_3O_4@PDA.

- Se ha logrado la internalización de diferentes nanoestructuras magnéticas, compuestas por un solo núcleo como por varios, cuyas superficies fueron funcionalizadas con materiales orgánicos, compuestos por carbono o pequeñas moléculas (APTS, RITC), biopolímeros (polidopamina, quitosano) u óxidos inorgánicos (sílice), en células HeLa.

- Se ha evaluado el potencial como agentes de contraste multimodal MRI/PET de las MNPs radioetiquetadas con ^{18}F (^{18}F-Fe_3O_4@$Al(OH)_3$) e internalizadas en células mMSCs. Observándose que las células transfectadas con ^{18}F-MNPs se acumulan principalmente en los pulmones, lo que sería de especial interés en diversas aplicaciones biomédicas tales como la detección, diagnóstico dirigido o terapia pulmonar.

4. General conclusions

- It has been possible to establish the suitable synthetic conditions for the obtaining multifunctional magnetic nanostructures designed for biomedical applications, both in vitro and in vivo. An example of this is obtaining superparamagnetic magnetic nanospheres of Fe_3O_4 or ferromagnetic core@shell Fe_5C_2@C type, both developed by the thermal decomposition method. These MNPs stand out for their small size and high magnetic response.

- All stable magnetic nanomaterials in organic or hydrophobic media were transferred to aqueous media, generally showing good colloidal stability, an essential requirement for use in several biomedical applications.

- It has been possible to embed the MNPs developed in this Thesis with biocompatible coatings, which allowed the stable integration of various materials with theragnostic activity for various biomedical applications.

- Different aqueous dispersing solutions have been developed to improve the colloidal stability of MNPs.

- An in vitro BBB simulation of functionalized magnetic nanostructures has been crossed with the mAb directed against phosphorylated Tau protein, Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2-anti-pTau and mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2]-anti-pTau, highlighting among them, the bioconjugate core@shell MNPs due to better crossing efficiency and less damage to the physiological integrity of the cell barrier.

- Superparamagnetic MNPs of aluminum hydroxide coated magnetite have been developed, which stand out for their high transversal relaxivity, making them potential candidates as T_2 contrast agents.

- In general, MNPs tested did not show cellular apoptosis at concentrations of around 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$, corroborating their use in clinical diagnosis.

- The functionalization of core@shell MNPs with a selective aptamer to the Aβ 1-42 peptide, $Fe_3O_4@SiO_2$-Rgen3K(KLVFF)16, were developed, which has been shown to increase the sensitivity of commercial ELISA kits for the detection of this biomarker, including at very low concentrations.

- It has been possible to insert ^{18}F and ^{89}Zr radioisotopes on the surface of magnetic nanostructures ($Fe_3O_4@Al(OH)_3$ and mesop.Si@Fe_3O_4@PDA), obtaining efficient and structurally stable radiolabelling yields.

- Manipulation of gene expression in HeLa cells has been achieved by means of a magnetofection of plasmid DNA anchored to a nanocarrier composed of mesop.Si@Fe_3O_4@PDA nanostructures. Obtaining similar results to a commercial induced transfection kit.

- The internalization of different magnetic nanostructures has been achieved, composed of a single nucleus or several, whose surfaces were functionalized with organic materials, composed of carbon or small molecules (APTS, RITC), biopolymers (polydopamine, chitosan) or inorganic oxides (silica), in HeLa cells.

- The potential as multimodal MRI/PET contrast agents of MNPs radiolabelled with ^{18}F (^{18}F-$Fe_3O_4@Al(OH)_3$) and internalized in mMSCs, have been evaluated. It is observed that cells transfected with these ^{18}F-MNPs accumulate mainly in the lungs, which would be of special interest in various biomedical applications such as detection, diagnosis or pulmonary therapy.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Anexo I: Reactivos y preparación de muestras para técnicas de caracterización

I Reactivos

Los reactivos utilizados para la producción de las diferentes nanoestructuras magnéticas multifuncionales (capítulo 2) fueron: acetilacetonato de hierro (III) ($Fe(acac)_3$, $Fe(C_5H_7O_2)_3$, 97 %), pentacarbonilo de hierro ($Fe(CO_5)$, 99 %), cloruro de hierro (III) hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 99 %), sulfato de hierro (II) heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 99 %), cloruro de hierro (II) tetrahidratado ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 99 %), cloruro de neodimio (III) hexahidratado ($NdCl_3 \cdot 6H_2O$, 99%), y cloruro de manganeso (II) tetrahidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 99 %) como compuestos precursores de los elementos metálicos empleados para la formación de las nanoestructuras magnéticas; estearato de sodio (NaSA, $CH_3(CH_2)_{16}COONa$, 99 %) como compuesto empleado para la formación del estearato de manganeso (II); tricloruro de boro (BCl_3, disolución 1 M en hexano) y oleato de sodio ($C_{18}H_{33}NaO_2$, 99 %) para la formación de los oleatos, tanto de hierro (III) como de NdFeB; 1,2-hexadecanodiol ($C_{16}H_{34}O_2$, 90 %) como agente reductor; ácido clorhídrico (HCl, 37 %) para disminuir el pH del medio y así facilitar la separación de las MNPs de las sales de hierro en el método sintético de co-precipitación y para parar la reacción entre TMB-mAb y su posterior visualización en el espectro visible; nitrato potásico (KNO_3, 99 %) como agente estabilizante a la hora de obtener MNPs cúbicas de tamaño homogéneo; oleilamina (OLA, $C_{18}H_{37}N$, 70 %), Igepal CO-520 ($C_{52}H_{92}O_3$, 99.99 %), dodecilsulfato de sodio (SDS, $NaC_{12}H_{25}SO_4$, 99 %), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, $C_{19}H_{42}BrN$, 98 %) y terc-butilamina ($(CH_3)_3CNH_2$, 98 %) como agentes surfactantes; hidróxido de amonio (NH_4OH, 28 %) e hidróxido de sodio (NaOH, 98 %) como agentes basificadores; nitrato de aluminio nonahidratado ($Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, 98 %) y sulfato de aluminio hexadecahidratado ($Al_2(SO_4)_3 \cdot 16H_2O$, 98 %) como reactivos precursores de la capa de hidróxido de aluminio; tetraetoxisilano (TEOS, 99.99 %) como precursor de la recubierta con sílice; 3-aminopropiltrietoxisilano (APTS, 99 %) como agente funcionalizante de la recubierta con sílice; ácido 12-aminoláurico (ALA, $C_{12}H_{25}NO_2$, 95 %), ácido poliacrílico (PAA, $(C_3H_4O_2)n$, Mw=1800 Da), ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$, 90 %) y citrato de sodio dihidratado ($C_6H_9Na_3O_9$, 98 %) como agentes funcionalizantes de las nanoestructuras magnéticas; ácido 4-bifenilcarboxilico ($C_{13}H_{10}O_2$, 95 %) para inhibir el crecimiento de la MNPs cúbicas formadas durante la reacción; bicarbonato amónico (NH_4HCO_3, 99 %), decilamina (DE, $C_{10}H_{23}N$, 95 %) y dodecilamina (DDA, $C_{12}H_{27}N$, 99 %) como sales generadoras de burbujas de gas $NH_3 \cdot H_2O$ para la formación de nanoesferas magnéticas huecas; N-óxido de trimetilamina (TMAO, C_3H_9NO, 95 %) como agente de transferencia de oxígeno; isotiocianato de fluoresceína (FITC, $C_{21}H_{11}NO_5S$, 90 %) e isotiocianato de rodamina B (RITC, $C_{29}H_{30}ClN_3O_3S$, 90 %), como moléculas fluorescentes; clorhidrato de dopamina ($C_8H_{11}NO_2$, grado HPLC) como compuesto precursor del polímero fluorescente (polidopamina); $Rgen3K(KLVFF)_{16}$, como aptámero sintetizado por la Doctora Valeria Perugini en el Centro de Medicina y Dispositivos Regenerativos de la Universidad de Brighton, con actividad biológica para ser anclado sobre las MNPs; los anticuerpos dirigidos contra las proteínas beta-amiloide (anti-Aβ) o Tau fosforilado (anti pTau B6) fueron suministrados por las empresas Biotechpharma UAB y STAB VIDA; anticuerpo secundario de conejo anti IgG1-ratón (Anti-Mouse IgG1 (γ-chain specific)-Peroxidase antibody produced in rabbit) como anticuerpo de detección en la determinación de los mAb en el ensayo ELISA; peróxido de hidrógeno (H_2O_2, 30 % en peso), como agente activante de los grupos silanol de las nanopartículas magnéticas con recubierta con silica; trimetilglicina (betaína, $C_5H_{11}NO_2$, 99 %) como agente dispersante de las nanoestructuras

magnéticas funcionalizadas con aptámero; glucosa (D-(+)-$C_6H_{12}O_6$, 99.5 %) como agente estabilizante del dispersante; albúmina de suero bovino (BSA, $C_{123}H_{193}N_{35}O_{37}$, 98 %) como proteína control para realizar los ensayos de cuantificación y cualificación de anticuerpos anclados a las nanoestructuras magnéticas bioconjugadas; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, $C_8H_{17}N_3$, 99 %), N- hidroxi sulfosucidimida (Sulfo-NHS, $C_4H_4NnaO_6S$, 98 %) como activadores de los grupos carboxílicos o hidroxilos de las nanoestructuras magnéticas; 3,3′,5,5′-Tetrametilbencidina (1-STEP ULTRA TMB, líquido) como agente cromogénico para la cuantificación del mAb en kits de ELISA difenil éter ($C_{12}H_{10}O$, 99 %), etanol (C_2H_6O, grado absoluto), etilenglicol (EG, $C_2H_6O_2$, anhídrido), isopropanol (IPA, C_3H_8O, 99.5 %), hexano (C_6H_{14}, 99 %), ciclohexano (CHX, C_6H_{12}, 99.9 %), octadeceno (ODE, $C_{18}H_{36}$,90 %), trioctilamina (TOA, $C_{24}H_{51}N$, 98 %), éter bencílico ($C_{14}H_{14}O$, 98 %), tetrahidrofrurano (THF, C_4H_8O, 99%) y agua Mili-Q (resistividad 18.2 $M\Omega \cdot cm^{-1}$, Millipore®) como disolventes en el que se llevan a cabo las reacciones o para el lavado de las nanoestructuras magnéticas obtenidas. Todos los reactivos anteriores fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

Los reactivos necesarios para llevar a cabo el estudio de habilidad para cruzar barreras fisiológicas (capítulo 3, apartado 3.1.3) fueron: EGM-2 (medio de cultivo celular de crecimiento endotelial), rhEGF (factor de Crecimiento Epidermal Recombinante), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular recombinante humano), IGF (factor de crecimiento recombinante humano insulinico-1), rhFGF (factor de crecimiento fibroblastico recombinante humano), gentamicina (antibiótico), ácido ascórbico, hidrocortisona y FBS (suero fetal bovino), fueron suministrados por Lonza. Anticuerpo secundario de conejo anti IgG1-ratón conjugado a peroxidasa (Anti-Mouse IgG1 (γ-chain specific)-Peroxidase antibody produced in rabbit), ácido clorhídrico (HCl, 36 % en peso), 3,3′,5,5′-Tetramethylbencidina (1-STEP ULTRA TMB, líquido), Tween 20 y tampón fosfafo salino (PBS). Todos los reactivos anteriores fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

Los reactivos necesarios para llevar a cabo la estabilidad y eficiencia del radiomarcaje (capítulo 3, apartado 3.1.5) fueron: TrypLE (enzima recombinante), DMEM-GlutaMax (medio de cultivo celular), FBS (suero fetal bovino), Penicilina-Estreptomicina (antibiótico) fueron suministrados por Gibco, ThermoFisher Scientific. DFO (p-SCN-Bn-Deferoxamina) fue suministrada por Macrocyclis™. HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$, 1M), carbonato de sodio (Na_2CO_3, 99.5 %), ácido cítrico ($C_6H_8O_7$, 99 %), acetonitrilo (C_2H_3N, 99.5 %) fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Oxalato de Zirconio-89 (^{89}Zr, 1M en ácido oxálico, 997.0 $MBq \cdot mL^{-1}$), fue suministrado por PerkinElmer. El ^{18}F se produjo mediante la irradiación de $H_2{}^{18}O$ con protones de 18 MeV utilizando un ciclotrón (IBA 211 Cyclone 18/9, Louvain-la-Neuve, Belgium NaF, 1 GBq/mL).

Los reactivos utilizados para llevar a cabo el estudio de las MNPs para la detección de biomarcadores (capítulo 3, apartado 3.2) fueron: glucosa (D-(+)-$C_6H_{12}O_6$, 99.5 %), (betaina, $C_5H_{11}NO_2$, 99 %), péptido beta-amiloide humano (Aβ 1-42, 95 %, liofilizado) y agua ultrapura Mili-Q (resistividad 18.2 $M\Omega \cdot cm^{-1}$, Millipore®). Todos los reactivos anteriores fueron suministrados por Sigma-Aldrich

Los reactivos utilizados llevar a cabo el estudio de las nanoestructuras para terapias celulares (capítulo 3, apartado 3.3) fueron: DMEM (medio de cultivo celular), FBS (suero fetal bovino) y Penicilina-Estreptomicina (antibiótico) fueron suministrados por Gibco, ThermoFisher

Scientific. ADN plasmídico con etiqueta fluorescente indicadora de la transfección (mcherry) fue sumistrado por la la Unidad de Nano-oncología, perteneciente al grupo de Oncología Médica Translacional del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (Oncomet-IDIS). Clorhidrato de dopamina ($C_8H_{11}NO_2$, grado HPLC) fue suministrado por Sigma-Aldrich. Agua ultrapura Mili-Q (resistividad 18.2 $M\Omega \cdot cm^{-1}$, Millipore®). Como disolvente para lavar o redispersar a las NPs mesoporosas de sílice.

II Procedimiento de caracterización de muestras

- Microscopía electrónica de barrido (SEM):

Las imágenes de SEM de las nanoestructuras desarrolladas y expuestas en esta tesis, fueron obtenidas mediante el uso de microscopio electrónico de barrido modelo Zeiss FE-SEM ULTRA Plus (operando a 5 kV). Para la obtención de las micrografías, fue necesario preparar una suspensión diluida (de color tenue) de cada una de las muestras. A continuación, se tomó un volumen de 30 µL de esta suspensión con una micropipeta y por último se depositó sobre un portamuestras de aluminio o "pin stub" dotadas con un disco adhesivo de carbono, donde la microgota se dejó evaporar a temperatura ambiente. Una vez que la rejilla se secó, se introdujo en el microscopio electrónico para su caracterización.

El estudio del tamaño de partícula y el análisis estadístico de las micrografías obtenidas, se llevaron a cabo empleando los softwares Image J y OriginPro 2018.

- Microscopía electrónica de transmisión (TEM):

Las imágenes obtenidas por TEM de las nanoestructuras desarrolladas y expuestas en esta tesis, fueron realizadas usando los microscopios electrónicos de transmisión modelos JEOL JEM-1011 (operado a 100 kV) y Carl-Zeiss Libra 200 FE (200 kV), este último se utilizó para obtener las imágenes de HRTEM y los patrones de difracción SAED.

Para la preparación de las muestras, se utilizó el mismo proceso de dilución de muestra descrito para SEM, tomándose 20 µL de esta suspensión preparada y depositando dicho volumen sobre una rejilla de cobre con película de carbono (Electron Microscopy Sciences CF400-Cu), donde la microgota se dejó evaporar bajo una lámpara de luz blanca.

Una vez obtenidas las micrografías de cada muestra, se utilizaron los softwares Image J y OriginPro 2018 para calcular el tamaño de partícula y realizar su correspondiente análisis estadístico.

- Microscopía de transmisión por barrido (STEM):

Las imágenes de STEM de las nanoestructuras desarrolladas y expuestas en esta tesis, fueron realizadas usando el microscopio electrónico de transmisión de alta resolución, modelo Carl-Zeiss Libra 200 FE (200 kV), con filtro de energía OMEGA y modo de operación HAADF.

Para la preparación de las muestras, se utilizó el mismo procedimiento de preparación descrito para la técnica TEM

- Dispersión de luz dinámica (DLS)

El estudio de la estabilidad coloidal (Dh, PDI y potencial zeta) de las nanoestructuras desarrolladas y expuestas en esta tesis, se realizó utilizando como sistema de DLS, un Zetasizer Nano ZS (Malvern) con longitud de onda 633 nm y atenuación automática.

Para llevar a cabo las medidas, la preparación de la muestra fue la misma: las nanoestructuras fueron diluidas en agua Milli-Q (con el fin de evitar interferencias dependientes de la ionicidad y del pH del medio) hasta una concentración final de aproximadamente 0.4 $mg \cdot mL^{-1}$.

Tanto el Dh como el potencial zeta de las muestras se obtuvieron como promedio de 5 mediciones sucesivas. Todas las medidas se realizaron a 25 ^{o}C.

- Difracción de rayos X (XRD)

Las medidas de XRD de las nanoestructuras mostradas en esta tesis, fueron obtenidas mediante dos equipos diferentes:

Para el método de XRD se utilizó un difractómetro Phillips con una unidad de control modelo PW1710 y fuente de radiación Cu Kα, λ= 1.54186 Å. Los difractogramas se midieron en el rango angular $10° < 2\theta < 80°$, con un ángulo de paso de 0.02° y un tiempo de paso de 5s.

Por otra parte, las medidas de XRD a bajo ángulo se llevaron a cabo con un difractómetro PANalytical X'Pert Powder Empyrean a 60 kV y 4 kW. Los difractogramas se obtuvieron a bajo ángulo, es decir, para 2θ entre 1° y 6°, con un ángulo de paso de 0.02° y un tiempo de paso de 5s. Esta técnica de caracterización se utilizó para analizar muestras de sílice mesoporosa.

Para efectuar las medidas, las muestras fueron secadas durante 24 h a una temperatura de 60 ºC y pulverizadas con la ayuda de un mortero para su posterior análisis.

- Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La estructura electrónica y composición de la superficie de las nanoestructuras magnéticas de Fe_5C_2@C descritas en esta tesis, fueron analizadas mediante un equipo Thermo Scientific K-Alpha XPS System.

Para estas medidas, se utilizó una fuente de radiación monocromática Al-Kα a 1486.6 eV. un cañón de electrones para la compensación de carga superficial electrónica (electrones en el rango de 0-14 eV) y un cañón de iones de Argon para el decapamiento atómico ("ion sputtering"). Los fotoelectrones se recogieron desde un ángulo de 90° con respecto a la superficie de la muestra y el analizador hemiesférico funcionó con una energía de paso constante de 20 y 100 eV. La energía de enlace fue referida al C1s, Fe2p, y O1s.

Las concentraciones atómicas se determinaron a partir de las áreas de los picos de XPS utilizando la técnica de sustracción de fondo de Shirley y los factores de sensibilidad de Scofield.

La muestra se preparó depositando 20 µL de una disolución de las nanoestructuras magnéticas sobre una rejilla silicon wafer, donde la se dejó evaporar a temperatura ambiente. Una vez que la muestra se secó, la rejilla se introdujo en la unidad XPS.

- Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Las medidas de las nanoestructuras analizadas por FTIR en esta tesis, se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Thermo Nicolet Nexus en modo transmisión en el rango espectral 4000-400 cm-1 y con un sistema de reflectancia total atenuada (ATR). Las muestras se prepararon siguiendo el mismo proceso de secado que las medidas de XRD.

- Espectroscopía de fluorescencia

Las medidas espectroscópicas de fluorescencia se realizaron con un espectrofluorímetro (modelo Cary Eclipse Varian), equipado con una lámpara de xenón de 15 W. Las medidas se realizaron empleando cubetas de cuarzo de 1 cm de lado y un volumen de muestra de 1 mL.

Todas las medidas de los fluoróforos estudiadas fueron adquiridas utilizando longitudes de onda de excitación características de los fluoróforos usados: 370 nm para polidopamina (PDA), 492 nm para la fluoresceína (FITC) y 560 nm para la rodamina (RITC). El slit utilizado para todos los casos fue de 5 nm para la excitación y la emisión.

- Microscopía confocal

Las imágenes confocales de las nanoestructuras magnéticas dopadas con fluoróforos (PDA, FITC y RITC) desarrolladas y expuestas en esta tesis, se realizaron mediante un microscopio confocal espectral Leica TCS SP8. Con una resolución de 1024 x 1024 píxeles, con barrido bidireccional X y objetivo HC PL APO CS 63x/1.40 OIL, usando las líneas de láseres de 405 nm, 488 nm y 552 nm para la visualización de PDA, FITC y RITC, respectivamente.

Para la preparación de las muestras fluorescentes, éstas se diluyeron en agua Milli-Q, a una concentración aproximadamente de 0.5 mg/mL, y se depositaron en un portamuestras de vidrio. Una vez el disolvente se evaporó, las muestras se introdujeron en el microscopio confocal para su análisis.

- Termogravimetría (TGA)

Para la determinación de la concentración de material inorgánico de las nanoestructuras magnéticas y materia orgánica presente en los nanomateriales descritos en esta tesis, se ha realizado mediante un equipo de TGA.

Para ello, se utilizó un equipo TGA Perkin Elmer TGA7, que opera en un rango de temperaturas entre temperatura ambiente y 850 ºC con un flujo constante de N2 de 20 mL/min, y una rampa de calentamiento de 10 ºC/min. Para estos ensayos se utilizaron crisoles de platino y α-alúmina como referencia. En cada medida, se depositaron 30 mg de la muestra a analizar sobre un crisol de platino, previamente lavado con ácido nítrico concentrado (para eliminar trazas metálicas o residuos de medidas anteriores).

- Espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS)

Las medidas de concentración de hierro de las disoluciones de las nanoestructuras magnéticas de tipo core@shell desarrolladas y expuestas en esta tesis, se determinaron mediante FAAS. El equipo utilizado fue un FAAS modelo ContrAA (Analytikjena) de fuente continua, con un sistema de inyección en flujo HS60 para la generación de hidruros (HGAAS) y vapor frío (CVAAS), trabajando con una potencia de 1550 W. Las muestras fueron digeridas en su totalidad con HF y HNO_3 aplicando energía de microondas.

- Magnetometría de muestra vibrante (VSM)

Parte de la caracterización magnética de las nanoestructuras magnéticas descritas en esta tesis, se llevó a cabo mediante el estudio de los ciclos de histéresis obtenidos por un magnetómetro VSM. Estos ciclos de histéresis de corriente continua (DC), fueron efectuados en un magnetómetro VSM modelo DMS-1660, a temperatura ambiente, bajo la aplicación de un campo magnético en el rango de -10 kOe a 10 kOe.

Para la realización de las medidas, las muestras en disolución son secadas en un horno a una temperatura de 60 ^{o}C durante 24 horas. Una vez disponemos de la muestra seca, estas son pesadas en una balanza con una precisión de ± 0.1 mg y típicamente se emplean cantidades de 2-3 mg de muestra desecada. Una vez pesadas, son introducidas en cápsulas plásticas que no poseen propiedades magnéticas que puedan afectar o distorsionar las medidas.

Los datos de magnetización se normalizaron con respecto a la cantidad en masa de magnetita o material magnético presente en cada muestra. Esta masa fue determinada por TGA o por FAAS (si la muestra presentaba más de un nanomaterial inorgánico). Las muestras se prepararon siguiendo el mismo proceso de secado que las medidas de XRD.

- Magnetometría SQUID

Parte de la caracterización magnética de las nanoestructuras magnéticas desarrolladas y descritas en esta tesis, se llevó a cabo mediante el estudio de los ciclos de histéresis y las curvas de susceptibilidad frente a temperatura para muestras enfriadas sin campo aplicado y con campo aplicado, denominadas curvas ZFC/FC FC (siglas en inglés “zero field cooled/field cooled”), obtenidos por un magnetómetro SQUID.

Para ello, se utilizó un equipo Quantum Design, modelo MPMS-5. El ciclo de histéresis de las nanopartículas magnéticas de Mn3O4 se midió desde -50 kOe a 50 kOe a temperatura ambiente.

Para las curvas de susceptibilidad magnética ZFC/FC se midieron en un rango de temperatura entre 10 K hasta 350 K, bajo un campo aplicado de 100 Oe (FC). Para la realización de las medidas, se siguió el mismo procedimiento de preparación de muestra descrito en la magnetometría VSM.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Anexo II: Caracterización fisicoquímica adicional

I Síntesis de núcleos magnéticos

a Nanoesferas de Fe_3O_4

La presencia de los grupos funcionales que estabilizan a cada NP fue confirmada mediante medidas de FTIR. En la figura 1 se muestran los espectros FTIR de las MNPs sintetizadas por descomposición térmica funcionalizadas con OA (espectro a) y por co-precipitación funcionalizadas con PAA (espectro b), ALA (espectro c) y con citrato (espectro d).

En los espectros que corresponden con las NPs hidrofílicas (b, c y d) se observa una banda ancha situada entre 3363-3392 cm^{-1} que se corresponde con las vibraciones de tensión de los enlaces O-H. Por otra parte, la banda localizada entre 548-560 cm^{-1}, asociada a las vibraciones de tensión de los grupos tetraédricos (Fe^{3+}–O^{2-}) del enlace Fe-O[1], se observa en todos los espectros de FTIR lo que corrobora la presencia de las nanoesferas de magnetita.

En el espectro correspondiente a las nanoesferas de magnetita sintetizadas por el método de descomposición térmica, la presencia del ácido graso monoinsaturado (OA) que recubre a estas MNPs se justifica por las bandas situadas en 2914, 2843, 1516 y 1403 cm^{-1}, que pertenecen a las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica de los grupos metilenos ($-CH_2$), pertenecientes a la cadena hidrocarbonada del OA, y a las vibraciones de tensión asimétricas y simétricas de los grupos carboxilos (COO^-), respectivamente[2,3].

Por su parte el espectro b, muestra las bandas características de la cadena hidrocarbonada del polímero PAA, observadas a 2923 y 2847 cm^{-1}, atribuidas a las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica de los enlaces $-CH_2$. Adicionalmente, se observan las bandas situadas en 1710, 1631, 1549 y 1398 cm^{-1}, asignadas a las vibraciones de tensión de los grupos carbonilos (C=O y C-C), y carboxilos (COO^-, asimétrico y simétrico), respectivamente[4].

En el caso de las MNPs funcionalizadas con ALA, las bandas situadas en 3205 y 1492 cm^{-1}, son atribuibles a las vibraciones de tensión y de flexión de los enlaces -NH del ácido graso, respectivamente. Adicionalmente, las bandas situadas a 2910, 2852, 1723, 1572 y 1365 cm^{-1}, corresponden a los modos vibracionales de tensión (asimétricos y simétricos de los grupos metilenos pertenecientes a la cadena hidrocarbonada del surfactante; a los enlaces C=O y los modos asimétricos y simétricos de los grupos carbonilos, respectivamente)[5,6], corroborando de esta forma la presencia del ALA enlazado a las MNPs.

Por último, en el espectro d, son visibles las bandas características en 2915, 2842, 1590 cm^{-1} y 1361 cm^{-1} atribuidas a las vibraciones de tensión asimétricas y simétricas (de las terminaciones de los grupos metileno y de los carboxilos, respectivamente), indicando la correcta funcionalización de las MNPs con citrato[7].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

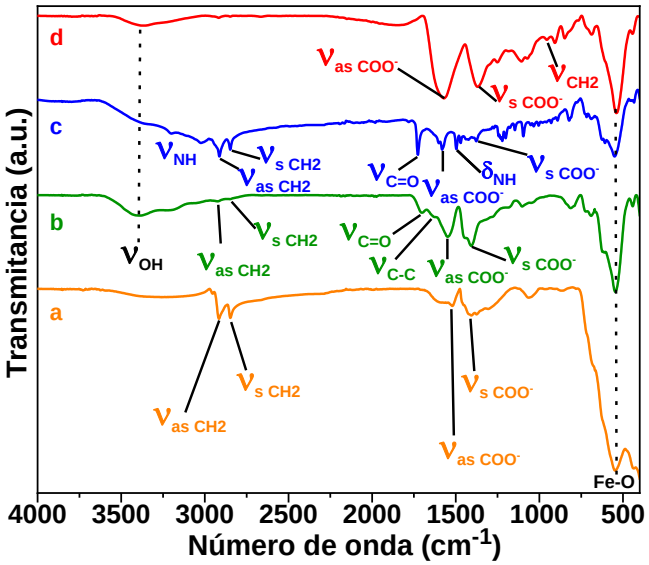


Figura 1: Espectros FTIR de las nanoesferas de magnetita funcionalizadas con OA (a), con PAA (b), con ALA (c) y con citrato (d).

Otras de las técnicas utilizadas para verificar si la estrategia de funcionalización de las MNPs tuvo éxito, se basa en la determinación del potencial zeta de la NP, que está asociado a la presencia de cargas en la superficie de éstas[8]. De este modo, si las nanoesferas presentan cargas negativas en una disolución coloidal a Ph neutro, este será debido a la presencia de grupos carboxilos en la superficie de las MNPs. Por otro lado, si las nanoesferas presentan cargas positivas, es indicativo de la presencia de grupos aminos en su superficie.

En la tabla 1 se muestran los valores promedio de las distribuciones estadísticas de potencial zeta de las MNPs obtenidas tanto por los métodos de co-precipitación como por descomposición térmica estables en medio acuoso. Como se puede observar en la tabla, las distribuciones de potencial zeta de todas las MNPs presentan valores positivos mayores de 30 mV y valores negativos menores que -30 mV. Estos valores de potencial zeta están asociados a NPs que presentan una buena estabilidad coloidal[8]. Los valores negativos indican que los grupos funcionales expuestos en la superficie de las MNPs son grupos carboxílicos, aportados por el recubrimiento de los agentes surfactantes citrato o PAA. En cambio, el valor positivo del potencial zeta encontrado en las nanoesferas de magnetita funcionalizadas con ALA, corrobora el correcto recubrimiento de la NP con este agente surfactante.

Tabla 1: Valores promedio del potencial zeta de las MNPs estables en medio acuoso.

NP	Potencial zeta (mV)
Fe_3O_4@$PAA_{DT\text{-}7\ nm}$	-38 ± 5
Fe_3O_4@$PAA_{DT\text{-}15\ nm}$	-42 ± 7
Fe_3O_4@$PAA_{COP\text{-}10\ nm}$	-39 ± 6
Fe_3O_4@$Citrato_{COP\text{-}10\ nm}$	-47 ± 5
Fe_3O_4@$ALA_{COP\text{-}10\ nm}$	32 ± 6

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

b Nanocubos de Fe_3O_4

En la figura 2, se muestran las micrografías TEM de las MNPs cúbicas sintetizadas mediante cristalización del precipitado $Fe(OH)_2$. Como se puede observar, el tamaño de

partícula decrece a medida que disminuye la concentración en exceso de KOH presente en la reacción hasta los 4 Mm sin que se vea alterada la morfología. Sin embargo, cuando la concentración de KOH en exceso es nula, las NPs obtenidas poseen una morfología regularmente esférica, con un aumento significativo de su tamaño.

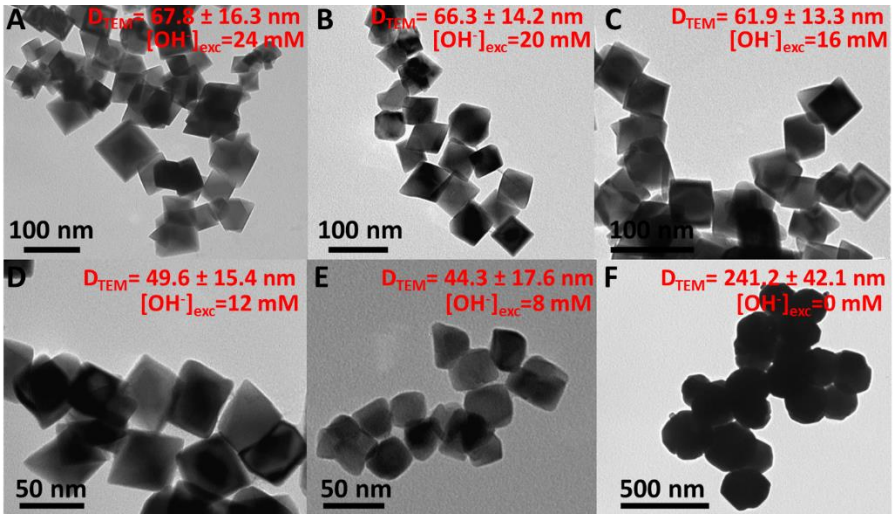


Figura 2: Micrografías TEM de los nanocubos de magnetita obtenidos por cristalización del precipitado $Fe(OH)_2$.

En la figura 3 se muestran los espectros FTIR de las MNPs sintetizadas por descomposición térmica funcionalizadas con OA (espectro a) y funcionalizadas con PAA (espectro b) mediante el método de transferencia de fase. Por último se muestran el espectro de las MNPs obtenidas por el método de cristalización del precipitado $Fe(OH)_2$ (espectro c).

En los espectros correspondientes a los nanocubos estables en medio acuoso (b y c), se observa una banda ancha situada entre 3370-3400 cm^{-1} que se corresponde con las vibraciones de tensión de los enlaces O-H. Por otra parte, todos los espectros presentan una banda localizada entre 540-550 cm^{-1}, asociada a las vibraciones de tensión de los grupos tetraédricos (Fe^{3+}–O^{2-}) del enlace Fe-O[1], corroborando la presencia de los nanocubos de magnetita.

En el espectro correspondiente a las nanocubos de magnetita funcionalizados con OA (espectro a), se observan las bandas situadas a 2916, 2847, 1512 y 1411 cm^{-1}, relacionadas a las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica de los grupos metilenos ($-CH_2$), pertenecientes a la cadena hidrocarbonada del OA, y a las vibraciones de tensión asimétricas y simétricas de los grupos carboxilos (COO^-), respectivamente[2,3].

Por su parte, el espectro b muestra las bandas características de la cadena hidrocarbonada del polímero PAA, observadas a 2919 y 2852 cm^{-1}, atribuidas a las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica de los enlaces $-CH_2$. Adicionalmente, se observan las bandas situadas en 1738, 1644, 1552 y 1405 cm^{-1}, asignadas a las vibraciones de tensión de los grupos carbonilos (C=O y C-C), y carboxilos (COO^-, asimétrico y simétrico), respectivamente[4].

Por último, en el espectro FTIR de los nanocubos sintetizados por cristalización del precipitado $Fe(OH)_2$ se aprecia únicamente la banda asociada a las vibraciones de flexión de los grupos hidroxilos, situada a 1629 cm^{-1}, esto se debe a que dichas NPs no presentan ningún tipo de recubrimiento en su superficie[9].

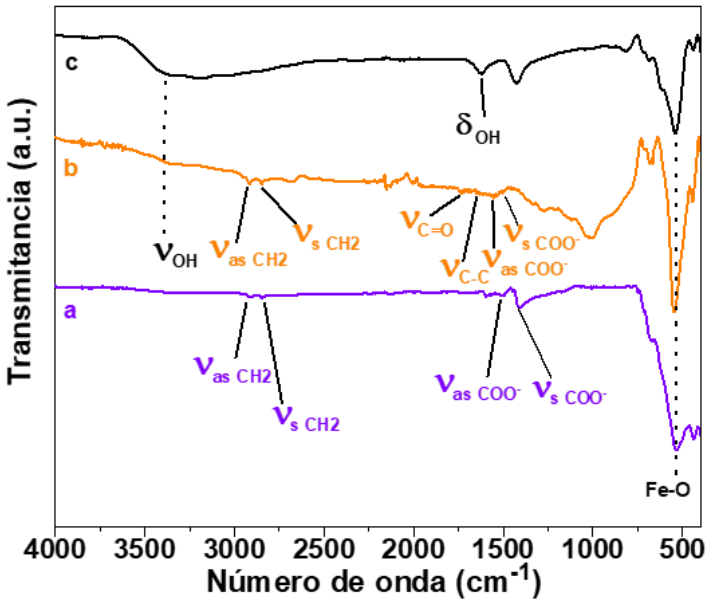


Figura 3: Espectros FTIR de los nanocubos de magnetita funcionalizados con OA (a) y con PAA (b) y sin funcionalizar (c).

Los valores promedio de las distribuciones de estadísticas de potencial zeta de los nanocubos sintetizados, se muestran en la tabla 2. Tal y como se puede ver en la tabla, todas las distribuciones de potencial zeta presentan valores negativos. Dichos valores negativos indican la presencia de grupos funcionales con carga negativa en la superficie de los nanocubos, procedentes de grupos carboxílicos aportados mediante la funcionalización con PAA o por grupos hidroxilos procedentes de la superficie de los nanocubos sin ningún tipo de recubrimiento.

Tabla 2: Valores promedio del potencial zeta de los nanocubos estables en medio acuoso.

NP	Potencial zeta (mV)
Fe_3O_4@$PAA_{DT\text{-}12\ nm}$	-36 ± 8
Fe_3O_4@$PAA_{DT\text{-}30\ nm}$	-37 ± 8
$Fe_3O_{4CP\text{-}43\ nm}$	-38 ± 10

c Nanoesferas huecas de Fe_3O_4

El difractograma de rayos X de las nanoestructuras core@shell (Fe@Fe_3O_4), utilizadas como precursoras de las nanoesferas huecas de 13 nm, se muestra en la figura 4. Las posiciones de los picos corresponden con las determinadas teóricamente para las estructuras de espinela inversa de la magnetita con una estructura de espinela inversa (JCPDS 19-0629)[10] y otra cúbica correspondiente a los planos de hierro puro (JCPDS card No 65-4899)[11]. Estos resultados corroboran que estas nanoestructuras magnéticas de tipo core@shell están compuestas por una mezcla de dos estructuras cristalinas.

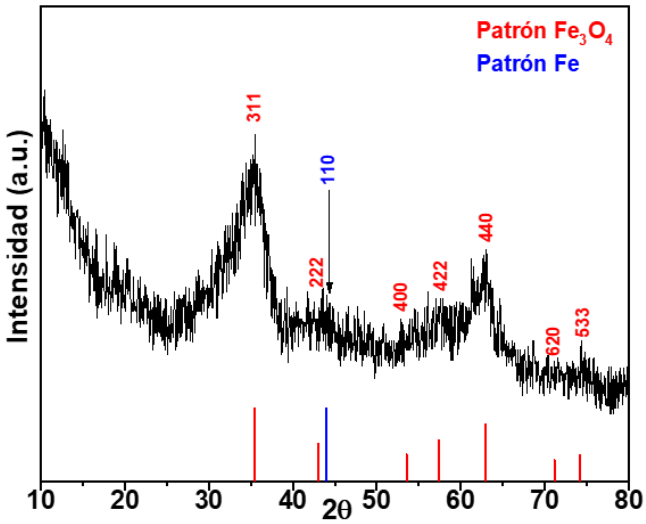


Figura 4: Difractograma de rayos X de las nanoestructuras de Fe@Fe_3O_4, comparado con las reflexiones principales de dichas estructuras determinadas teóricamente

En la figura 5 se muestran las micrografías y las distribuciones de tamaño de las nanoestructuras magnéticas de tipo Fe@Fe_3O_4. Tanto en las micrografías de TEM como de STEM se observa una morfología esférica, tanto del núcleo, como de la nanoestructura formada, con un diámetro aproximado de 12 nm y un alto grado de monodispersidad. A mayores, se observa un mayor contraste de imagen en el núcleo de estas nanoestructuras, lo cual indica la existencia de Fe metálico en su interior, ya que los metales puros presentan mayor contraste-Z que los óxidos metálicos[12]. Este efecto fue corroborado por la imagen STEM, en el que el núcleo se observa más claro que la cubierta.

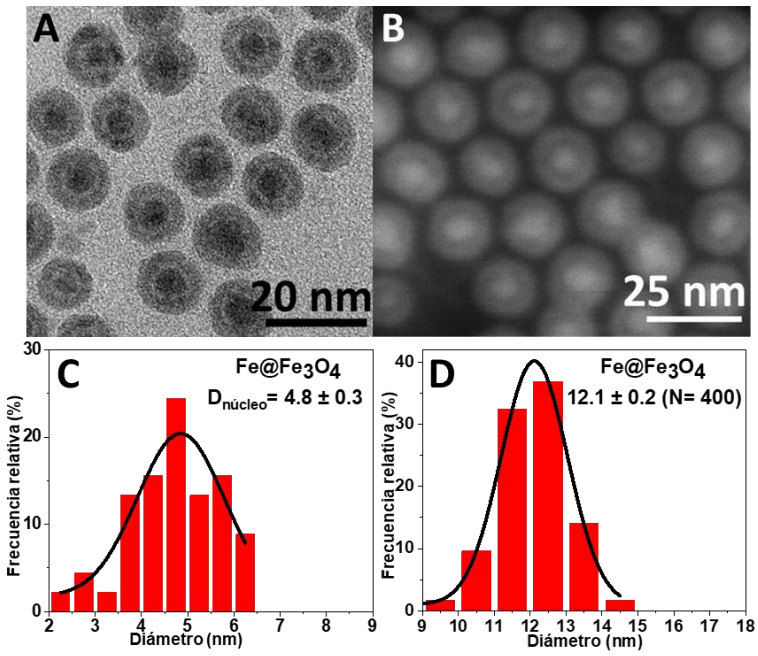


Figura 5: Micrografías TEM (A), STEM (B) e histogramas de la distribución estadística de tamaño (C) y diámetro de su núcleo de Fe (D) de las nanoestructuras de Fe@Fe_3O_4.

En la figura 6 se muestra el ciclo de histéresis frente al campo aplicado a 300 K de las nanoestructuras magnéticas de tipo core@shell. Estas MNPs presentan un comportamiento SPM, como se puede demostrar por los valores de coercitividad de la tabla 3.

Además, estas nanoestructuras magnéticas presentan valores de magnetización de saturación bajo. Esto se debe a que, como se puede observar en los patrones de XRD, la capa superficial de magnetita formada no tiene una cristalinidad tan buena.

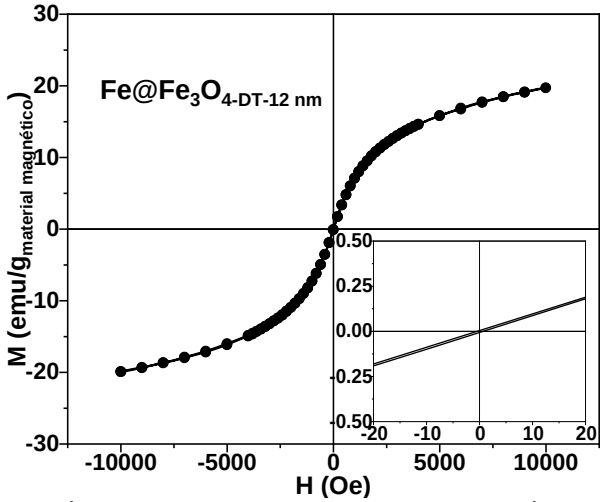


Figura 6: Ciclos de histéresis a 300 K de las nanoestructuras magnéticas de $Fe@Fe_3O_4$.

Tabla 3 Parámetro magnéticos de las nanoestructuras $Fe@Fe_3O_4$.

NP	M_S (emu/$g_{mat.magn.}$)	M_R (emu/$g_{mat.magn.}$)	H_C (Oe)
$Fe@Fe_3O_4$	19.90	0.01	0.60

Adicionalmente, tanto la funcionalización de la superficie de las nanoesferas huecas mediante el agente surfactante OLA y el polímero PAA como el no recubrimiento de las nanoesferas huecas grandes se evidenció por los espectros de FTIR (figura 7). En todos los espectros, se puede ver la observan la banda de absorción característica de las vibraciones de tensión de los grupos Fe-O[1], que indica la presencia de magnetita situada en el rango de 540-570 cm^{-1}.

En el espectro correspondiente a las nanoesferas huecas funcionalizadas con OLA (espectro a), se observan las bandas situadas entre 2913-2917 cm^{-1} que están relacionadas con las vibraciones de tensión simétricas y antisimétricas de los enlaces $-CH_2$ del surfactante. A mayores, se observa la banda típica de las vibraciones de flexión de los grupos aminos, situada a 1535 cm^{-1} [13].

Por otra parte, el espectro b muestra las bandas características de la cadena hidrocarbonada del polímero PAA, observadas a 2900 y 2872 cm^{-1}, atribuidas a las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica de los enlaces $-CH_2$. Adicionalmente, se observan las bandas situadas en 1749, 1668, 1552 y 1385 cm^{-1}, asignadas a las vibraciones de tensión de los grupos carbonilos (C=O y C-C), y carboxilos (COO^-, asimétrico y simétrico), respectivamente[4].

Por último, en el espectro FTIR de la nanoesfera hueca sintetizada por el método solvotermal, se aprecia únicamente la banda asociada a las vibraciones de flexión de los grupos hidroxilos, situada a 1632 cm^{-1}, esto se debe a que dichas NPs no presentan ningún tipo de recubrimiento en su superficie[9].

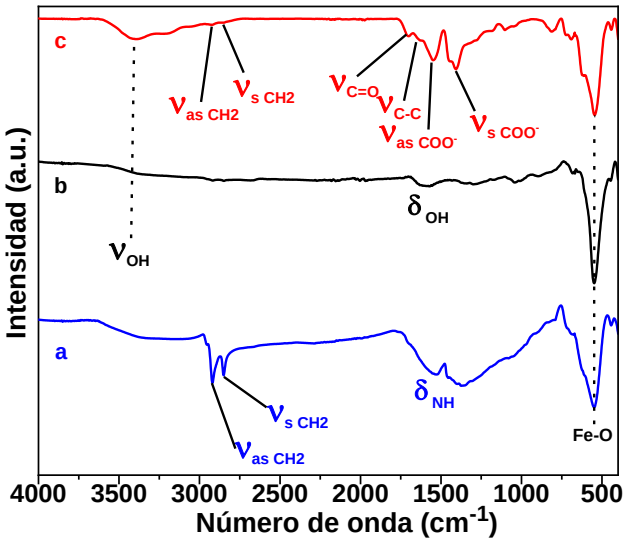


Figura 7: Espectros FTIR de las nanoesferas huecas funcionalizadas con OLA (a), con PAA (c) y sin funcionalización (b).

En la tabla 4, se muestran los valores promedio de las distribuciones de estadísticas de potencial zeta de las nanoesferas huecas estables en medio acuoso. Como se puede ver en la tabla, todas las distribuciones de potencial zeta presentan valores negativos. Dichos valores negativos indican la presencia de grupos funcionales con carga negativa en la superficie de las MNPs, procedentes de grupos carboxílicos aportados mediante la funcionalización con PAA o por grupos hidroxilos procedentes de la superficie de los nanocubos sin ningún tipo de recubrimiento.

Tabla 4: Valores promedio del potencial zeta de las nanoesferas huecas estables en medio acuoso.

NP	Potencial zeta (mV)
$Fe_3O_4@PAA_{DT\text{-}13\ nm}$	-39 ± 6
$Fe_3O_{4\text{-}S\text{-}81\ nm}$	-27 ± 9
$Fe_3O_{4\text{-}S\text{-}130\ nm}$	-15 ± 4
$Fe_3O_{4\text{-}S\text{-}551nm}$	-24 ± 6

d Nanoesferas de Fe_5C_2

En la figura 8 se muestran los espectros FTIR de las nanoestructuras magnéticas de carburo de hierro funcionalizadas con OA (espectro a) y con PAA (espectro b) mediante el método de transferencia de fase.

En el espectro correspondiente a las MNPs funcionalizadas con OA (espectro a), se observan las bandas situadas a 2919, 2843, 1521 y 1421 cm^{-1}, relacionadas a las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica de los grupos metilenos ($-CH_2$), pertenecientes a la cadena hidrocarbonada del OA, y a las vibraciones de tensión asimétricas y simétricas de los grupos carboxilos (COO^-), respectivamente[2,3].

Por su parte, el espectro b muestra las bandas características de la cadena hidrocarbonada del polímero PAA, observadas a 2919 y 2833 cm^{-1}, atribuidas a las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica de los enlaces -CH_2. Adicionalmente, se observan las bandas situadas en 1752, 1554 y 1502 cm^{-1}, asignadas a las vibraciones de tensión de los grupos carbonilos (C=O), y carboxilos (COO^-, asimétrico y simétrico), respectivamente[4].

Por último, en ambos espectros de FTIR se observan la banda de absorción característica de las vibraciones de tensión de los grupos Fe-O, que indica la presencia de magnetita situada en el rango de 535-553 cm^{-1}. Esta banda corrobora la presencia de magnetita en estas MNPs[1].

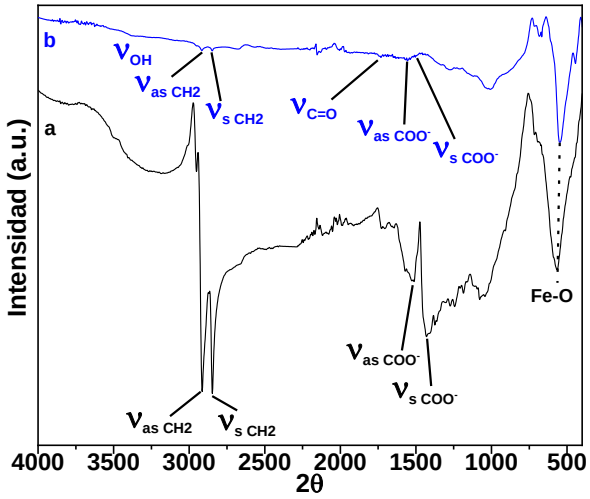


Figura 8: Espectros FTIR de las nanoesferas de carburo de hierro funcionalizadas con OA (a) y con PAA (b).

En la tabla 5, se muestra el valor promedio de las distribuciones de estadísticas de potencial zeta. Como se puede ver en la tabla, el valor de potencial zeta que presentan estas nanoestructuras es negativo, lo que indica la presencia de grupos carboxílicos aportados mediante la funcionalización con PAA. El potencial zeta, al dar un valor menor de -30 mV, también confirma la buena estabilidad que presentan estas MNPs en medio acuoso.

Tabla 4: Valores promedio del potencial zeta de las nanoesferas de carburo de hierro estables en medio acuoso.

NP	Potencial zeta (mV)
Fe_5C_2@$PAA_{DT\text{-}19\ nm}$	-48 ± 5

e Nanoesferas de Mn_3O_4

En la figura 9 se muestra el espectro FTIR de las nanoesferas de Mn_3O_4 funcionalizadas con PAA mediante el método de transferencia de fase.

Como se puede observar, el espectro muestra las bandas características de la cadena hidrocarbonada del polímero PAA, observadas a 2919 y 2848 cm^{-1}, atribuidas a las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica de los enlaces -CH_2. Adicionalmente, se observan las bandas situadas en 1733, 1625, 1459 y 1379 cm^{-1}, asignadas a las vibraciones de tensión de los grupos carbonilos (C=O y C-C), y carboxilos (COO^-, asimétrico y simétrico), respectivamente[4]. Confirmando de este modo, la correcta funcionalización de estas MNPs con el polímero. A mayores, la presencia de la hausmanita se confirma mediante las bandas de absorción

características de las vibraciones de tensión de simetría tetraédrica y octaédrica de los grupos Mn-O[14], situadas en 614 y 510 cm^{-1}, respectivamente.

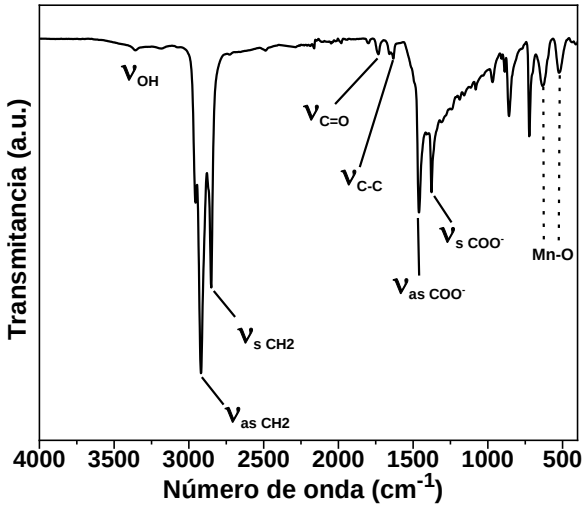


Figura 9: Espectro FTIR de las nanoesferas de hausmanita funcionalizadas con PAA.

Por último, en la tabla 5, se muestra el valor promedio de las distribuciones de estadísticas de potencial zeta. Como se puede ver en la tabla, el valor de potencial zeta que presentan estas MNPs es negativo, lo que indica la presencia de grupos carboxílicos aportados mediante la funcionalización con PAA.

Tabla 5: Valor promedio del potencial zeta de las nanoesferas de hausmanita estables en medio acuoso.

NP	Potencial zeta (mV)
Mn_3O_4@$PAA_{S\text{-}8\ nm}$	-43 ± 9

II Funcionalización con fluoróforos

En esta sección se abordarán los procedimientos sintéticos y caracterizaciones fisicoquímicas llevadas a cabo para este tipo de nanomateriales magnéticos fluorescentes, con morfologías y estructuras diversas, encontrándose desde MNPs compuestas por magnetita funcionalizada con polidopamina (Fe_3O_4@PDA), ya que este polímero, por sí solo, presenta propiedades fluorescentes. Hasta otro tipo de nanoestructuras magnéticas de tipo core@shell, compuestas por Fe_3O_4@SiO_2, funcionalizadas con moléculas fluorescentes (DYE) como son la fluoresceína (FITC) y la rodamina (RITC) o las nanoestructuras de sílice mesoporosa magnéticas, funcionalizadas con Fe_3O_4@PDA o con Fe_3O_4@SiO_2-RITC-SiO_2.

a Síntesis

La obtención de las MNPs fluorescentes compuestas por un núcleo superparamagnético y recubiertas con el biopolímero PDA, se obtuvieron utilizando la misma ruta sintética por co-precipitación descrito en el apartado 2.1.1, con la única modificación de éste en la adición de 1.11 mmoles de clorhidrato de polidopamina pasado 30 segundos de la adición de NH_4OH.

Por otra parte, el procedimiento sintético seguido para la obtención de las nanoestructuras magnéticas de tipo core@shell fluorescentes se basó en el método de la microemulsión, descrito en el apartado 2.2 de esta Tesis, con varias modificaciones: 1) la conjugación covalente de la molécula fluorescente (FITC o RITC) a una matriz de aminosilicato (APTS), mediante la formación de un enlace tiorurea y 2) el recubrimiento de sílice con la molécula fluorescente funcionalizada con APTS sobre las nanopartículas magnéticas mediante un método de cuatro etapas.

Para llevar a cabo la conjugación de la molécula fluorescente con APTS, en todo momento la síntesis transcurre recubierta con papel de aluminio, para evitar la degradación de la molécula fluorescente por exceso de luz. Para ello, 20 mg de DYE (FITC o RITC) se disuelven en 35 mL de etanol desoxigenado bajo agitación magnética (200 rpm) y a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, se adicionan 150 µl de APTS a la mezcla y se deja reaccionar durante 16 h para facilitar el total acoplamiento de la molécula fluorescente al APTS. Transcurrido este tiempo, la mezcla se lleva a un volumen final de aproximadamente 1 mL con la ayuda de un rotavapor.

Finalmente, el conjugado fluorescente formado "DYE-APTS" se almacena a baja temperatura (4 ºC) y protegida de la luz para su conservación, hasta su posterior uso.

Una vez obtenido el conjugado fluorescente, se procedió a sintetizar las nanoestructuras magnéticas core@shell fluorescentes. Para ello y en todo momento, la síntesis se lleva a cabo bajo agitación orbital (200 rpm) y temperatura ambiente. A continuación, 1.6 g de Igepal CO-520 se adicionan a 18.7 mL de CHX y se agitan durante 15 min con la finalidad de homogeneizar la mezcla. A continuación, se adicionan 204 µl de una disolución de MNPs de Fe_3O_4@OA (10 mg resuspendidas en ciclohexano), preparadas previamente y cuya síntesis está descrita en el apartado 2.1.1. Tras 30 min de homogeneización, se adicionan 210 µl de NH_4OH seguido de TEOS en tres etapas. En primer lugar, se adicionan 120 µl de TEOS y se deja reaccionar bajo agitación orbital durante 2 h. Una vez transcurrido este tiempo, 30 µl del conjugado DYE-APTS se adiciona sobre las nanopartículas y se deja reaccionar durante 1 h. Posteriormente, 60 µl de TEOS se adiciona a la mezcla, permitiendo su hidrólisis durante otra hora. Finalmente, otros 60 µl de TEOS son añadidos a la mezcla y se deja reaccionar durante 16 h para favorecer la total hidrólisis del TEOS y así formar la recubierta de sílice con el fluoróforo protegido entre las capas de SiO_2 formadas.

Terminada la reacción, se adiciona alcohol IPA para precipitar las nanoestructuras obtenidas, la mezcla continuó en agitación durante 15 minutos y transcurrido este tiempo, las nanoestructuras magnéticas fluorescentes se separaron del sobrenadante con ayuda de un imán de neodimio. Se realizaron cuatro lavados subsecuentes con etanol, agitando vigorosamente la muestra a temperatura ambiente y separándolas de la misma forma, posteriormente se llevaron a cabo cinco lavados con agua Milli-Q, dos bajo agitación mecánica, y tres en un baño de ultrasonidos de 20 min. Finalmente, las nanoestructuras se redispersan en agua Milli-Q.

Por último, el tercer nanomaterial magnético fluorescente obtenido fueron las NPs de sílice mesoporosa, sintetizadas mediante el método de co-condensación, descrito por Wada[16] y funcionalizadas con PDA o con MNPs fluorescentes.

Para ello, en una botella de vidrio de 500 mL se mezclan 1 g de CTAB con 480 mL de agua Milli-Q y se agita magnéticamente (700 rpm) hasta obtener una disolución homogénea. A continuación, se adicionan 0.98 mL de una disolución de NaOH (6 mM) a la mezcla y se calienta a 70 ºC durante 2 h. Transcurrido este tiempo, 4.83 mL de TEOS se adicionan gota a gota a la reacción, con la ayuda de una bomba de infusión a un flujo constante de 1 mL/min. Terminada la adición del TEOS, el sistema se mantiene a 70 ºC durante otras 2 h.

Finalmente, las NPs de sílice mesoporosa obtenidas se filtran con la ayuda de un sistema de vacío, lavándolas con agua Milli-Q y etanol (proporción 50:50), este proceso de lavado se realiza hasta seis veces. Una vez lavadas las nanoestructuras, estas se introducen en un horno de mufla a una temperatura de 550 °C durante 8 h, con una rampa de calentamiento de 1 ºC/min con el fin de eliminar el surfactante del interior de los poros de la cerámica mesoporosa.

Dependiendo del marcador fluorescente (PDA o RITC) incorporado a las NPs de sílice mesoporosa, estas se obtienen por rutas sintéticas diferentes:

-mesop.Si@PDA o mesop.Si@Fe_3O_4@PDA: la funcionalización de las cerámicas mesoporosas funcionalizadas con PDA o con Fe_3O_4@PDA se llevaron a cabo mediante un proceso de absorción descrito por Seco[17].

Para ello, 10 mg de una dispersión de mesop.Si en 5 mL de agua Milli-Q se mezclan con 1.7 mL de una disolución básica que contiene clorhidrato de dopamina (20 mg) o MNPs de Fe_3O4@PDA (15 mg). La mezcla se incuba bajo agitación orbital (200 rpm) a 70 ºC durante 16 h.

Tras finalizar la reacción, las cerámicas mesoporosas fluorescentes se separaron de la reacción con la ayuda de centrifugación (30 min a 9000 rpm). Mientras que las cerámicas magnéticas fluorescentes, se separaron del sobrenadante con ayuda de un imán de neodimio. En ambos casos, se realizaron seis lavados subsecuentes con agua Milli-Q, tres bajo agitación mecánica, y tres en un baño de ultrasonidos de 20 min. Finalmente, ambas cerámicas mesoporosas fluorescentes se redispersaron en agua Milli-Q.

-mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2-RITC]: la funcionalización de estas cerámicas magnéticas fluorescentes, se llevó a cabo mediante la síntesis “in situ” de la magnetita (obtenida por el método de microemulsión) con la mesop.Si, obteniéndose un anclaje covalente entre ambos nanomateriales.

Para ello, bajo agitación mecánica (200 rpm) y temperatura ambiente en toda la duración de la reacción, 15 g de Igepal CO-520 se adicionan a 180 mL de CHX y se deja agitando durante 15 min con la finalidad de homogeneizar la mezcla. A continuación, se adicionan 20 mL de una disolución de nanopartículas de Fe_3O_4@OA (al 0.5 % en peso en ciclohexano), preparadas previamente y cuya síntesis está descrita en el apartado 2.1.1. Tras 30 min de homogeneización, se adicionan 2.1 mL de NH_4OH seguido de 1 g de la mesop.Si y se deja mezclando durante 20 min. Transcurrido este tiempo, se adicionan 2.4 mL de TEOS y se deja reaccionar durante 16 h para permitir la total hidrolización del TEOS.

Terminada la reacción, se adiciona alcohol IPA para precipitar el nanomaterial, el proceso de lavado de estas cerámicas mesoporosas magnéticas es similar al descrito en la obtención de las cerámicas mesop.Si@Fe_3O_4@PDA.

Para funcionalizar las NPs de sílice mesoporosa magnéticas con la molécula fluorescente, 30 µl del conjugado RITC-APTS se adicionan a 20 mL de etanol y se mezcla mediante agitación magnética (200 rpm) durante 30 min a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación, se adicionan 15 mL en etanol de una dispersión que contiene 100 mg de la nanoestructura mesoporosa magnética de mesop.Si@Fe_3O_4@SiO_2 sobre la mezcla fluorescente y se mantiene bajo las mismas condiciones de síntesis durante 16 h.

Una vez completada la reacción, el nanomaterial fluorescente se separa magnéticamente y se lava en primer lugar con una mezcla de IPA/acetona (proporción 50:50) tres veces y finalmente con agua Milli-Q (otras tres veces) mediante sonicación y separación magnética. La muestra se secó a 60 ºC durante 5 h.

b Caracterización fisicoquímica

Primeramente, las nanoestructuras fluorescentes obtenidas, se caracterizaron mediante difracción de rayos X (figuras 10 y 11) con el fin de estudiar la estructura cristalina de todas ellas. Todos los patrones de difracción muestran unos picos cuyas posiciones indican que la fase cristalina predominante en el sistema sintetizado es la fase de magnetita, con una estructura de espinela inversa (JCPDS 19-0629)[10]. Adicionalmente, en los espectros correspondientes a las nanoestructuras core@shell, se observa una banda ancha en el rango de 15-30º, característica de la naturaleza amorfa de las estructuras de SiO_2[18].

Por otro lado, los espectros de difracción de las cerámicas magnéticas mesoporosas con actividad fluorescente se muestran en la figura 11, corroborando que la fase cristalina de estos nanomateriales corresponde con la fase cristalina de la magnetita[10]. Adicionalmente, en este espectro se observa una banda ancha alrededor de 22º, relacionada con la estructura de sílice desordenada que recubre a la matriz de sílice mesoporosa[19].

Asimismo, para demostrar el ordenamiento de los poros de las cerámicas magnéticas mesoporosas obtenidas, se caracterizaron mediante difracción de rayos X a bajo ángulo (Fig. 11, B) en donde se observan los cuatro picos típicos de los materiales mesoestructurados con ordenación hexagonal (P6mm)[19,20], cuyo tamaño de poro para ambas nanoestructuras es de 3.34 nm, este valor fue obtenido mediante la ecuación del parámetro de red de una estructura hexagonal:

$$a_0 = 2d_{100}/\sqrt{3}$$

Donde a_0 es el parámetro de red, correlacionado con el diámetro de los poros en estos nanomateriales mesoporosos[21] y *d*, la distancia interplanar del plano cristalino (100, 2.89 nm).

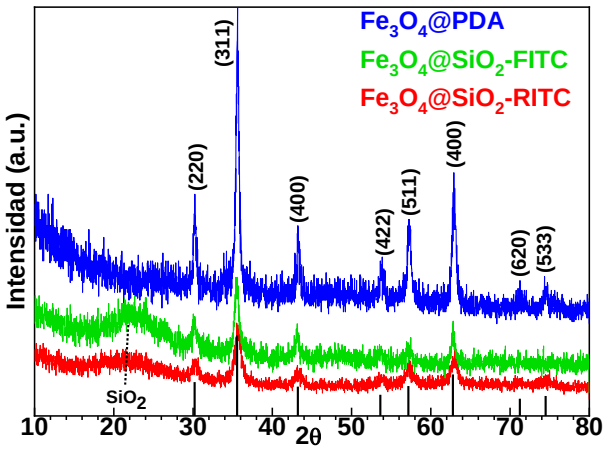


Figura 10: Difractogramas de rayos X de las nanoestructuras magnéticas fluorescentes funcionalizadas con: polidopamina (azul), con fluoresceína (verde) y con rodamina (rojo) comparado con las reflexiones principales de la magnetita determinadas teóricamente.

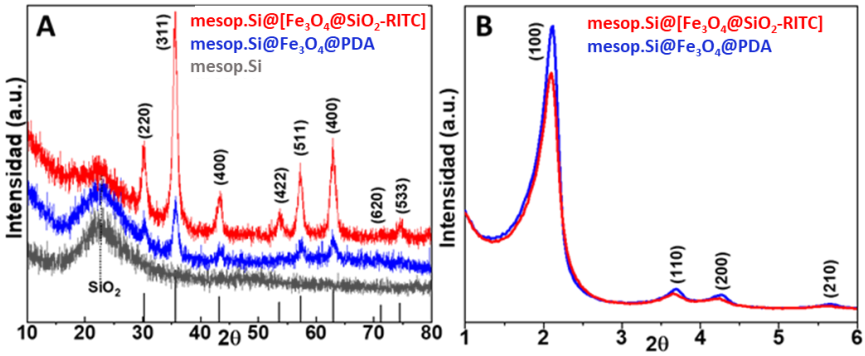


Figura 11: Difractogramas de rayos X de las cerámicas no magnéticas (gris) y magnéticas funcionalizadas con: polidopamina (azul) y con rodamina (rojo) comparado con las reflexiones principales de la magnetita determinadas teóricamente (A) y diagramas XRD a ángulo bajo de las cerámicas mesoporosas magnéticas fluorescentes (B).

En la figura 12 se muestran los espectros FTIR de las nanoestructuras magnéticas fluorescentes compuestas por un núcleo de magnetita, tanto recubiertas con sílice (espectro verde, en el caso de estar funcionalizadas con FITC, y rojo, para las funcionalizadas con RITC) como las funcionalizadas con polidopamina (espectro azul).

En los espectros correspondientes a las nanoestructuras magnéticas de tipo core@shell fluorescentes, se observan las bandas situadas en 3640 cm^{-1} y en 1634 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de tensión y flexión de los grupos -NH, respectivamente, procedentes de la funcionalización con el aminosilano APTS[22], seguida de una banda ancha situada alrededor de 3400 cm^{-1} que se corresponde con las vibraciones de tensión de los enlaces O-H, atribuidas a los grupos silanoles pertenecientes a la capa de sílice que contienen las nanoestructuras magnéticas recubiertas con sílice.

Por otro lado, las bandas de gran intensidad de SiO_2 fueron observadas en ambos espectros en aproximadamente 1064 cm^{-1}, 808 cm^{-1} y 470 cm^{-1}, asociadas a las vibraciones de tensión asimétrico, simétrico y de flexión de los grupos Si-O-Si[17], respectivamente. Además, en ambos espectros se observa el enlace Fe-O, situada alrededor de 566 cm^{-1}, atribuida a las vibraciones de tensión de los grupos tetraédricos (Fe^{3+}–O^{2-}) del enlace Fe-O[1], lo que confirma la existencia de las NPs de magnetita.

Por otra parte, en el espectro correspondiente a las nanoesferas de Fe_3O_4@PDA se puede ver la banda de absorción observada a 3378 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones de tensión de los grupos -OH, atribuidas a las moléculas de agua adsorbidas por las MNPs y a los grupos -NH, asociados a los grupos amida del polímero[23], seguidas de las dos bandas asociadas a las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica de los enlaces $-CH_2$, situadas en 2921 cm^{-1} y 2871 cm^{-1}, respectivamente. Las bandas situadas en 1603 y 1440 cm^{-1} se asocian a las vibraciones de flexión y de tensión de los enlaces C=C y -NH, respectivamente, que componen al anillo aromático, seguido de las vibraciones de tensión de los enlaces C-O-H situados a 1052 cm^{-1} [24].

Además, la presencia de la magnetita en este espectro, se corroboró con la banda situada a 533 cm^{-1}, que es atribuida a las vibraciones de tensión del enlace Fe-O[1].

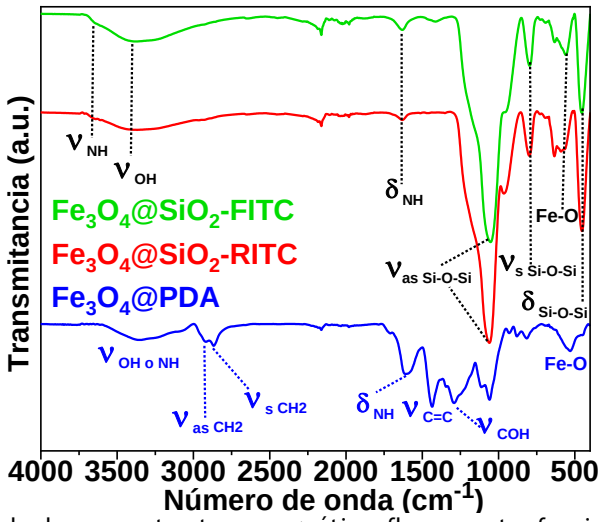


Figura 12: Espectros FTIR de los las nanoestructuras magnéticas fluorescentes funcionalizadas con: polidopamina (azul), con fluoresceína (verde) y con rodamina (rojo).

Por su parte, las NPs de sílice mesoporosa fluorescentes tanto magnéticas como sin funcionalizar con MNPs también se analizaron por FTIR (figura 13). En los tres espectros, se observan las bandas características de los compuestos de sílice, situadas en 1060 cm^{-1}, 793 cm^{-1} y 445 cm^{-1} y asociadas a las vibraciones de tensión asimétrico, simétrico y de flexión de los enlaces Si-O-Si[17], respectivamente. La banda ancha situada en 3400 cm^{-1}, se correspondiente con las vibraciones de tensión de los enlaces -OH de los grupos silanoles.

Adicionalmente, la presencia de la molécula APTS presente en el espectro de la cerámica mesoporosa magnética, funcionalizada con el fluoróforo RITC (espectro rojo), fue corroborada por las bandas situadas en 3626 cm^{-1} y 1637 cm^{-1}, asociadas a las vibraciones de tensión y flexión de los grupos -NH, respectivamente[22]. Por otro lado, la presencia de la polidopamina también se observó mediante las bandas localizadas en 3400 cm^{-1} y 1602 cm^{-1}, asociadas a las vibraciones de tensión y de flexión de los enlaces -NH de los grupos amidas, respectivamente[23]. Finalmente, la presencia de la magnetita en los espectros que corresponden con las cerámicas mesoporosas magnéticas, funcionalizadas tanto con PDA (espectro azul), como con RITC, se corroboró con la presencia de la banda situada a 556 cm^{-1}, que es atribuida a las vibraciones de tensión del enlace Fe-O[1].

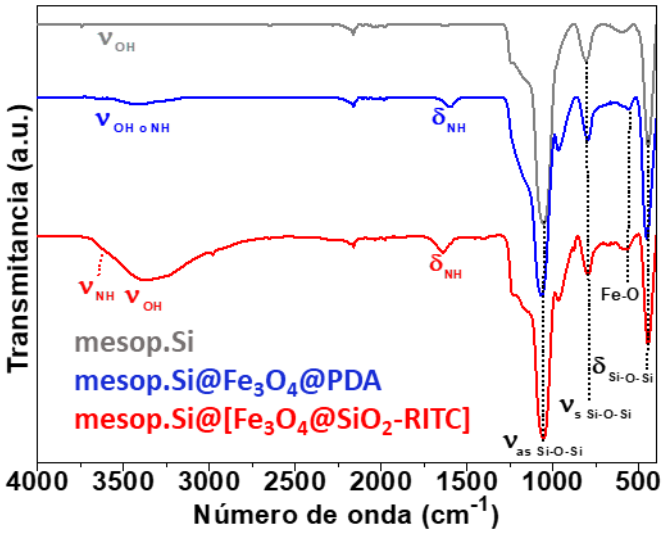


Figura 13: Espectros FTIR de las cerámicas fluorescentes no magnéticas (gris) y magnéticas funcionalizadas con: polidopamina (azul) y con rodamina (rojo).

Las micrografías TEM de todas las nanoestructuras magnéticas con actividad fluorescentes obtenidas se muestran en la figura 14. La micrografía A consiste en NPs regularmente esféricas con un bajo grado de agregación. Por otra parte, ambas nanoestructuras magnéticas de tipo core@shell (micrografías B y C) muestran una morfología esférica como cabía esperar, con la localización interna del fluoróforo, anclado aproximadamente en el medio del espesor de la recubierta de sílice. Además, se observa que tienen un solo núcleo, salvo en el caso de las nanoestructuras que contienen RITC, que se ve un bajo contenido de nanoestructuras con dos núcleos magnéticos y con un cierto grado de agregación observado en los core@shell funcionalizados con FITC.

Asimismo, en la figura 15 se muestra las características morfológicas de las NPs de sílice mesoporosa, tanto sin funcionalizar (micrografía A), como dopadas con MNPs y que presentan actividad fluorescente (micrografías C y D). Estas mesop.Si muestran una morfología cuasi esférica, con un sistema de canales longitudinales en el orden de los mesoporosos, siendo más evidente en la nanoestructura sin funcionalizar. Esta disposición ordenada de los poros internos de su estructura, es característica de una simetría hexagonal bidimensional plana (P6mm)[16] presente en estos materiales mesoporosos.

Además, en las micrografías TEM de las mesop.Si magnéticas fluorescentes de tipo mesop.Si@[Fe_3O_4@SiO_2-RITC] (micrografía C) y las compuestas por mesop.Si@Fe_3O_4@PDA (micrografía D), se observan la presencia de las MNPs a lo largo de la mesop.Si con una disposición más superficial de éstas MNPs en el caso de las mesop.Si@Fe_3O_4@PDA, esto es debido a la absorción ocurrida entre estas dos nanoestructuras. Por otra parte, las cerámicas mesoporosas magnéticas funcionalizada con RITC, con una preparación de la magnetita en presencia de la sílice mesoporosa "in situ", muestra una morfología más similar al nanomaterial precursor. En cuanto a la distribución de tamaños de la sílice mesoporosa, el histograma de distribución estadística de tamaños realizado, demostró que este nanomaterial tiene un diámetro promedio de 78.2 ± 20.2 nm.

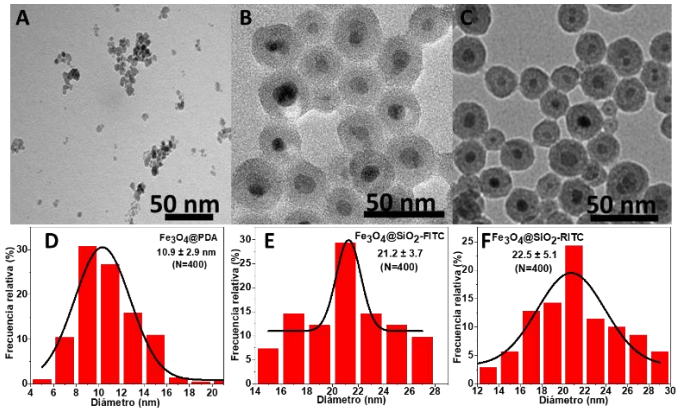


Figura 14: Micrografías TEM e histogramas de la distribución estadística de las nanoestructuras fluorescentes: Fe_3O_4@PDA (A y D), Fe_3O_4@SiO_2-FITC (B y E) y Fe_3O_4@SiO_2-RITC (C y F).

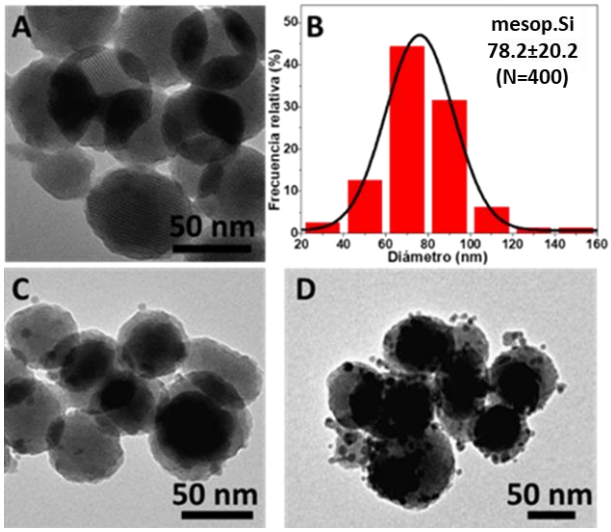


Figura 15: Micrografías TEM e histograma de la distribución estadística de las NPs de sílice mesoporosa no magnéticas (A y B) y magnéticas fluorescentes funcionalizadas con: Fe_3O_4@SiO_2-RITC (C) y Fe_3O_4@PDA (D).

Con el fin de evaluar la estabilidad coloidal en medio acuoso de estas nanoestructuras, éstas se obtuvieron mediante medidas por DLS (figura 16). Las distribuciones de tamaño hidrodinámico demostraron como tendencia general que las nanoestructuras, tanto de tipo core@shell como las mesop.Si funcionalizadas con PDA (micrografías A y F) y RITC (micrografías B y E), poseen tamaños hidrodinámicos próximos a los encontrados en las distribuciones de tamaño encontradas en las imágenes de TEM, esto nos proporciona información acerca del bajo nivel de agregación que se encuentran estas MNPs redispersas en medio acuoso, con un valor de polidispersidad alrededor de 0.2, valores correlacionados con una baja polidispersidad. Sin embargo, los valores de tamaño hidrodinámico encontrado en las nanoestructuras core@shell funcionalizadas con FITC es bastante mayor en comparación con los encontrados en las distribuciones de tamaño TEM, lo que implica la existencia de agregados, corroborando esto, la polidispersidad encontrada para estas nanoestructuras core@shell funcionalizadas con FITC, están alrededor de 0.4.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

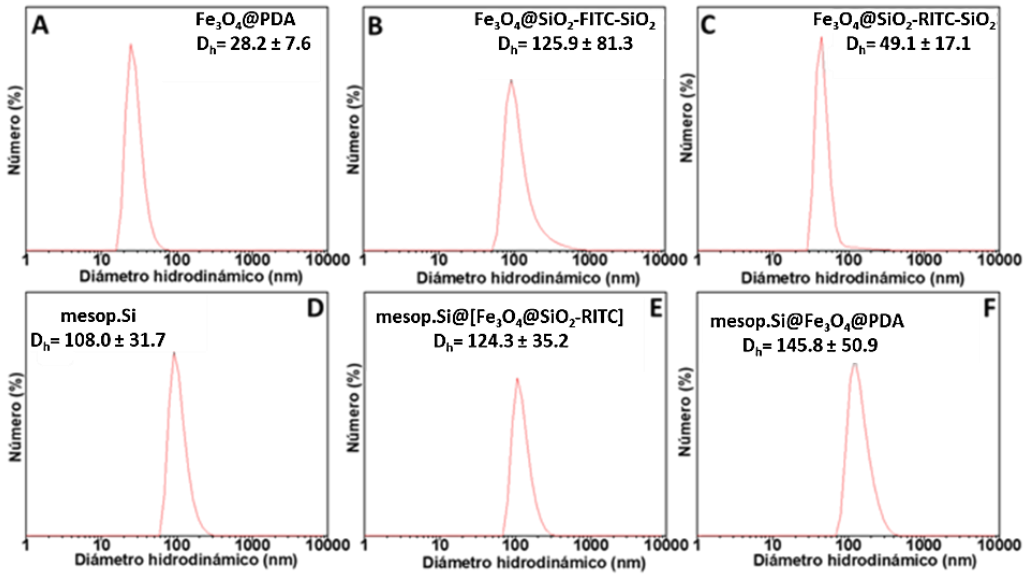


Figura 16: Distribuciones estadísticas del tamaño hidrodinámico de las nanoestructuras magnéticas fluorescentes funcionalizados con: PDA con diámetro TEM de 16.4 nm (A), FITC con diámetro TEM de 21.2 nm (B), RITC con diámetro TEM de 22.5 nm (C), mesop.Si magnéticas con diámetro TEM de 78.2 nm (D) y magnéticas funcionalizadas con: PDA (C) y RITC (F).

Por otra parte, en la TABLA 6 se representan los resultados de las distribuciones de potencial zeta de las MNPs fluorescentes obtenidas, las cuales se utilizaron para funcionalizar a las mesop.Si. El valor promedio de las nanoesferas fluorescentes de Fe_3O_4@PDA es positivo, indicando la correcta funcionalización con polidopamina de toda la superficie de la nanoestructura[25]. Por otra parte, las nanoestructuras magnéticas de tipo core@shell, funcionalizadas con los fluoróforos FITC o RITC, mostraron valores promedios de potencial Z negativos menores que -30 mV. Estos valores están asociados a un recubrimiento altamente homogéneo de los grupos silanoles que contienen en su superficie.

Tabla 6: Valore promedio del potencial zeta de las MNPs fluorescentes estables en medio acuoso.

NP	Potencial zeta (mV)
Fe_3O_4@PDA$_{\text{-COP-11 nm}}$	23 ± 6
Fe_3O_4@SiO_2-FITC-$SiO_{2\text{-M-21 nm}}$	-38 ± 5
Fe_3O_4@SiO_2-RITC-$SiO_{2\text{-M-22 nm}}$	-37 ± 5

Bibliografía

1. Y. L. Wang, J. Bao, L. Wang, F. Zhang & Y.D. Li. One-Pot Synthesis and Bioapplication of Amine-Functionalized Magnetite Nanoparticles and Hollow Nanospheres. Chem. Eur. J. 2006, 12, 6341–6347.

2. K. Yang, H. Peng, Y. Wen & N. Li. Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe_3O_4 nanoparticles. Appl. Surf. Sci. 2010, 256, 3093–3097.

3. Y. Wei et al. Synthesis of Fe_3O_4 Nanoparticles and their Magnetic Properties. Procedia Eng. 2012, 27, 632–637.

4. R. M. Silverstein, G. Bassler and T. Morrill. Spectrometric identification of organic compounds. Wiley, 1991, 26, 430.

5. L. Zhang & J. Cao. Pyrolysis and its mechanism of organomontmorillonite (OMMT) influenced by different functional groups. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2019, 137, 1–10.

6. L. Chen et al. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. Nanotechnology, 2011, 10, 105708.

7. A. tomoiagă, A. Vasile, M. Alexandroaei, I. Sandu. Ultrasound-assisted rapid growth of water compatible magnetite nanoparticles. J. of Optoelectronics and Adv. Materials. 2014, 16, 221–226.

8. A. J. Shnoudeh, I. Hamad, R. Abdo, L. Qadumii et al. Chapter 15 - Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles. Biomaterials and Bionanotechnology, 2019, 527–612.

9. L. Nalbandian et al. Magnetic Nanoparticles in Medical Diagnostic Applications: Synthesis, Characterization and Proteins Conjugation. Current Nanoscience, 2016, 12, 455–468.

10. M.A. González-Gómez, S. Belderbos, S. Yañez-Vilar, Y. Piñeiro, F. Cleeren, G. Bormans, M. Deroose, W. Gsell, U. Himmelreich & J. Rivas. Development of superparamagnetic nanoparticles coated with polyacrylic acid and aluminum hydroxide as an efficient contrast agent for multimodal imaging. Nanomaterials. 2019, 9, 1626.

11. W. Lin, H. Lin, H. Chen, Y. Hwu & Y. Chiou. Shape Effects of Iron Nanowires on Hyperthermia Treatment. J. Nanomater. 2013, 9, 1−6.

12. A. Ponce et al. Nanoparticles in Biology and Medicine: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Springer. 2012, 906, 37.

13. I. Perez De Berti, M.Cagnoli, G. Pecchi, J. Alessandrini, S. Stewart, J. Bengoa, & S. Marchetti. Alternative low-cost approach to the synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles by thermal decomposition of organic precursors. Nanotechnology, 2013, 24, 1–11.

14. Z. Wu, K. Yu, Y. Huang, C. Pan & Y. Xie. Facile solution-phase synthesis of γ-Mn_3O_4 hierarchical structures. Chemistry Central Journal, 2007, 1, 8.

15. P. Yang, S. Zhang, X. Chen, X. Liu, Z. Wang & Y. Li. Recent developments in polydopamine fluorescent nanomaterials. Mater. Horiz. 2020,7, 746–761.

16. A. Wada, S. Tamaru, M. Ikeda & I. Hamachi. MCM-Enzyme-Supramolecular Hydrogel Hybrid as a Fluorescence Sensing Material for Polyanions of Biological Significance. J. AM. CHEM. SOC. 2009, 131, 5321–5330.

17. R. Seco, S. Yáñez, M. A. González, Z. Vargas, M. de la Fuente, Y. Piñeiro Redondo, R. López & J. Rivas. Versatile mesoporous nanoparticles for cell applications. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2021, 21, 2824–2833.

18. K. Chitra & G. Annadurai. Fluorescent Silica Nanoparticles in the Detection and Control of the Growth of Pathogen. J. Nanotechnol. 2013, 1−7.

19. T. J. Barton et al. Tailored Porous Materials. Chem. Mater. 1999, 11, 2633–2656.

20. C. Li, X. Qiao & J. Y. Large surface area MCM-41 prepared from acid leaching residue of coal gasification slag. Mat. Letters, 2016, 167, 246–249.

21. A. Kadib, P. Hesemann, K. Molvinger, J. Brandner, C. Biolley, P. Gaveau, J. Moreau & D. Brunel. Hybrid materials and periodic mesoporous organosilicas containing covalently bonded organic anion and cation featuring MCM-41 and SBA-15 structure. J. Am. Chem. Soc. 2009, 13, 2882–2892.

22. F. Li, Z. Yu, L. Zhao & T. Xue. Synthesis and Application of Homogeneous Fe_3O_4 Core/Au Shell Nanoparticles with Strong SERS Effect. RSC Adv. 2016, 6, 10352–10357.

23. H. Luo, C. Gu, W. Zheng, F. Dai, X. Wang & Z. Zheng. Facile synthesis of novel size-controlled antibacterial hybrid spheres using silver nanoparticles loaded with poly-dopamine spheres. RSC Adv., 2015, 5, 13470–13477.

24. M. Andrade, A. Parussulo, C. Netto, L. Andrade & H. Toma. Lipase immobilized on polydopamine-coated magnetite nanoparticles for biodiesel production from soybean oil. Biofuel Research Journal, 2016, 10, 403–409.

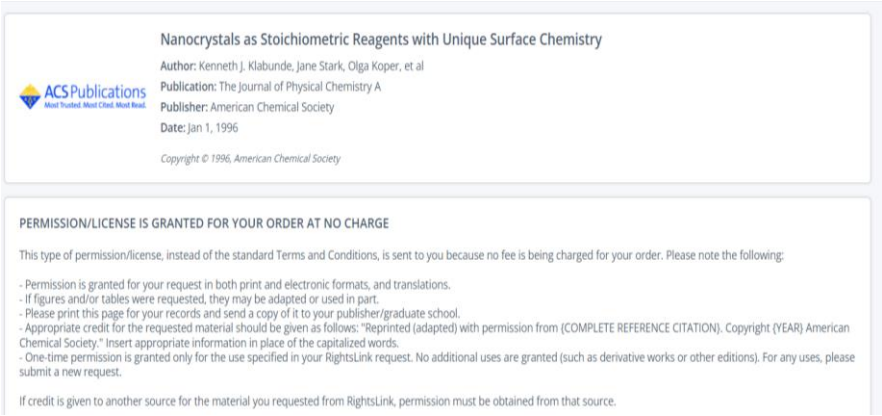
25. E. Mazario, J. Sanchez-Marcos, N. Menendez, P. Herrasti, M. García & A. Muñoz-Bonilla. One-pot electrochemical synthesis of polydopamine coated magnetite nanoparticles. RSC Adv. 2014, 4, 48353–48361.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Anexo III: Permisos de uso de las figuras y publicaciones

- **Permiso para el uso de la Figura 1.2**



Nanocrystals as Stoichiometric Reagents with Unique Surface Chemistry

Author: Kenneth J. Klabunde, Jane Stark, Olga Koper, et al
Publication: The Journal of Physical Chemistry A
Publisher: American Chemical Society
Date: Jan 1, 1996

Copyright © 1996, American Chemical Society

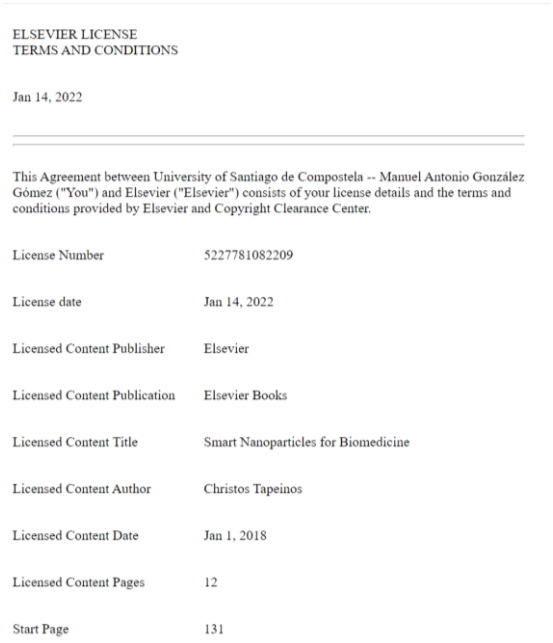
PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

- **Permiso para el uso de la Figura 1.3**



ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jan 14, 2022

This Agreement between University of Santiago de Compostela -- Manuel Antonio González Gómez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5227781082209
License date	Jan 14, 2022
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Elsevier Books
Licensed Content Title	Smart Nanoparticles for Biomedicine
Licensed Content Author	Christos Tapeinos
Licensed Content Date	Jan 1, 2018
Licensed Content Pages	12
Start Page	131

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

End Page	142
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier chapter?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	NANOESTRUCTURAS MAGNÉTICAS MULTIFUNCIONALES PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS
Institution name	University of Santiago de Compostela
Expected presentation date	Jan 2022
Order reference number	1
Portions	(A) Schematic illustration of the arrangement of the magnetic dipoles of various types of magnetic materials. (B) Representative hysteresis loops that illustrate
Specific Languages	spanish
Requestor Location	University of Santiago de Compostela Rua da Muiña nº30 (San Lázaro) Santiago Santiago de Compostela, A Coruña 15707 Spain Attn: University of Santiago de Compostela
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- **Permiso para el uso de la Figura 1.4**

License Number	5226140810077
License date	Jan 11, 2022
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Springer eBook
Licensed Content Title	Innovations in Magnetic Materials
Licensed Content Author	Lawrence E. Murr
Licensed Content Date	Jan 1, 2016
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	30 - 99
Author of this Springer Nature content	no
Title	NANOESTRUCTURAS MAGNÉTICAS MULTIFUNCIONALES PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS
Institution name	University of Santiago de Compostela
Expected presentation date	Jan 2022
Order reference number	Fig. 8
Portions	Fig. 8 Magnetostatic energy.
Requestor Location	University of Santiago de Compostela Rua da Muiña nº30 (San Lázaro) Santiago Santiago de Compostela, A Coruña 15707 Spain Attn: University of Santiago de Compostela
Total	**0.00 EUR**

- **Permiso para el uso de la Figura 1.5**

License Number	5179420540023
License date	Oct 31, 2021
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Elsevier Books
Licensed Content Title	Colloidal Metal Oxide Nanoparticles
Licensed Content Author	G.M. Lekha,Sony George
Licensed Content Date	Jan 1, 2020
Licensed Content Pages	47
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier chapter?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of translations	1
Title	NANOESTRUCTURAS MAGNÉTICAS MULTIFUNCIONALES PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS
Institution name	University of Santiago de Compostela
Expected presentation date	Jan 2022
Order reference number	figure 11.3
Portions	Fig. 11.3. Size-reliant magnetic domain structures from superparamagnetism to ferromagnetism.
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	University of Santiago de Compostela Rua da Muiña nº30 (San Lázaro) Santiago Santiago de Compostela, A Coruña 15707 Spain Attn: University of Santiago de Compostela
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	**0.00 EUR**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- **Permiso para el uso de la Figura 1.6**

License Number	5180750764349
License date	Nov 02, 2021
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Elsevier Books
Licensed Content Title	Hybrid Nanostructures for Cancer Theranostics
Licensed Content Author	O.M. Lemine
Licensed Content Date	Jan 1, 2019
Licensed Content Pages	14
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier chapter?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of translations	1
Title	NANOESTRUCTURAS MAGNÉTICAS MULTIFUNCIONALES PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS
Institution name	University of Santiago de Compostela
Expected presentation date	Jan 2022
Order reference number	7.3
Portions	General procedure for local magnetic hyperthermia
Specific Languages	spanish
Requestor Location	University of Santiago de Compostela Rua da Muiña nº30 (San Lázaro) Santiago Santiago de Compostela, A Coruña 15707 Spain Attn: University of Santiago de Compostela
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	**0.00 EUR**

- **Permiso para el uso de la Figura 1.8**

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jan 14, 2022

This Agreement between University of Santiago de Compostela -- Manuel Antonio González Gómez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

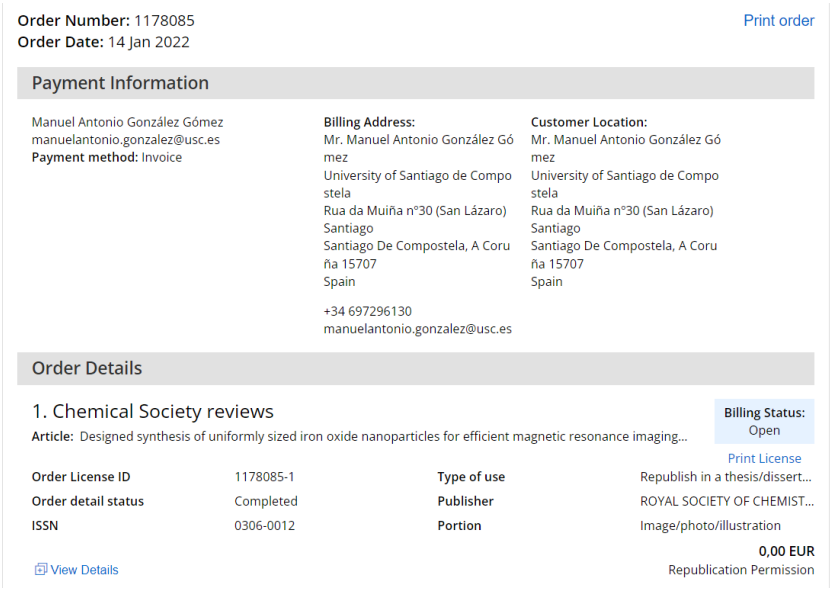
License Number	5227800807219
License date	Jan 14, 2022
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Elsevier Books
Licensed Content Title	Applications of Nanomaterials
Licensed Content Author	Anupam Guleria,Kalpana Priyatharchini,Dinesh Kumar
Licensed Content Date	Jan 1, 2018

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier chapter?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	NANOESTRUCTURAS MAGNÉTICAS MULTIFUNCIONALES PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS
Institution name	University of Santiago de Compostela
Expected presentation date	Jan 2022
Order reference number	1
Portions	Schematic illustration of biomedical applications of magnetic nanomaterials.
Specific Languages	SPANISH
Requestor Location	University of Santiago de Compostela Rua da Muiña nº30 (San Lázaro) Santiago Santiago de Compostela, A Coruña 15707 Spain Attn: University of Santiago de Compostela
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- **Permiso para el uso de la Figura 1.9**



Order Number: 1178085
Order Date: 14 Jan 2022

Print order

Payment Information

Manuel Antonio González Gómez
manuelantonio.gonzalez@usc.es
Payment method: Invoice

Billing Address:
Mr. Manuel Antonio González Gómez
University of Santiago de Compostela
Rua da Muiña nº30 (San Lázaro)
Santiago
Santiago De Compostela, A Coruña 15707
Spain

+34 697296130
manuelantonio.gonzalez@usc.es

Customer Location:
Mr. Manuel Antonio González Gómez
University of Santiago de Compostela
Rua da Muiña nº30 (San Lázaro)
Santiago
Santiago De Compostela, A Coruña 15707
Spain

Order Details

1. Chemical Society reviews

Billing Status: Open

Article: Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging...

Print License

Order License ID	1178085-1	**Type of use**	Republish in a thesis/dissert...
Order detail status	Completed	**Publisher**	ROYAL SOCIETY OF CHEMIST...
ISSN	0306-0012	**Portion**	Image/photo/illustration

0,00 EUR
Republication Permission

View Details

- **Permiso para el uso de la Figura 1.10**



MDPI Open Access Information and Policy

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. This means:

- everyone has free and unlimited access to the full-text of *all* articles published in MDPI journals;
- everyone is free to re-use the published material if proper accreditation/citation of the original publication is given;
- open access publication is supported by the authors' institutes or research funding agencies by payment of a comparatively low **Article Processing Charge (APC)** for accepted articles.

Permissions

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- **Permiso para el uso de la Figura 1.12**

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jan 14, 2022

This Agreement between University of Santiago de Compostela -- Manuel Antonio González Gómez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5227810599607
License date	Jan 14, 2022
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Elsevier Books
Licensed Content Title	Hybrid Nanostructures for Cancer Theranostics
Licensed Content Author	O.M. Lemine
Licensed Content Date	Jan 1, 2019
Licensed Content Pages	14
Start Page	125
End Page	138
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier chapter?	No

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	NANOESTRUCTURAS MAGNÉTICAS MULTIFUNCIONALES PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS
Institution name	University of Santiago de Compostela
Expected presentation date	Jan 2022
Order reference number	7.3
Portions	General procedure for local magnetic hyperthermi
Specific Languages	spanish
Requestor Location	University of Santiago de Compostela Rua da Muiña nº30 (San Lázaro) Santiago Santiago de Compostela, A Coruña 15707 Spain Attn: University of Santiago de Compostela
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12

- **Permiso para el uso de la Figura 1.13**

MDPI Open Access Information and Policy

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. This means:

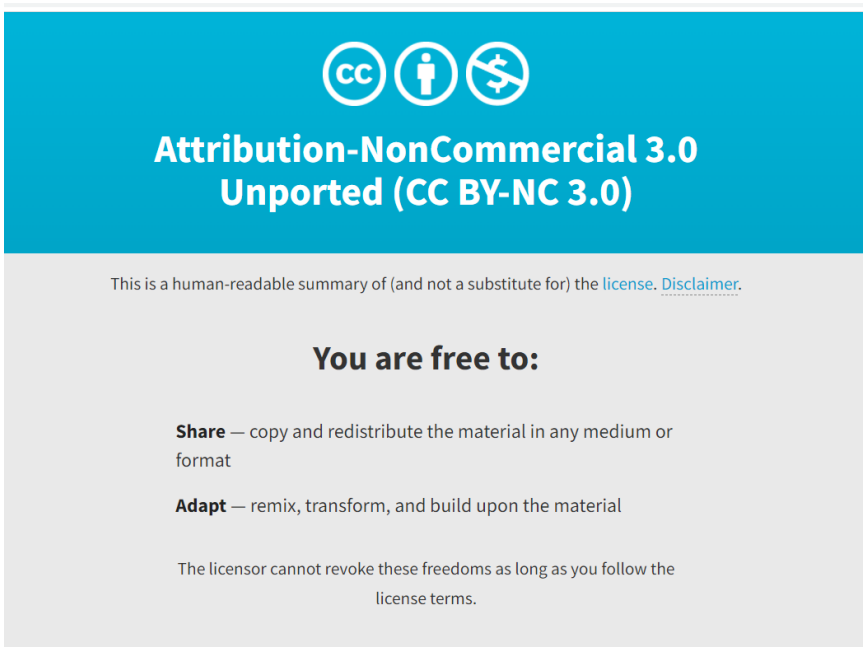
- everyone has free and unlimited access to the full-text of *all* articles published in MDPI journals;
- everyone is free to re-use the published material if proper accreditation/citation of the original publication is given;
- open access publication is supported by the authors' institutes or research funding agencies by payment of a comparatively low **Article Processing Charge (APC)** for accepted articles.

Permissions

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- **Permiso para el uso de la Figura 2.1**



Attribution-NonCommercial 3.0 Unported (CC BY-NC 3.0)

This is a human-readable summary of (and not a substitute for) the license. Disclaimer.

You are free to:

Share — copy and redistribute the material in any medium or format

Adapt — remix, transform, and build upon the material

The licensor cannot revoke these freedoms as long as you follow the license terms.

- **Permiso para el uso de las Figuras 3.4 y 3.14**

MDPI Open Access Information and Policy

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. This means:

- everyone has free and unlimited access to the full-text of *all* articles published in MDPI journals;
- everyone is free to re-use the published material if proper accreditation/citation of the original publication is given;
- open access publication is supported by the authors' institutes or research funding agencies by payment of a comparatively low **Article Processing Charge (APC)** for accepted articles.

Permissions

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- **Permiso para el uso de las Figuras 3.29 - 3.37**

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

Reprints and Permissions

About this article

Check for updates

Cite this article

Belderbos, S., González-Gómez, M.A., Cleeren, F. *et al.* Simultaneous in vivo PET/MRI using fluorine-18 labeled Fe_3O_4@Al(OH)$_3$ nanoparticles: comparison of nanoparticle and nanoparticle-labeled stem cell distribution. *EJNMMI Res* **10,** 73 (2020). https://doi.org/10.1186/s13550-020-00655-9

Download citation

Received	Accepted	Published
25 March 2020	09 June 2020	30 June 2020

DOI
https://doi.org/10.1186/s13550-020-00655-9

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- **Permiso para el uso de las Publicaciones:**

- Development of Superparamagnetic Nanoparticles Coated with Polyacrylic Acid and Aluminum Hydroxide as an Efficient Contrast Agent for Multimodal Imaging

Link: https://www.mdpi.com/openaccess

Permissions

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI.

- Simultaneous in vivo PET/MRI using fluorine-18 labeled Fe_3O_4@$Al(OH)_3$ nanoparticles: comparison of nanoparticle and nanoparticle-labeled stem cell distribution

Link: https://ejnmmires.springeropen.com/articles/10.1186/s13550-020-00655-9#rightslink

SPRINGER NATURE

Simultaneous in vivo PET/MRI using fluorine-18 labeled Fe3O4@Al(OH)3 nanoparticles: comparison of nanoparticle and nanoparticle-labeled stem cell distribution

Author: Sarah Belderbos et al
Publication: EJNMMI Research
Publisher: Springer Nature
Date: Jun 30, 2020

Copyright © 2020, The Author(s)

Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.
To request permission for a type of use not listed, please contact Springer Nature

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

El principal objetivo de esta Tesis fue diseñar, desarrollar y optimizar nanoestructuras superparamagnéticas con composición compleja y respuesta multifuncional para su uso en aplicaciones biomédicas. Se buscó, además, la integración de los componentes en una configuración núcleo@cubierta para incluir las diferentes funcionalidades de los
sucesivos materiales (moléculas, proteínas, plásmidos, etc.) dentro de un agente teragnóstico pequeño y de estructura robusta. Así como su uso en diversas aplicaciones biomédicas in vitro e in vivo.